



Estudio del contenido y valor nutracéutico de los glucosinolatos y otros compuestos presentes en nabizas y grelos (*Brassica rapa* L. var. *rapa*) cultivados en el sur de España

TITULO: *Estudio del contenido y valor nutracéutico de los glucosinolatos y otros compuestos presentes en nabizas y grelos (Brassica rapa L. var. rapa) cultivados en el sur de España*

AUTOR: *Sara Obregón Cano*

© Edita: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba. 2016
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

www.uco.es/publicaciones
publicaciones@uco.es



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

Tesis Doctoral

Estudio del contenido y valor nutracéutico de los glucosinolatos y otros compuestos presentes en nabizas y grelos (*Brassica rapa* L. var. *rapa*) cultivados en el sur de España

Trabajo realizado en el Instituto de Agricultura Sostenible del Consejo Superior de Investigaciones Científicas y en el Departamento de Bromatología y Tecnología de los Alimentos de la Universidad de Córdoba para optar al grado de Doctor por la Universidad de Córdoba de:

Sara Obregón Cano

Dirigido por:

Dr. Antonio De Haro Bailón
Profesor de Investigación IAS-CSIC

Dr. Rafael Moreno Rojas
Catedrático de la Universidad de Córdoba

Córdoba, 2016



TÍTULO DE LA TESIS:

Estudio del contenido y valor nutracéutico de los glucosinolatos y otros compuestos presentes en nabizas y grelos (*Brassica rapa* L. var. *rapa*) cultivados en el sur de España

DOCTORANDO/A:

SARA OBREGÓN CANO

INFORME RAZONADO DEL/DE LOS DIRECTORES DE LA TESIS

(se hará mención a la evolución y desarrollo de la tesis, así como a trabajos y publicaciones derivados de la misma).

La memoria presentada por D^a. Sara Obregón Cano, para optar al grado de doctor, se ha desarrollado bajo nuestra dirección y asesoramiento. Todos los desarrollos experimentales, análisis de datos, estudio estadístico y obtención de resultados y discusión, han estado en todo momento supervisados por nosotros.

A través de la investigación desarrollada, se generó una publicación en una revista indexada: "Análisis del contenido en minerales en nabizas y grelos (*Brassica rapa* L. var. *rapa*) mediante reflectancia en el infrarrojo cercano" [CyTA - Journal of Food, 14:2, 359-367].

Con la siembra de *Brassica rapa* en el sur de España ha sido posible determinar la fecha de siembra más adecuada del cultivo de nabizas y grelos en esta zona geográfica. Se han realizado análisis del contenido en minerales por espectrometría de absorción atómica, de glucosinolatos por cromatografía líquida de alta resolución y de fibra (método Van Soest) y como alternativa a estos métodos, se ha utilizado la espectroscopía por reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS), con excelentes resultados. Por último, se ha comprobado que *B. rapa* posee propiedades antiproliferativas en células tumorales HL-60, por lo que se estima muy beneficioso el uso alimentario de esta planta en la quimioprevención del cáncer.

Por todo ello, autorizamos su presentación a las comisiones y tribunales pertinentes.

Córdoba, 17 de marzo de 2016

Firma del/de los director/es

Fdo.: Rafael Moreno Rojas

Fdo.: Antonio de Haro Bailón

Agradecimientos

Quisiera sintetizar en unas breves líneas mi sentida y sincera gratitud hacia las personas que me han ayudado, de una forma u otra, en los años más intensos y fascinantes de mi trayectoria profesional. Sin ellas, hubiese sido del todo imposible afrontar con éxito la elaboración de esta Tesis Doctoral que representa la culminación de un gran esfuerzo y en la que tanta ilusión he puesto.

Mi más sincero agradecimiento a mis directores de Tesis, los Dres. Antonio De Haro y Rafael Moreno por darme la oportunidad de hacer la tesis con ellos, quisiera que estas palabras no fueran consideradas como una simple formalidad para cubrir un requisito impuesto por la costumbre, sino un sentimiento de profundo reconocimiento hacia ellos. Especialmente al Dr. Antonio De Haro, le agradezco profundamente el iniciarme y guiarme en el fascinante mundo de la investigación, por su disponibilidad y estímulo, su dedicación, sus consejos, su comprensión y su paciencia mostrados durante todos estos años y sobre todo por hacerlo posible.

Además quisiera agradecer a la Dra. Ángeles Alonso su apoyo y toda su ayuda en la Tesis y por estar dispuesta siempre con una sonrisa.

A Gloria Fernández por haber confiado en mí desde el principio, por transmitirme siempre su optimismo, por escuchar y respetar siempre mis sugerencias e ideas.

Gracias también a Ana M^a Jurado y José Luís Luque, por su colaboración en el trabajo de laboratorio y especialmente por acompañarme en el día a día, regalándome tantos buenos momentos y, sobre todo, por hacer tuyas mis alegrías y mis dificultades.

Un profundo agradecimiento a toda mi familia, a mis padres M^a Carmen y José y a mi hermano Daniel, las personas más nobles que conozco, que siempre han estado presentes en mis logros y me han apoyado en mis peores momentos, siempre preocupados por mi felicidad, alentadores y reconfortantes en los momentos bajos y quienes me han hecho crecer como persona. Gracias por confiar siempre en mí, por vuestro amor incondicional y por estar siempre a mi lado.

Y de una manera muy especial a Antonio José, mi marido, no sólo por su apoyo en aspectos profesionales y en especial en la tesis, sino por todo lo que me aporta en el ámbito personal, su constante interés y por estar ahí siempre a mi lado.

Gracias a todos y cada uno de vosotros por todo esto y por mucho más.

MUCHAS GRACIAS



Índice

Estudio del contenido y valor nutracéutico de los glucosinolatos y otros compuestos presentes en nabizas y grelos (*Brassica rapa* L. var. *rapa*) cultivados en el sur de España

Resumen	8
Capítulo I	15
Introducción.....	15
1.1. Descripción del género <i>Brassica</i>	15
1.2. Especie <i>Brassica rapa</i>	18
<i>1.2.1. Origen y evolución</i>	18
<i>1.2.2. Cultivos de nabizas y grelos. Situación actual</i>	20
<i>1.2.3. Importancia de la horticultura y el consumo de hortalizas en Andalucía.</i>	23
<i>1.2.3.1. Posibilidades de cultivo y consumo de nabizas y grelos</i>	26
1.3. Calidad de nabizas y grelos	27
<i>1.3.1. Características nutritivas de nabizas y grelos</i>	27
<i>1.3.1.1. Glucosinolatos, sus productos de degradación y propiedades</i>	27
<i>1.3.1.2. Componentes inorgánicos</i>	32
<i>1.3.1.3. Fibra</i>	36
<i>1.3.2. Características organolépticas de nabizas y grelos</i>	38
1.4. Técnicas espectroscópicas de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS).	40
1.5. Ensayos de citotoxicidad con células HL-60	41
Capítulo II	44
Hipótesis del plan de investigación	44
Objetivos	47
Capítulo III	49
Ensayos preliminares del cultivo de <i>Brassica rapa</i> en Andalucía y La Macaronesia. 49	

Capítulo IV	71
Cultivo de <i>Brassica rapa</i> en Córdoba para producción de nabizas y grelos. Caracterización nutricional	71
Capítulo V	99
Análisis del contenido en minerales en nabizas y grelos (<i>Brassica rapa</i> L. var. <i>rapa</i>) mediante reflectancia en el infrarrojo cercano	99
Capítulo VI	122
Análisis del contenido total e individual de glucosinolatos en nabizas y grelos (<i>Brassica rapa</i> L. subsp. <i>rapa</i>) mediante reflectancia en el infrarrojo cercano ..	122
Capítulo VII	148
Uso de la espectroscopía de infrarrojo cercano para el análisis del contenido de fibra ácido detergente en nabizas y grelos (<i>Brassica rapa</i> L. subsp. <i>rapa</i>)	148
Capítulo VIII	174
Efectos quimiopreventivos en <i>Brassica rapa</i>	174
Capítulo IX	196
Conclusiones	196
Referencias bibliográficas	201
ANEXO I: Tablas	214
ANEXO II: Artículos publicados y artículos preparados para enviar a revistas.....	258



Resumen

Resumen

El género *Brassica* es económicamente el más importante dentro de la familia *Brassicaceae*, por incluir muchas especies cultivadas en agricultura y horticultura. Los vegetales del género *Brassica*, además de considerarse productos de alto valor alimenticio, se han relacionado con la salud humana y con la reducción del riesgo de padecer cierto tipo de enfermedades crónicas, problemas cardiovasculares y diferentes tipos de cánceres. Las variedades hortícolas de este género reciben el nombre común de coles, y algunas son muy populares como el brócoli, las coles de Bruselas, el repollo o la coliflor; sin embargo hay otras hortalizas del mismo género que son conocidas sobre todo a nivel local o regional como es el caso de las nabizas y los grelos.

En Galicia, los cultivos de la especie *Brassica rapa* L. subsp. *rapa* conocidos como nabos, nabizas y grelos tienen una larga tradición y amplia distribución en la región. El nabo es la raíz engrosada de esta especie, las nabizas son las hojas vegetativas, y los grelos son los brotes florales junto con las hojas que los rodean. Teniendo en cuenta el creciente interés por este cultivo, y con vistas a su extensión a otras regiones de la península ibérica, desde los últimos años se están desarrollando programas de mejora genética que nos permitan obtener variedades de nabizas y grelos adaptadas a las condiciones edafoclimáticas mediterráneas y de alto valor nutracéutico.

La introducción de nuevos cultivos hortícolas está cobrando cada vez mayor importancia debido a la promoción del consumo de verdura fresca entre la población. Además, está reconocido que dietas ricas en frutas y verduras son más saludables y respetuosas con el medio ambiente. En la presente tesis se ha llevado a cabo el estudio del contenido y valor nutracéutico de compuestos beneficiosos para la salud humana (glucosinolatos, minerales y fibra) presentes en nabizas y grelos cultivados en el sur de España.

Con la siembra de *Brassica rapa* en el sur de España ha sido posible determinar la fecha de siembra más adecuada del cultivo de nabizas y grelos en esta zona geográfica. Los resultados del estudio de los diferentes caracteres relacionados con la nutrición demuestran que existe una gran variabilidad entre los genotipos estudiados de *B. rapa*. Esto ha permitido la selección de líneas estables e idóneas para obtener nabizas y grelos en Córdoba de calidad nutritiva equiparable a los cultivados en Pontevedra. El trabajo se

ha completado con el estudio de los caracteres agronómicos y sensoriales de las líneas de *B. rapa* más prometedoras.

Cabe señalar, que los métodos tradicionales de análisis del contenido en minerales por espectrometría de absorción atómica, de glucosinolatos por cromatografía líquida de alta resolución y de fibra (método Van Soest) son caros, lentos, utilizan reactivos nocivos para el medio ambiente y necesitan mano de obra especializada para su aplicación. Como alternativa a estos métodos, desde los últimos 40 años se viene utilizando la espectroscopía por reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS) para el análisis de una gran diversidad de componentes de la calidad en los alimentos, así como de otras sustancias de interés para la industria farmacéutica, química, alimentaria, incluyendo frutas y verduras, y agrícola.

En este trabajo de tesis, se han desarrollado por primera vez ecuaciones de calibración que permiten la utilización NIRS para el análisis rápido, simultáneo y preciso del contenido en minerales, glucosinolatos y fibra en muestras de *Brassica rapa*.

Finalmente el estudio de las nabizas y grelos se ha complementado con el análisis de las propiedades quimiopreventivas de estas verduras. Hemos explorado la toxicidad celular de las nabizas, del glucosinolato mayoritario intacto (gluconapina) y de sus productos de hidrólisis y hemos confirmado que la toxicidad en el crecimiento tumoral se asocia principalmente a los productos de degradación de la gluconapina producidos por la acción de la enzima mirosinasa. Nuestros experimentos han demostrado que *B. rapa* posee propiedades antiproliferativas en células tumorales HL-60 y podemos resaltar los beneficios del uso alimentario de esta planta en la quimiopreención del cáncer.

Como conclusión, los datos aportados en este trabajo son de utilidad, por un lado para profundizar en el conocimiento acerca de estos cultivos, ya sea en su calidad nutritiva, organoléptica o de sus propiedades quimiopreventivas contra el cáncer, con vistas a la promoción y extensión del cultivo a otras regiones de la península ibérica. Por otro lado, hemos desarrollado herramientas de análisis rápido, preciso y de bajo coste del contenido en minerales, glucosinolatos y fibra ácido detergente en nabizas y grelos, mediante tecnología NIRS, que pueden ser utilizadas para futuros programas de mejora de la especie.

Recomendamos así, como resultado de esta tesis doctoral, la incorporación de nabizas y grelos en la dieta mediterránea como verduras nutraceuticas y saludables, por su efecto quimiopreventivo contra el cáncer, y así promover e impulsar el consumo de verdura fresca en la población. *Brassica rapa* es, además, un cultivo que favorece acciones

beneficiosas para el medio ambiente y sería una opción óptima para incluir en la agricultura andaluza como cultivo innovador en el sector hortofrutícola.

Summary

From an economical point of view, genus *Brassica* is the most important one within the family Brassicaceae, since they include a great amount of important agricultural and horticultural species. In addition to being appreciated as products with high alimentary value, genus *Brassica* vegetables have been associated with benefits for human health and decrease of the risk from suffering certain chronic issues, cardiovascular problems and several cancer typologies. The horticultural varieties of genus *Brassica* usually receive the common name of ‘cabbage’, and some of them are very popular as the broccoli, Brussels sprout, cauliflower and cabbage; but nevertheless some other vegetables belonging to the same genus are less known. That is the case of turnips, turnip greens and turnip tops.

In the Spanish region of Galicia, crops of *Brassica rapa* L. subsp. *rapa*, better known as turnips, turnip greens and turnip tops have a wide distribution with old tradition across the territory. The turnips form the thickened root of the specie, the turnip greens are the vegetative leafs, and the turnip tops are the flowered outbreak, with the surrounding leafs. Taking into account the rising interest about this cultivation and with a view to potential extension to other regions across the Iberian Peninsula, several programs have been developed in recent years in order to evolve and improve this specie, giving rise to varieties that seem to be fully adapted to the Mediterranean edafoclimatic conditions. Those varieties are also highly appreciable from a nutraceutical point of view.

The introduction of new horticultural crops is becoming increasingly important due to the promotion of healthy consumption of fresh vegetables among population. Additionally, it is well known that diets based mostly on fruit and vegetables are more healthy and respectful with environment. In this work we address the study of contents and nutraceutical values in some beneficial composites (glucosinolates, minerals and fiber) present in turnip greens and turnip tops cultivated in the south of Spain.

The cultivation of *Brassica rapa* in the Southern Spain has made possible to determine the most appropriate dates for seeding turnip greens and turnip tops at this geographic location. The study results of several characteristics related to nutrition have shown a great variability among analyzed genotypes of *B. rapa*. This process has enabled us to select suitable stable lines to obtain turnip greens and turnip tops in Cordoba (Andalusia) whose nutritive quality is comparable to those cropped in Pontevedra

(Galicia). This work was completed with the study of agronomic and sensorial attributes for most promising lines.

It should be said that traditional methods for mineral content analysis (Atomic Absorption Spectrometry), glucosinolates content analysis (High Pressure Liquid Chromatography) and fiber content analysis (Van Soest method) are costly, slow, aggressive to the environment and they need specialized workers for their application.

As an alternative to those methods, in the last 40 years the Near-Infrared Reflectance Spectroscopy method (NIRS) has become more frequently used to analyze a great diversity of foods components and other substances of interest for pharmaceutical, chemical, agrarian and food industry, including fruits and vegetables.

During the work carried out for this thesis, for the first time have been developed calibration equations enabling us to use NIRS in order to obtain quick, precise and simultaneous analysis of minerals, glucosinolates and fiber content in samples of *Brassica rapa*.

Finally, the study of turnip greens and turnip tops was complemented with the analysis of chemopreventive properties in such vegetables.

We have explored the cellular toxicity of the turnip greens, from intact majoritarian glucosinolate (gluconapin) and from its hydrolysis, so we have confirmed that toxicity in tumor growth is mainly associated to the products of degradation of the gluconapin, produced by action of myrosinase enzyme. Our experiments have evidenced that *B. rapa* plant possesses antiproliferative properties in HL-60 cells, and highlight the use of this plant in cancer chemoprevention.

Finally, data and conclusions gathered during this work are useful in different forms: first, they contribute to get deeper knowledge about these crops (its nutritive and organoleptic quality, or its chemopreventive attributes against cancer) with a view over its promotion and extension to other regions in the Iberian Peninsula. Later, we have developed low cost tools for analysis that facilitate a quick precise way to find mineral content, glucosinolates and fiber in turnip greens and turnip tops by NIRS methods, which can be reused in future plant breeding programs of the species.

On the basis of this doctoral thesis, we are in a position to recommend the incorporation of turnip greens and turnip tops as part of the mediterranean diet, since they have proven to be nutraceutical and healthy vegetables, mainly due to its chemopreventive effects against cancer. It could be also a fine way to promote and increase the consumption of

fresh vegetables among population. *Brassica rapa* is, ultimately, a crop that could become an optimal choice to introduce into the andalusian agriculture.



CAPÍTULO I

Introducción

Capítulo I

Introducción

1.1. Descripción del género *Brassica*

El género *Brassica* es uno de los 350 géneros de la familia *Brassicaceae* que pertenece al Orden *Capparales*. Es el género económicamente más importante dentro de esta familia y se cree que se originó entre las regiones del Mediterráneo y del Sahara, donde el clima se compone de inviernos suaves seguidos de veranos secos y calurosos, aunque muchas especies dentro del género están bien adaptadas a crecer en condiciones más frías. El entorno a la cuenca mediterránea pudo haber dado la evolución de taxones adaptados a la sequía y a la sal dentro del género y por tanto están ampliamente distribuidas por todo el mundo debido a su gran capacidad de adaptación a condiciones climáticas (Gómez-Campo, 1980).

Es uno de los géneros más ampliamente cultivados en el mundo, la producción mundial en 2011 se estimó entre 45 y 60 millones de toneladas (Yadav et al., 2011; Agricultural Marketing Resource Centre, 2013). La importancia económica de este género se centra de manera casi exclusiva en seis especies, tres de ellas diploides, *Brassica oleracea*, *Brassica rapa* y *Brassica nigra*, y tres anfidiploides derivadas de las primeras, *Brassica juncea*, *Brassica carinata* y *Brassica napus*. Las relaciones filogenéticas entre estas especies fueron descubiertas por U en 1935, a través de una figura conocida como triángulo de U, en cuyos vértices se disponen las tres especies cuyos genomas se denominan básicos, y los anfidiploides, producto de la hibridación de las especies con genomas básicos, en los laterales (Baladrón, 1991) (Figura 1). Las seis especies de *Brassica* cultivadas del triángulo de U son las principales productoras de las verduras de hoja verde, semillas oleaginosas, forrajes y, más recientemente, de biocombustible. Se conocen más comúnmente como mostazas o coles y le siguen en importancia agronómica los géneros *Raphanus*, cultivados por sus raíces comestibles y *Sinapis* como fuente de condimentos.

El género *Brassica* también se valora en otros sectores además del alimentario, se utiliza en biorremediación, como plantas ornamentales, fuentes de medicamentos, acondicionadores del suelo, abonos verdes, cultivos de compostaje y muchas especies son importantes en la producción de aceites industriales, tales como los combustibles

líquidos y lubricantes en motores diesel (Gómez-Campo, 1980; Rao y Horn, 1995; Rakow, 2004; Dixon, 2007).

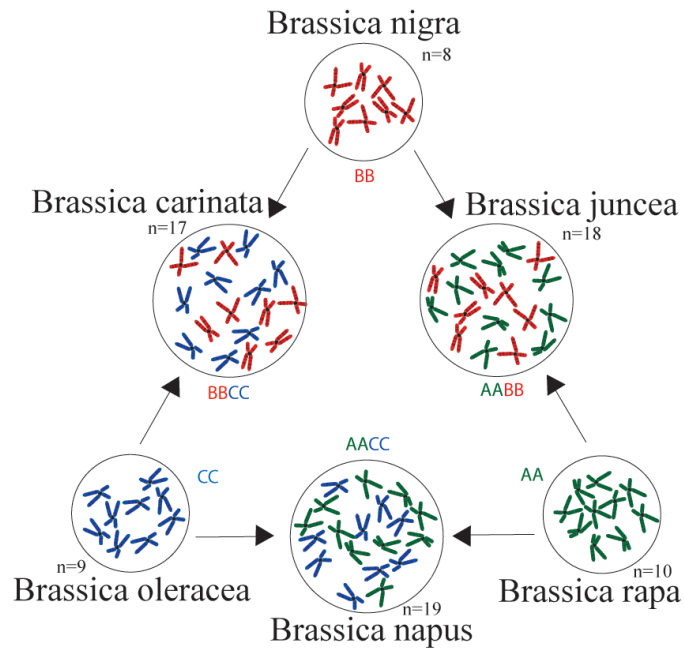


Figura 1. Triángulo de U. Relaciones genéticas entre las seis especies del género *Brassica*. (U, 1935).

La semilla de *B. napus* se ha convertido en una de las fuentes más importantes del mundo del aceite vegetal y el aceite primario para la producción de biodiesel en Europa, el subproducto se utiliza como un alimento de alta proteína para animales (Körbitz, 1999; Cardone et al., 2003; Delourme et al. 2006).

Las especies económicamente más importantes del género *Brassica* se muestran en la Tabla 1. *Brassica rapa* subsp. *pekinensis* y subsp. *chinensis* están ampliamente cultivada como verdura en China. Las hojas de mostaza (*B. juncea*) se consumen en grandes cantidades en China y otros países asiáticos, pero son cultivos vegetales locales y hay muy poco comercio hacia el exterior (Rakow, 2004).

Hoy día se llevan a cabo programas de mejora de desarrollo de variedades híbridas F1 para mejorar la uniformidad de los cultivos y la productividad, esto es de suma importancia para la comercialización de estos productos (Dwivedi et al., 2015). Otros objetivos actuales se centran en el desarrollo de germoplasma y variedades ya resistentes a plagas y enfermedades (Barbetti et al., 2015).

Tabla 1. Principales especies de cultivos del género *Brassica* desde el punto de vista económico y partes de la planta utilizada para el consumo (Sadowski et al., 2011).

Especies	Subespecies	Nombre común	Parte de la planta
<i>Brassica oleracea</i>	<i>acephala</i>	col rizada, coles	hojas
	<i>capitata capitata</i>	repollo	yemas terminales (cabezas)
	<i>capitata sabauda</i>	col de Milán	yemas terminales (cabezas)
	<i>costata</i>	repollo tronchudo	cabezas sueltas
	<i>gemmifera</i>	coles de Bruselas	yemas vegetativas
	<i>botrytis botrytis</i>	coliflor	inflorescencias
	<i>botrytis italica</i>	brócoli	inflorescencias
	<i>gongylodes</i>	kohlrabi	tallos inflorescencias
	<i>albogabra</i>	nabo chino	hojas
<i>Brassica rapa</i>	<i>rapa</i>	nabo	raíz
	<i>rapa</i>	nabizas	hojas
	<i>rapa</i>	grelos	brotos
	<i>chinensis</i>	pak choi, bok choy	hojas
	<i>pekinensis</i>	col china, pe-tsai	hojas
	<i>parachinensis</i>	choy sum	hojas
	<i>ruvo</i>	broccoleto	brotos
	<i>perviridis</i>	komatsuna, hojas	hojas
<i>Brassica napus</i>	<i>pabularia</i>	nabicol	hojas
	<i>napobrassica</i>	nabo sueco	raíces
<i>Brassica juncea</i>	<i>rugosa</i>	hojas de mostaza	hojas
	<i>capitata</i>	cabeza de mostaza	cabezas
	<i>crispifolia</i>	hojas de mostaza	hojas

Por otro lado, en los últimos años se está generalizando el consumo de alimentos funcionales naturales. Una dieta rica en vegetales pertenecientes a la familia *Brassicaceae* (= *Cruciferae*) ha sido reconocida por reducir el riesgo de diferentes tipos de cáncer, basado en el efecto de los productos de degradación de los glucosinolatos (Vale et al., 2015). Estos vegetales se caracterizan también por su bajo contenido en grasa y proteína y su alto contenido en fibras, minerales y vitaminas. Comparados con otras hortalizas destacan por su elevado contenido en vitaminas A, C, E, B6, K, luteína, carotenoides y folatos (Jahangir et al., 2009; USDA, 2015). También son particularmente ricas en componentes inorgánicos como potasio, cobre, magnesio, manganeso, hierro, cinc y calcio (Kopsell et al., 2004).

El consumo de brotes de *Brassica* se ha convertido en un alimento popular saludable, se recomienda debido a su bajo contenido de grasa y la riqueza en fitoquímicos que promueven la salud (Hagen et al., 2009). En particular se recomienda el consumo de brotes de brócoli (*B. oleracea* L. subsp. *italica* Plenck, var. calabrese) en la prevención del cáncer, debido a su alto contenido en glucosinolatos y en selenio (Tian et al., 2016). Actualmente se están estudiando las propiedades de otros brotes de otras especies del mismo género, como por ejemplo *B. oleracea* subsp. *acephala*, *B. oleracea* L. subsp. *costata* y *B. oleracea* subsp. *capitata* (Vale et al., 2015).

1.2. Especie *Brassica rapa*

1.2.1. Origen y evolución

Brassica rapa L. fue la primera especie de *Brassica* domesticada por el hombre hace miles de años, apareciendo ya citada en la literatura sánscrita con el nombre de Siddharta, lo que prueba la antigüedad de su cultivo (Prakash, 1961). Se cree que evolucionó en Europa y posteriormente se propagó a Asia. Su amplia disponibilidad, en general asociada a los hábitats de malezas, hizo que fuese probablemente la primera *Brassica* utilizada como cultivo (nabos, hojas de col china, brotes florales jóvenes, semillas, etc.) y ha sido ampliamente utilizada por todas las civilizaciones asentadas en estas regiones (Gómez-Campo et al, 1999). Existen numerosas subespecies de *B. rapa*, que se originaron en dos centros de origen independientes, uno en Europa para los tipos oleaginosos y otro en Asia que dio lugar a las formas hortícolas (Gómez-Campo et al., 1999). El hombre ha podido modificar, mediante selección, todas las partes de la planta con vistas a la utilización en alimentación humana. Todo ello ha sido debido a la capacidad de adaptación de las distintas subespecies a condiciones ambientales muy diversas, sus posibilidades de manejo genético y las características de los compuestos químicos presentes en los distintos tejidos de la planta.

Las subespecies más conocidas de *B. rapa* son: *pekinensis*, *chinensis*, *parachinensis*, *perviridis*, *ruvo* y *rapa*. Hasta hace poco tiempo, estos grupos fueron considerados como especies separadas, debido a la amplia gama de variabilidad que presentan y el hecho de que se desarrollaron de manera aislada unos de otros. La col china (subespecie *pekinensis*) tiene su centro de diversificación en el norte de China donde se cultiva también por su semilla oleaginosa. La subespecie *chinensis* es una verdura de hoja que se diferenció de los tipos oleaginosos de China y la subespecie *para-chinensis* es un

derivado de la subespecie *chinensis*. La subespecie *rapa* (nabo, nabizas y grelos) se cultiva en todo el mundo como un vegetal y como forraje para los animales (Rakow, 2004).

En el norte de España y Portugal los cultivos hortícolas de *Brassica rapa* subsp. *rapa* tienen una gran tradición formando parte de numerosos platos de la cocina tradicional de esta zona (p. ej. “Lacón con grelos”), y se comercializan tanto en fresco como envasados. De la misma planta se cosechan los nabos, que son la raíz engrosada (hipocotilo), las nabizas que son las hojas vegetativas, y los grelos que son los tallos junto con las hojas florales previos a la floración de la planta. En la actualidad hay variedades típicamente productoras de nabos, de nabizas y otras de grelos y en estos dos últimos casos estas variedades, seleccionadas por los agricultores, apenas forman nabo (Baladrón, 1991).

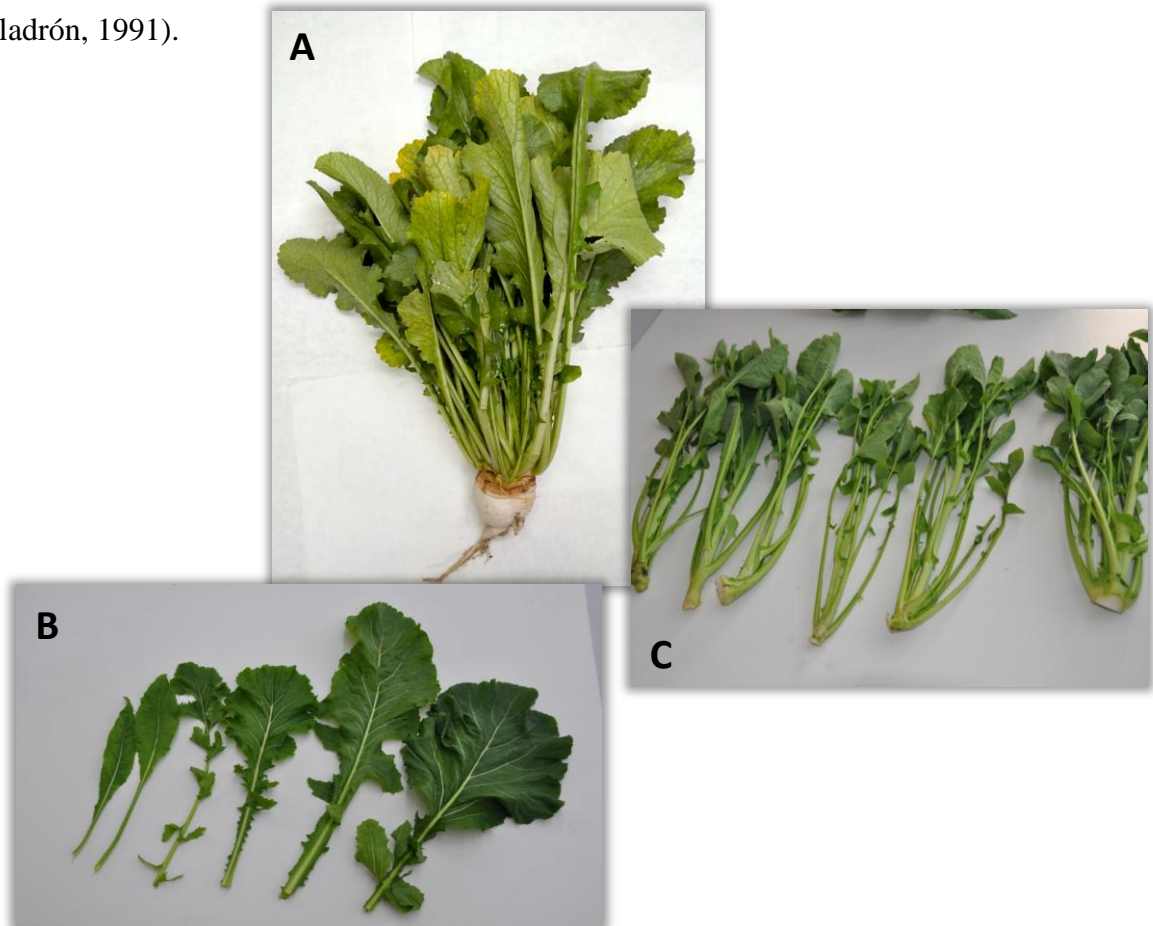


Figura 2. Planta entera con raíz (nabo) (A). Nabizas (B). Cimos o grelos (C)

Hoy día la mejora de estos cultivos va encaminada a aumentar la sostenibilidad de la producción y la calidad nutricional. Los bancos de germoplasma tienen como objetivo el aumento en la variación alélica beneficiosa y dependen de nuestra capacidad para

identificar alelos beneficiosos e introgresión de germoplasma 'exótico' en el material de reproducción. Actualmente *Brassica rapa* está considerada una especie de referencia para estudios de genómica de *Brassica*. Entre las tres especies básicas del género *Brassica*, *B. rapa* (genoma AA) tiene el genoma más pequeño (529 Mpb), en comparación con *B. nigra* (genoma BB, 632 Mpb) y *B. oleracea* (genoma CC, 696 Mpb) (Jeong-Hwan et al., 2011).

En este sentido, la secuencia del genoma de *Brassica rapa* fue publicada por primera vez en 2011. Desde entonces, otros genomas de *Brassica* han sido secuenciados o están sometidos a la secuenciación. La base de datos de *Brassica* (**BRAD**) fue construida para recoger, integrar, ilustrar, y visualizar conjuntos de datos genómicos de *Brassica* de manera eficiente. **BRAD** ofrece útiles herramientas de búsqueda de bases de datos de anotación de genes. También incluye herramientas de análisis del genoma tales como BLAST y GBrowse (Wang et al., 2016). Actualmente se ofrece una secuencia del genoma de *B. rapa* (Chiifu-401) utilizando tecnologías de secuenciación de segunda generación. BRAD se actualiza continuamente y los datos completos están disponibles en internet (www.plantgdb.org/BrGDB).

1.2.2. Cultivos de nabizas y grelos. Situación actual

A la hora de establecer las producciones mundiales y nacionales de *Brassica rapa*, la FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) no incluye a los grelos y nabizas como productos hortícolas en su listado, la única aproximación encontrada es un apartado llamado "coles y otras brasicas". En este grupo los cinco principales productores en el año 2013 fueron de mayor a menor: China continental con más de 31 millones de toneladas/año, India con más de 8 millones de toneladas/año, Federación de Rusia con más de 3 millones de toneladas/año y República de Corea y Japón con más de 2 millones de toneladas/año (Figura 3). En el caso de España serían 182 mil toneladas/año (FAOSTAT, 2013).

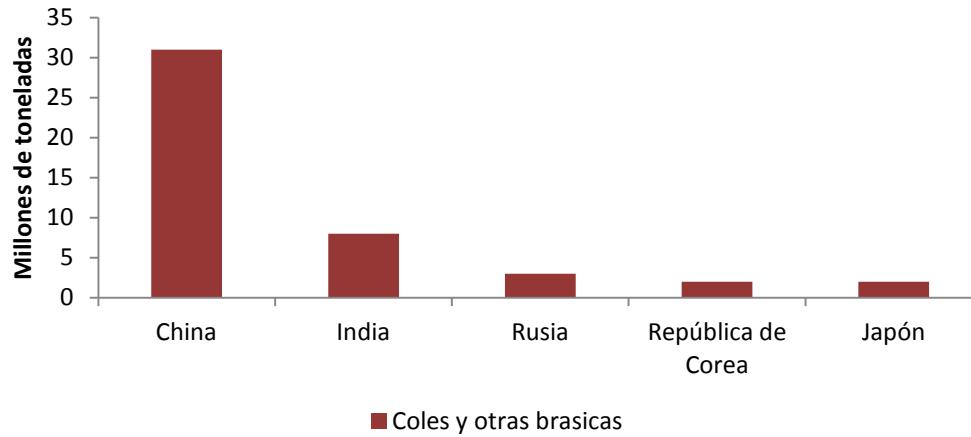


Figura 3: Principales productores de "coles y otras brasicas" (FAOSTAT, 2013)

En España, algunos cultivos hortícolas del género, como los grelos, las berzas o el nabicol, gozan de gran tradición en Galicia, León y Asturias pero ven limitado su cultivo en áreas del sur o de la cuenca Mediterránea debido probablemente a una falta de adaptación del cultivo a las condiciones climáticas de estas zonas. Concretamente las nabizas y grelos son conocidos de modo casi exclusivo en Galicia y su venta y consumo es preferentemente en mercados locales; por ello, es difícil obtener cifras reales en cuanto a producción y rendimiento de estos cultivos. La producción de nabizas y grelos ha sido desde siempre muy artesanal y su principal forma de presentación es en fresco en mercados locales, aunque cada vez es más frecuente su comercialización en pequeñas y grandes superficies (Francisco et al., 2009).

En los datos recogidos por el Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (MAGRAMA), España contó en el 2015 con 112 ha de cultivo de grelos, todo comprendido en la Comunidad Autónoma de Galicia.

El Instituto Gallego de Calidad Alimentaria (Ingacal) es una entidad de derecho público, adscrita a la Consejería de Medio Rural, creada en 2005 para la promoción y defensa de la calidad alimentaria gallega, es la entidad encargada de gestionar la Denominación de Origen (D.O.) "Grelos de Galicia", formada en el 2010. Esta D.O. define las características del producto de la siguiente forma:

"Color verde intenso, más acentuado a medida que la planta se aproxima al momento de floración. Sabor ligeramente ácido, combinado con cierto amargor. Textura ligeramente fibrosa, más acusada si la variedad es de hoja estrecha, con elevado porcentaje de

peciolos. Dureza muy baja debido al bajo contenido en fibra" (Diario Oficial de la Unión Europea, 2009).

Debido al carácter minifundista del cultivo en Galicia, al sistema de reproducción por polinización cruzada o alogamia y a la práctica de cosechar semilla propia por parte del agricultor, se han ido generando numerosas variedades adaptadas a las condiciones ecológicas de cada zona, así como a las preferencias de los consumidores locales, lo que ha llevado a una diversidad del cultivo en toda la geografía gallega (Baladrón, 1991). Este hecho dificulta el conocimiento del número de variedades locales, sus características cualitativas y el potencial agronómico de cada una de ellas (Francisco et al., 2009).

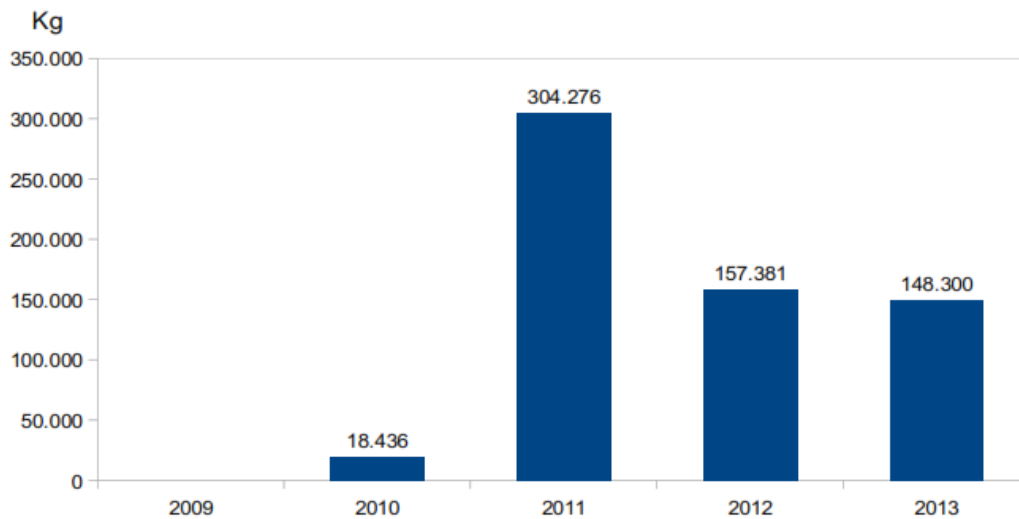


Figura 4. Datos de producción de nabizas y grelos desde 2009-2013 en España.

Las nabizas y los grelos son un cultivo en alza (Figura 4), ocupando un lugar destacado en la agricultura tradicional gallega y en Portugal. La diversificación de este producto está cobrando especial importancia debido a su carácter perecedero y el corto periodo de cosecha. En la actualidad más de una docena de empresas gallegas y nacionales transforman grelos y nabizas, no solo en Galicia sino también en otras partes de España y Portugal. Se pueden encontrar comercializados en lata, desecados y como producto de cuarta y quinta gama formando parte de preparaciones culinarias tales como el caldo gallego, revueltos, etc. (Francisco, 2010).

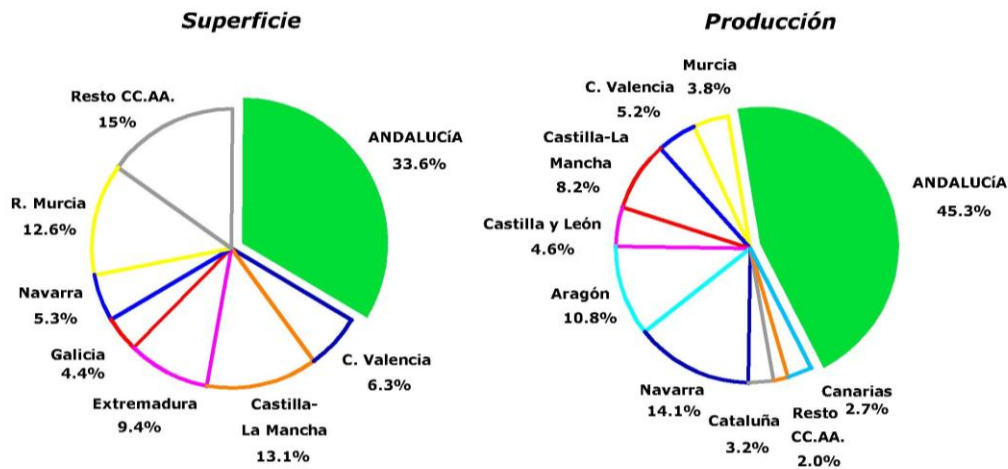
Es por tanto una tarea pendiente el iniciar el estudio del cultivo de nabizas y grelos para su incorporación como verdura fresca en otras zonas potenciales de gran tradición agrícola como es el sur de España.

1.2.3. Importancia de la horticultura y el consumo de hortalizas en Andalucía.

La horticultura es el principal subsector agrario en Andalucía, aportando más del 30% de la producción final agraria de la región y generando una importante industria auxiliar suministradora de servicios y productos necesarios para la agricultura y también para la transformación y comercialización. La superficie cultivada en Andalucía de hortalizas y flores en el 2014 fue de 1.743 ha en secano, 33.753 ha en regadío y 13.982 ha en invernadero, en total 49.478 ha de superficie dedicada a la horticultura en Andalucía (MAGRAMA, 2015).

El sector de las hortalizas ocupa una posición muy destacada dentro de la economía andaluza, tanto en lo que se refiere a la actividad agraria regional, como en su vertiente industrial y comercial. El valor de la producción de hortalizas, 2.688,87 millones de euros, en 2010, alcanza en torno a un tercio del montante en el que está valorado el total de la producción agrícola regional. Es el subsector agrícola de mayor relevancia dentro de la agricultura regional, por delante del valor generado por el sector de las frutas (2.242,46 millones de euros, en 2010) y del aceite de oliva (1.693,01 millones de euros), de acuerdo con las estimaciones de la Consejería de Agricultura Andaluza en 2010 (Figura 5).

Significación del cultivo de hortalizas en Andalucía sobre el conjunto de España, en producción y superficie
 (% sobre el total de la superficie cultivada y producción cosechada en España, en 2009)



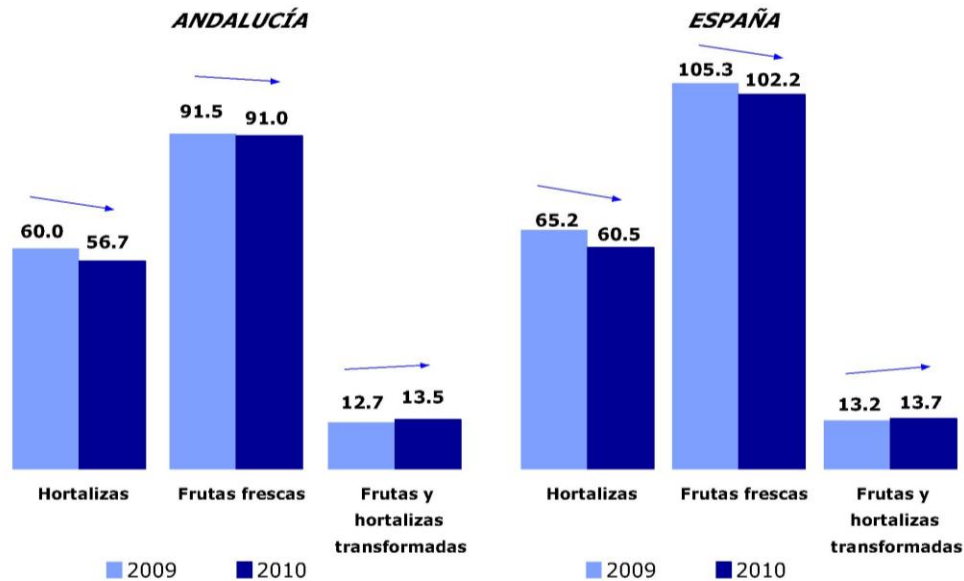
Fuente: *Analistas Económicos de Andalucía* a partir de la información del Anuario de Estadísticas del Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino, 2010.

Figura 5. Importancia del cultivo de hortalizas en Andalucía sobre el conjunto de España, en producción y superficie (% sobre el total de la superficie cultivada y producción cosechada, en 2009).

Los principales cultivos hortícolas en Andalucía serían el tomate, después el pimiento, el pepino, el calabacín, la berenjena y la judía verde. En la producción de estos seis cultivos hortícolas, Andalucía es líder dentro del conjunto nacional, destacándose como principal productora de pepino (con más del 90% de la producción española de este hortícola), que solo tiene una relativa presencia en Canarias, Murcia, Comunidad Valenciana y Cataluña. En el caso del calabacín y la berenjena, el peso de la producción andaluza ronda el 82%, mientras que en el tomate la producción regional ha descendido hasta el 35,2% del conjunto nacional.

De acuerdo con las estimaciones que realiza el Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (MAGRAMA) (Figura 6), a través de los últimos resultados publicados del Panel de Consumo Alimentario en 2010, en España, el consumo medio por personas en hortalizas resulta en 60,54 kilos de hortalizas frescas por persona y año, situándose el gasto en 100,4 euros; sin embargo, en Andalucía se consumen un promedio de 56,68 kilos, y suponen un gasto de 88,64 euros.

Consumo de hortalizas y frutas en Andalucía vs. España, 2009-2010
(Kilogramos por persona al año, en hogares)



Fuente: Analistas Económicos de Andalucía, a partir del Panel de Consumo Alimentario, Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino, 2010.

Figura 6. Consumo de hortalizas y frutas en Andalucía vs. España, 2009-2010 (Kilogramos por persona al año).

Estas estimaciones hacen ver la necesidad de reforzar las campañas sobre el consumo de hortalizas en Andalucía. Probablemente, el aspecto más destacado, además de que haya descendido en el último año y de que sea inferior al correspondiente a España, sea su importancia sobre el total del consumo y gasto alimentario. En este sentido, se estima que el consumo de hortalizas representa el 8,7% de la cantidad consumida de alimentos por los hogares andaluces (en el conjunto nacional es del 9,1%). Mientras, en términos de gasto significa el 6,7% del gasto realizado en alimentación en 2010 (en España es ligeramente superior del 6,9%). Después de la carne, el pescado y los derivados lácteos, las frutas y las hortalizas son los alimentos que mayor proporción del gasto en alimentación concentran, superando incluso al gasto en pan, que fue del 6,4% del total en alimentación en los hogares andaluces en 2010 (ADCA, 2013).

En el último informe anual del Consumo de Alimentación en España en el 2014, elaborado por el MAGRAMA, se indicó que el consumo de hortalizas y verduras frescas cayó en comparación al año 2013 (-3,4%). Por su parte, la tendencia en gasto, también se redujo en este periodo un 4,6%. En conclusión, se redujo el consumo per cápita de las hortalizas y verduras frescas en los hogares, con un consumo medio por

persona y año de 62,35 kilos, a pesar de ser ligeramente superior a los datos que disponemos del 2010.

1.2.3.1. Posibilidades de cultivo y consumo de nabizas y grelos

La Agencia de la Competencia de Andalucía (ADCA) en su informe elaborado: "Competencia y Cadena de valor en la producción y distribución hortícola en Andalucía" (2013), estableció seis líneas de actuación para impulsar el sector hortícola en Andalucía, una de esas líneas se refería a la promoción de la innovación e investigación en el sector:

«Estrechamente relacionado con los frutos de la innovación y la obtención de productos identificables de calidad (frente a la producción “genérica” tradicional), se debe fomentar la implantación de sistemas que incorporen valor añadido al producto, ya sea a través de la novedades (como las de IV y V gama), el uso más frecuente y claro de la trazabilidad, la promoción de hortalizas de producción integrada, así como los ecológicos, potenciando variedades o subproductos ligados a la salud, dietética, etc. Para que la calidad sea percibida por el resto de los agentes de la cadena, incluidos los consumidores, no son desdeñables las políticas de promoción del consumo de estos productos, tanto dentro como fuera de nuestras fronteras.»

En consecuencia, se deben fomentar aquellos productos hortícolas que tienen unos atributos de calidad adicional, derivados del estudio de nuevas variedades, introducción de nuevos cultivos y la incorporación de nuevas técnicas de producción que dan lugar a productos de calidad, que aportan un valor añadido y que satisfacen la demanda del consumidor.

En este sentido las nabizas y grelos serían buenos candidatos para su introducción en Andalucía y otros lugares de España, como cultivo novedoso, que proporciona verduras con propiedades nutracéuticas y organolépticamente más interesantes que otras especies de *Brassica*, como por ejemplo la coliflor, brócoli, coles de Bruselas, etc. que ven reducido su consumo principalmente en la población infantil por su fuerte y peculiar olor y sabor.

1.3. Calidad de nabizas y grelos

1.3.1. Características nutritivas de nabizas y grelos

Como ya se ha mencionado anteriormente, las nabizas y grelos, al igual que otros vegetales procedentes de especies hortícolas del género *Brassica* se caracterizan por su bajo contenido en grasa y proteína y su alto contenido en fibras, minerales, vitaminas y glucosinolatos. En la Tabla 2 se presenta la composición nutricional de grelos publicada en la Base de Datos Española de Composición de Alimentos (BEDCA, 2016).

Tabla 2. Tabla de composición de grelos de la Base de datos Española de Composición de alimentos:

Componente	Valor*
energía, total	48 (11) kJ (kcal)
grasa, total (lípidos totales)	0,2 g
agua (humedad)	93,1 g
proteína, total	2,7 g
fibra, dietética total	3,9 g
vitamina A (equivalentes de actividad de retinol y carotenoides)	1000 µg
vitamina E (equivalentes de alfa tocoferol de actividades de vitámeros E)	1 mg
folato, total	110 µg
riboflavina	0,2 mg
vitamina C	40 mg
niacina (equivalentes de niacina, totales)	0,9 mg
tiamina	0,06 mg
vitamina B6, Total	0,16 mg
hierro, total	3,1 mg
magnesio	10 mg
fósforo	35 mg
selenio, total	0,8 µg
calcio	98 mg
potasio	78 mg
sodio	7 mg
ioduro	2 µg
cinc	0,4 mg

* Información de composición (por 100 g de porción comestible).

1.3.1.1. Glucosinolatos, sus productos de degradación y propiedades

Los glucosinolatos son un grupo importante de fitoquímicos que se presentan exclusivamente en 15 familias botánicas del orden *Capparales* y, en particular, son muy abundantes en la familia *Brassicaceae*. Son productos del metabolismo secundario y, en función del aminoácido del que deriva, se pueden clasificar en alifáticos (derivados de la metionina), indólicos (derivados del triptófano) y aromáticos (derivados de la fenilalanina) (Fahey et al., 2001; Halkier et al., 2006). Aunque el papel de los

glucosinolatos en las plantas no está claro, su olor y sabor pronunciado sugiere que participan en la defensa contra herbívoros y la defensa microbiana de la planta.

Actualmente se han descrito unos 130 glucosinolatos distintos, que difieren en la cadena terminal R (Figura 7) (Agerbirk et al., 2012).

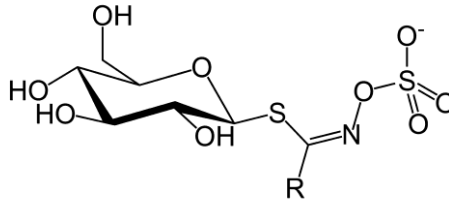


Figura 7. Estructura general de los glucosinolatos.

En la Tabla 3 se describen los principales glucosinolatos presentes en *Brassica rapa*.

Los glucosinolatos no son bioactivos hasta que hayan sido hidrolizados enzimáticamente por una enzima endógena llamada mirosinasa, que puede ser liberada por la ruptura de la célula de la planta a través de la recolección, procesamiento o la masticación. Entre estos productos de degradación se encuentran los isotiocyanatos que producen el efecto sensorial más destacado de los glucosinolatos, el gusto a picante (amostazado), lo que limita el consumo del producto que lo contiene (Carlson et al., 1987; Jones et al., 2002; Schonhof et al., 2004). Los glucosinolatos se descomponen además en tiocyanatos o nitrilos entre otros dependiendo del sustrato, del pH al que tiene lugar la hidrólisis, de la disponibilidad de iones ferrosos y de la estructura terminal R del glucosinolato en cuestión (Figura 8).

Los glucosinolatos alifáticos a pH 5-7 producen isotiocyanatos y oxazolidina 2-tiona, y a pH más ácidos, nitrilos y tiocyanatos (Rosa, 1999). Por su parte los indólicos se hidrolizan a isotiocyanatos inestables que dan lugar a indoles, por ejemplo al indol-3-carbinol (indol derivado de la glucobrassicina).

Tabla 3. Nombres y abreviaturas de los principales glucosinolatos de *Brassica rapa* (Padilla et al., 2007).

Nombre sistemático	Nombre común	Abreviatura
<i>Alifáticos</i>		
3-Butenil	Gluconapina	GNA
4-Pentenil	Glucobrasicanapina	GBN
2-(R)-2-Hidroxi-3-butenil	Progoitrina	PRO
2-(S)-2-Hidroxi-3-butenil	Epiprogoitrina	E-PRO
3-Metilsulfinilpropil	Glucoiberina	GIB
3-Metiltiopropil	Glucoiberiverina	GIV
4-Metilsulfinilbutil	Glucorafanina	GRA
5-Metilsulfinilpentil	Glucoalisina	GAL
2-Hidroxi-4-pentenil	Gluconapoleiferina	GNL
4-Metiltiobutil	Glucoerucina	GER
<i>Indólicos</i>		
3-Indolilmetil	Glucobrasicina	GBS
1-Metoxi-3-indolilmetil	Neoglucobrasicina	NGBS
4-Hidroxi-3-indolilmetil	4-Hydroxiglucobrasicina	4-OHGBS
4-Metoxi-3-indolilmetil	4-Methoxiglucobrasicina	4-OMGBS
<i>Aromáticos</i>		
2-Feniletil	Gluconasturtina	GST

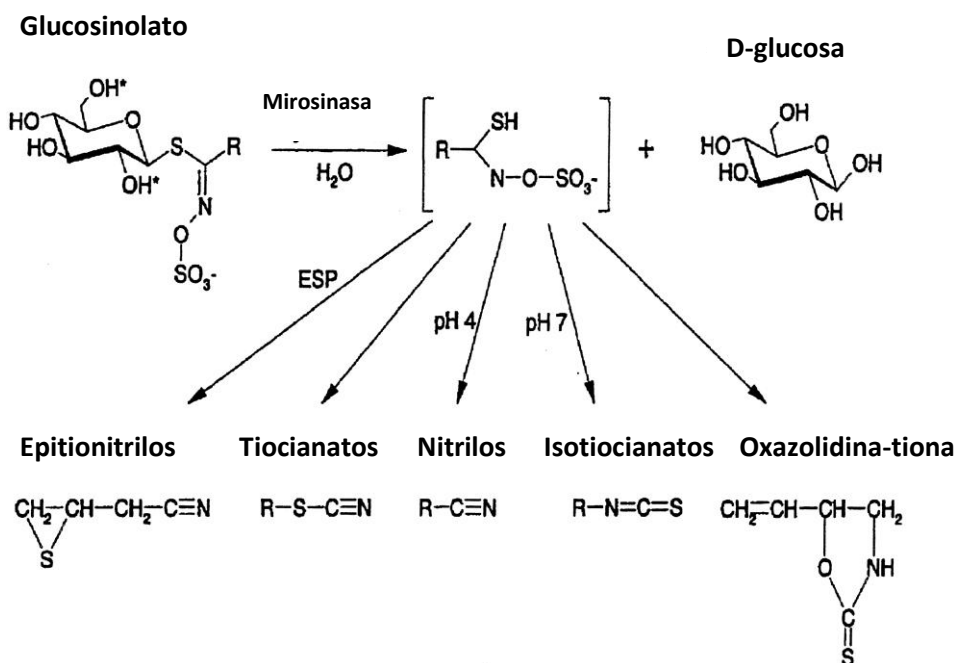


Figura 8. Estructura general de los glucosinolatos y sus productos después de la hidrólisis por la mirosinasa. R representa las cadenas laterales derivados del aminoácido.

Los mecanismos que explican la actividad anticarcinogénica de los productos de degradación de los glucosinolatos, relacionan a estos productos resultantes de la hidrólisis, con el aumento de la actividad de enzimas responsables de la detoxificación xenobiótica (Fases I y II), así como con la estimulación de la apoptosis y necrosis de células tumorales humanas (Mithen, 2001; Johnson et al., 2016). Se ha demostrado el efecto quimiopreventivo de especies de *Brassica* en ciertos tipos de tumores, por el cese del crecimiento del cultivo tumoral debido principalmente a esos isotiocianatos (Hwang et al., 2006; Juge et al., 2007; Singh et al., 2009; Keum et al., 2009; Traka et al., 2010; Jie et al., 2014; Øverby et al., 2015; Lozano-Baena et al., 2015).

También se ha comprobado que el consumo de cantidades bajas de isotiocianatos que contiene la mostaza (*Brassica juncea* y *Sinapis alba*) modula factores citoprotectores en las células mononucleares de la sangre. El hecho de que estas observaciones fueron confirmadas por dos biomarcadores citogenéticos para el riesgo de cáncer, implica que incluso el consumo a corto plazo de los isotiocianatos que contienen las verduras de *Brassica* podría estar asociado con la reducción del riesgo de padecer cáncer (Lamy et al., 2012).

En relación con el efecto del almacenamiento de alimentos que contienen glucosinolatos, se evaluó la fermentación de los glucosinolatos y productos de degradación en la col fresca y se concluyó que hay un máximo de compuestos beneficiosos para la salud después de la fermentación hasta 7 - 9 días. Esta observación podría indicar que hay un margen de tiempo en el consumo de estas verduras en fresco, sin que pierdan sus propiedades por la acción de la mirosinasa (Palani et al., 2015). Los estudios en nabicol y nabo recién cortado en atmósferas modificadas revelaron que las bajas temperaturas y tiempo de almacenamiento corto fueron los criterios más importantes para prevenir cambios de apariencia, olor, sabor y aromas, en el contenido de azúcar y glucosinolatos (Helland et al., 2016).

También existen glucosinolatos con efecto antinutritivo, habiéndose comprobado experimentalmente que el isotiocianato 5-vinyloxazolidina-2-tiona (derivado de la progoitrina), interfiere en la absorción del yodo en animales monogástricos, provocando la hipertrofia del tiroides. Hay que señalar que este efecto goitrogénico ha sido demostrado en la alimentación del ganado (Rosa, 1999), y no hay evidencias de que produzca el mismo efecto en la especie humana (Mithen, 2001) y por tanto no se ha

demostrado su relación con la enfermedad del bocio. Otros trabajos han demostrado que los nitrilos y epitionitrilos derivados de algunos glucosinolatos pueden ser hepatotóxicos, nefrotóxicos y pancreatotoxicos en ratas, y plantean la hipótesis que en el ganado, en condiciones específicas de bajo pH y presencia de iones ferrosos, pueden provocar daño en el hígado, sin embargo hasta la fecha no está demostrado y no hay evidencias tampoco en humanos (Collett et al., 2014).

El patrón y concentración de glucosinolatos de las hortalizas del género *Brassica* varía en gran medida según la especie, y de ello dependerá el perfil de productos de degradación (isotiocianatos entre otros) que proporcionan los efectos biológicos en el organismo. Por este motivo, es importante caracterizar el contenido de éstos compuestos bioactivos en cultivos nuevos o reintroducidos, con el fin de caracterizarlos como alimentos funcionales y beneficiosos para la salud y fomentar su consumo en la población.

Las nabizas y grelos contienen cantidades importantes de glucosinolatos que pertenecen a las tres clases químicas descritas anteriormente (Tabla 3). Los más abundantes son los alifáticos, destacando el alto contenido en gluconapina.

La gluconapina es el glucosinolato mayoritario de nabizas y grelos. El isotiocianato derivado de la gluconapina es el 3-butenil-isotiocianato, se caracteriza por estar formado por una cadena de carbono corta con un enlace saturado en el extremo. Entre sus efectos se ha demostrado que inhibe la liberación de histamina. Un estudio con wasabi reveló que cuando los pacientes con alergias consumen este producto, los isotiocianatos liberados producían la inhibición de la liberación de mediadores químicos, por lo que puede contribuir a la supresión de los síntomas de la alergia (Yamada et al., 2012). Recientemente se ha demostrado el poder quimiopreventivo del 3-butenil-isotiocianato obtenido por síntesis, el cual, es capaz de producir la muerte celular inducida principalmente a través de la necrosis de células tumorales (Kadir et al., 2015).

Otros isotiocianatos derivados de glucosinolatos presentes en nabizas y grelos son el fenetil-isotiocianato, derivado de la gluconasturtina, que induce la apoptosis de las células para inhibir la tumorigénesis (Mi et al., 2007) y el isotiocianato indol-3-carbinol, derivado de la glucobrasicina, que ha demostrado efectos antitumorales en varias líneas celulares de cáncer de pulmón, próstata y colon (Choi et al., 2010).

Un factor fundamental para establecer la dosis eficaz de consumo de glucosinolatos en seres humanos es el grado de actividad de la mirosinasa. Los diferentes procesos a los que se someten los alimentos, que implican la alteración de la temperatura, pH o la presión, influyen en la actividad de la mirosinasa una vez que la planta se ha cosechado (Martínez et al., 2015). Es probable que la mayoría de los procesos de cocinado de estas verduras desnaturalicen la mirosinasa de manera que los glucosinolatos son consumidos intactos, sin embargo se ha demostrado que después del consumo de verduras crucíferas cocidas pueden detectarse isotiocianatos en la orina. Entre un 10% y un 30 % de los isotiocianatos detectados habrían sido hidrolizados por la mirosinasa vegetal, el resto se debe a la microbiota del colon (Traka et al., 2009).

1.3.1.2. Componentes inorgánicos

En la especie humana los minerales llevan a cabo funciones esenciales, a pesar de que estos elementos se necesitan en pequeñas cantidades, tienen que ser aportados por la dieta (Mataix, 2005). Ningún alimento posee todos los minerales en cantidades tales que permita que la ingestión de uno o pocos alimentos satisfagan las necesidades del individuo. De ahí la insistencia en que las dietas sean mixtas y equilibradas para un correcto aporte de los distintos minerales.

La malnutrición mineral es un problema común en los países desarrollados y en desarrollo. Se estima que más del 60% de los 7 mil millones de personas en el mundo son deficientes en Fe, más del 30% son deficientes en Zn y el 15% son deficiente en Se. Además, las deficiencias de Ca, Mg y Cu son también comunes en varios países desarrollados y en desarrollo (White et al., 2009). Hoy en día, la desnutrición mineral es considerada como uno de los más importantes desafíos globales para la humanidad que se puede prevenir (Miller et al., 2013).

Los minerales ayudan al cuerpo a realizar numerosas funciones, de forma general, se puede decir que los minerales:

- a) Intervienen en la regulación enzimática de los procesos metabólicos, ya que cada uno de los minerales esenciales actúa como cofactor de uno o más sistemas enzimáticos.

- b) Contribuyen al mantenimiento de los líquidos corporales, intra y extracelulares, interviniendo en el equilibrio ácido-base y en su osmolaridad.
- c) Algunos minerales intervienen en la actividad de nervios y músculos permitiendo un funcionamiento adecuado de ambos.
- d) Facilitan el transporte a través de la membrana de compuestos esenciales, tales como azúcares.
- e) Algunos actúan como formadores de estructuras, como ocurre en huesos y dientes.

Desde el punto de vista nutricional, los minerales se clasifican de la siguiente manera (Moreno-Rojas, 2000):

Electrolitos

Los electrolitos son iones que entran en mayor proporción en la composición de los fluidos orgánicos, estando disueltos en ellos. Entre ellos podemos destacar:

- **Sodio:** El sodio es el principal catión de los fluidos extracelulares y el principal regulador del volumen de fluido extracelular. Es importante en la regulación de la osmolaridad, el balance ácido-base y el potencial de membrana de las células. Está relacionado también con el transporte activo a través de la membrana celular y puede ser expulsado en intercambio con el potasio para mantener un adecuado potencial en la membrana.
- **Potasio:** es el principal catión intracelular que se encuentra en los fluidos celulares en una concentración de 5,6 g/L, unas 30 veces más concentrado que en el plasma o en el líquido intersticial (0,15 a 2 g/L). Es de gran importancia fisiológica, contribuyendo a la transmisión del impulso nervioso, al control de la contractibilidad de la musculatura ósea y al mantenimiento de la presión sanguínea.

Minerales

Son aquellos componentes inorgánicos de los alimentos y de nuestro propio cuerpo que se encuentran en elevadas cantidades en ambos sistemas, pero que mayoritariamente no se encuentran disueltos en fluidos corporales.

- **Calcio:** el cuerpo del adulto contiene un 1,2 kg de calcio, el 99% del cual se encuentra en el esqueleto y el 1% restante se encuentra en los fluidos extracelulares, en estructuras intracelulares y en la membrana celular; este calcio no esquelético juega un papel fundamental en la conducción nerviosa, contracción muscular, coagulación sanguínea y permeabilidad de membrana. Es importante destacar que la presencia de algunos fitatos y oxalatos convierten el calcio en insoluble y ciertas fracciones de fibra pueden interferir en la absorción de calcio.
- **Magnesio:** estabiliza el ATP formando el complejo Mg-ATP⁺², es esencial para todos los procesos biosintéticos, glucólisis, formación de AMP cíclico, transporte energía-dependiente de membrana y transmisión del código genético. Se conocen más de 300 enzimas activadas por magnesio. El magnesio extracelular es esencial para el mantenimiento del potencial electrolítico de las membranas de nervios y músculos y para la transmisión neuromuscular.
- **Fósforo:** es un componente esencial en la fracción mineral del hueso, en el cual guarda una proporción 2:1 (Ca:P). Aproximadamente el 85% del fósforo del cuerpo de un individuo adulto se encuentra en el hueso. En los tejidos blandos se encuentra como ion soluble de fosfato: en lípidos, proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos en forma de puentes éster o anhidro; y en enzimas como modulador de su actividad. La energía para los procesos metabólicos deriva principalmente de los puentes fosfato de adenosín trifosfato (ATP), fosfato de creatina y compuestos similares.

Resulta de gran interés la relación (Ca/P), ya que tiene repercusiones directas sobre la osteoporosis, un exceso de P puede repercutir negativamente favoreciendo la desmineralización ósea y movilizándolo el Ca óseo. En este sentido los vegetales verdes contienen una proporción mayor de Ca que de P, en contraposición con otros productos de la dieta que contienen dos veces más P que Ca (huevos, cereales, nueces, judías secas, guisantes y lentejas).

Ca y P son los componentes minerales más abundantes del cuerpo con un papel fundamental como ya hemos indicado. Una baja ingesta en humanos se ha asociado con diversas enfermedades (por ejemplo, lesiones en la piel, caída del cabello, raquitismo, osteoporosis, enfermedades cardiovasculares y trastornos neuromusculares), que pueden

poner en peligro la calidad de vida y tener importantes costes económicos (Dayod et al., 2010; Gómez-Galera et al., 2010).

Elementos traza

También llamados oligoelementos, son constituyentes cuya concentración en animales y hombre suelen ser muy bajas siendo también habitualmente bajo el aporte periódico que se requiere de los mismos.

- **Hierro:** es indispensable para la vida de organismos superiores al formar parte del núcleo de la hemoglobina y mioglobina, que son proteínas de transporte y almacenamiento del oxígeno, además de formar parte de un gran número de enzimas principalmente oxidativas. Todo el hierro presente en los vegetales se encuentra en forma no hemo o inorgánica, que es menos absorbible que la forma hemo y su absorción dependerá de muchos factores.
- **Cobre:** actúa en el metabolismo orgánico como componente estructural de proteínas como la ceruloplasmina sanguínea, producida en el hígado y que ocasiona el paso de Fe (II) a Fe (III) en la formación de hemoglobina. Funciona también en la acción de enzimas relacionadas con reacciones de oxidación y catálisis, como el citocromo oxidasa, tiroxinas, aminooxidasas, uricasa, etc.
- **Cinc:** forma parte de unas 80 enzimas, interviniendo en el metabolismo de los ácidos nucleídos y proteínas; es esencial para plantas, animales y hombre.
- **Manganeso:** juega un importante papel en el metabolismo celular. Varias enzimas como descarboxilasas, hidroxilasas, quinasas y transferasas son activadas de forma no específica por el manganeso in vitro. Otras requieren el manganeso para su funcionamiento (piruvato carboxilasa, superóxido dismutasa, arginasa, fosfotransferasas, etc.)

Las especies hortícolas de *Brassica* son particularmente ricas en minerales potasio, cobre, magnesio, manganeso, hierro, cinc y calcio (Kopsell et al., 2004).

En la Tabla 1 se muestra la composición y concentración de minerales de nabizas y grelos publicada en Tablas de composición de Alimentos de la Base de Datos Española (BEDCA).

Finalmente hay que tener en cuenta que la biodisponibilidad de estos minerales por el hombre se ha convertido en un factor crítico, ya que la absorción de minerales de origen

vegetal suele ser baja. Esto parece ser debido a la presencia en la fibra del ácido fítico (hexafosfato de inositol) y compuestos fenólicos presentes en muchas hojas, que actuarían como inhibidores de la absorción de ciertos minerales como el Fe, Ca, Zn, Cu, P y Mg (Periago et al., 1997; Frossard et al., 2000). Ya que la presencia de fitato, podría disminuir la biodisponibilidad mineral debido a sus propiedades quelantes, en los últimos años los estudios se centran en evaluar esta biodisponibilidad en productos alimentarios. Se ha investigado la disponibilidad de minerales en productos de panadería, durante el efecto de la fermentación y la cocción. Este estudio demostró que la disponibilidad mineral in vitro de Ca, Fe y Zn de productos de panadería se ve influida por las etapas de procesamiento y los ingredientes (Frontela et al., 2011).

Respecto al contenido de minerales en verduras, los últimos estudios se centran en evaluar las diferencias entre los productos frescos y congelados, se estudiaron en varios productos hortofrutícolas el contenido en minerales, fenoles totales y fibra (Bouzari et al., 2015). En lo que respecta a las especies de *Brassica* la mayor parte de los estudios se centran en el brócoli, tratando de evaluar la interacción entre dos minerales, Se y Zn, en el desarrollo y germinación de la planta (Mao et al., 2015); o el estudio del efecto de la aplicación foliar de Se en la absorción de elementos esenciales como son el Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, P, S y Zn (Šindelářová et al., 2015).

1.3.1.3. Fibra

La fibra dietética, que es un componente habitual de los alimentos de origen vegetal, ha tomado un gran interés en el mundo de la nutrición desde la promulgación de la hipótesis de Burkit, en 1973, acerca de la estrecha relación entre la carencia de fibra de la dieta y la incidencia de determinadas enfermedades y trastornos fisiológicos, sobre todo en países industrializados (Moreno- Rojas, 2000).

El contenido de fibra en los vegetales es esencial para la digestibilidad del alimento; es reconocido que la ingesta de fibra proporciona muchos beneficios a la salud humana, contribuyendo a la prevención de cáncer de colon y a reducir el riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares, infarto cerebral, hipertensión, diabetes, obesidad y ciertos desórdenes gastrointestinales (Anderson et al., 2009).

Por fibra dietética se refiere al total de los polisacáridos de la planta, junto con la lignina, que son resistentes a la hidrólisis por enzimas digestivas del tracto gastrointestinal (Moreno- Rojas, 2000).

Desde el punto de vista químico, la fibra es un agregado de componentes que no constituyen una entidad propia, y que se confosma en un entramado tridimensional de celulosa, hemicelulosa y lignina, pero frecuentemente se le asocian minerales y otros componentes. En la mayoría de los sistemas de alimentación, la fibra se define con los siguientes parámetros (Van Soest et al., 1985):

- **Fibra bruta (FB):** Consiste en el residuo insoluble después de una incubación en una solución ácida, seguida por una alcalina. El residuo contiene celulosa, pero está contaminada con cantidades variables de hemicelulosa, lignina y compuestos nitrogenados. La magnitud de la contaminación de la FB depende mucho del tipo de vegetal y de su estado de desarrollo fisiológico, lo que conduce a errores que dificultan su interpretación, por lo que el uso de la FB en los sistemas actuales debe ser limitado (Van Soest, 1982).
- **Fibra neutro detergente (FND):** Es el material insoluble en una solución detergente neutra, y se compone de celulosa, hemicelulosa y lignina. Además, existen otros componentes minoritarios como residuos de almidón, cenizas y nitrógeno. Las recomendaciones de Van Soest et al. (1991) para la determinación de FND sugirieron la utilización de amilasas termoestables específicas (libres de actividad hemicelulasa, proteasa o glucanasa), especialmente en concentrados o ensilados de maíz.
- **Fibra ácido detergente (FAD):** Es el material insoluble en una solución detergente ácida, y está constituida fundamentalmente por celulosa y lignina, aunque suelen existir otros componentes minoritarios como nitrógeno y/o minerales.
- **Lignina ácido detergente (LAD):** mide el residuo remanente después de hidrólisis ácida; es el método más común para determinar lignina en nutrición de rumiantes, pero cada vez existe más evidencia de que el valor de la lignina es subestimado debido a la solubilización de algunas ligninas en el paso anterior de FAD.

La diferencia entre FND y FAD consiste fundamentalmente en la hemicelulosa. Con el método FAD se hidroliza la hemicelulosa, de ahí que la determinación de FAD esté más asociada a la degradabilidad y digestibilidad, mientras que el contenido de FND sólo está relacionado con la ingestión o con una fracción muy utilizable aún por el organismo (Van Soest et al., 1967). Se ha demostrado la alta correlación existente entre el contenido en FAD y la digestibilidad in vitro, pudiendo ser

considerado por lo tanto el contenido en FAD de un vegetal como un buen indicador de la digestibilidad y calidad del mismo (Hill et al., 1977; Soh et al. 1984; Van Soest et al., 1985).

Destacan trabajos recientes que han aplicado los métodos estándar de análisis de fibra aquí descritos (FND, FAD, LAD) para determinar y comparar las composiciones de harinas procedentes de diferentes especies y variedades de calabazas, utilizadas para suplementar dietas y reducir el colesterol (Černiauskiene et al., 2014). Otros estudios han analizado el componente fibroso (mediante la determinación de FAD y FND) para la predicción de la degradabilidad de estos componentes fibrosos en piensos en rumiantes (Du et al., 2016). En cuanto a *Brassica*, se evaluó el efecto del tratamiento térmico respecto al contenido de fibra dietética y sus fracciones, mediante el método de Van Soest, se determinó el contenido de FND, FAD y LAD y el contenido de hemicelulosa y celulosa se calculó a partir de la diferencia entre la FND y FAD (Komolka et al., 2012).

1.3.2. Características organolépticas de nabizas y grelos

La valoración sensorial es una función primaria del hombre que ya desde la infancia le lleva, consciente o inconscientemente, a aceptar o rechazar los alimentos de acuerdo con las sensaciones experimentadas al observarlos y/o ingerirlos (Costell et al., 1981).

La calidad sensorial adquiere cada vez más importancia en una sociedad que, al tener cubiertas las necesidades nutritivas básicas, el principal problema que se plantea es elegir entre una oferta muy amplia de productos.

En el control de calidad de los productos alimentarios es de gran importancia conseguir definir, mediante parámetros objetivos, estas sensaciones subjetivas que experimentan los consumidores y que condicionan la aceptación o rechazo del producto. Para que este análisis se pueda realizar con un grado importante de fiabilidad, es necesario objetivar y normalizar todos los términos y condiciones que puedan influir en estas determinaciones, siempre con el objetivo de que las conclusiones que se obtengan sean cuantificables y reproducibles con la mayor precisión posible (Sancho et al., 1999).

El análisis sensorial descriptivo es la herramienta más ampliamente utilizada entre todas las metodologías de las que disponen los profesionales sensoriales cuando se comparan con los métodos de aceptación y discriminación (Stone et al., 2004; Varela et al., 2012).

Según Stone y Sidel (2004), el análisis descriptivo es una metodología sensorial que proporciona descripciones cuantitativas de los productos basados en las percepciones de un grupo de sujetos cualificados. Todos los métodos de análisis descriptivo implican la detección (discriminación) y descripción de aspectos sensoriales tanto cualitativos como cuantitativos de un producto.

Es además conveniente establecer una relación entre la composición físico-química del producto y sus atributos organolépticos, como color, textura, aroma (componentes volátiles) y sabor (dulce, amargo, ácido, salado, umami) y también entre las percepciones sensoriales y la aceptabilidad final del consumidor.

La mayoría de los aromas típicos de alimentos son una mezcla de aromas simples producidos por moléculas individuales. En las hortalizas del género *Brassica* dichos compuestos se forman por descomposición de glucosinolatos (Belitz et al., 2004). Se producen compuestos volátiles de azufre obtenidos a través de diversas reacciones enzimáticas. Los productos de degradación de los glucosinolatos, en concreto, tiocianatos, isotiocianatos, oxazolidinas y nitrilos, son los responsables del peculiar aroma de estas especies y del sabor amargo atribuido a algunos cultivos como las nabizas y los grelos (Vilar et al, 2007; Liu et al., 2009).

Los ácidos orgánicos también son compuestos responsables del sabor más o menos ácido de las hortalizas (Belitz et al., 2004). Las hortalizas contienen, en términos generales, y con la excepción del tomate, una escasa proporción de ácidos que, en su mayoría están en forma de sales, lo que repercute en el pH, que oscila, aproximadamente, entre 5,5 y 7,0 (Primo, 1997).

Debido al gran interés económico de las plantas del género *Brassica*, son numerosos los trabajos sobre este género que incluyen evaluaciones sensoriales en sus trabajos. En brócoli se ha estudiado los efectos de la temperatura y el fotoperíodo sobre la calidad sensorial y el contenido de glucosinolatos, flavonoides y vitamina C (Mølmann et al., 2014). Recientemente se evaluó el perfil molecular y sensorial de la ebullición de un caldo de verduras (elaborado con nabo y otras especies) en el cual entre los compuestos volátiles descritos se encontraron los productos de degradación de los glucosinolatos (Mougin et al., 2015). En el estudio del efecto del almacenamiento de *B. napus* y *B. rapa* en atmósfera modificada se ha comprobado que el gusto y el sabor resultaron más influenciados por el tiempo y la temperatura que por la atmósfera, y el total de

glucosinolatos indólicos aumentaron con el tiempo y temperatura de almacenamiento. El sabor amargo se relacionó con contenidos de glucobrasicina y 4-metoxiglucobrasicina (Helland et al., 2016).

Respecto a *Brassica rapa*, cabe destacar el estudio realizado sobre la caracterización físico-químico y sensorial de nabizas y grelos procedentes de las dos zonas de mayor producción (Lugo y Santiago). En este trabajo se describieron los principales atributos organolépticos de estas verduras y se trató de seleccionar las características físico-químicas que permiten diferenciar muestras de nabizas y grelos de las dos zonas de producción y pronosticar el grupo de pertenencia de nuevas entradas de origen desconocido (Arias, 2009).

1.4. Técnicas espectroscópicas de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS).

Aunque Herschel descubrió la luz en la región del infrarrojo en el 1800, muchos espectroscopistas de la mitad del siglo pasado pensaban que carecía de interés analítico (McClure, 2004; Batten, 1998; Blanco et al., 2002). Hoy día, las técnicas espectroscópicas que utilizan la longitud de onda en la región del infrarrojo del espectro electromagnético (NIR) se están utilizando en la industria alimentaria para evaluar la composición y calidad de los alimentos. En la espectroscopía NIR los fotones de radiación infrarroja son absorbidos por los enlaces de una molécula pasando a niveles vibracionales superiores. Cada tipo de enlace absorbe radiación infrarroja a una frecuencia distinta, lo que permite determinar que tipo de grupos funcionales posee la molécula en estudio. La espectroscopía NIR permite la evaluación (análisis cualitativo y cuantitativo) de parámetros de calidad en materiales intactos de forma rápida y casi sin esfuerzo (Cozzolino, 2009).

Los espectros NIR de un material orgánico pueden informar de sus características composicionales, que en la matriz del alimento no se detecta fácilmente a no ser que se realice el análisis químico en laboratorio. A pesar de que la técnica tiene muchas ventajas, los espectros obtenidos no son selectivos, es decir, la información espectral es compleja, con la presencia de muchas bandas y efectos no deseados de dispersión de la luz. Esto requiere la construcción de modelos de calibración con el fin de extraer la información más relevante y que puedan ser aplicados posteriormente a otras muestras. La instrumentación y el desarrollo de algoritmos informáticos han hecho que la técnica sea mucho más potente y fácil de usar (Osborne et al., 1993; McClure, 2004), es decir,

la aplicación de técnicas quimiométricas como el análisis de componentes principales y la regresión por mínimos cuadrados parciales, son utilizados para la construcción de modelos de calibración que pueden predecir características composicionales en la muestra (Osborne et al., 1993; Williams, 2001; Roggo et al., 2007; Cozzolino et al., 2006).

Actualmente la tecnología NIR se ha convertido en una de las técnicas más estudiadas y desarrolladas para el control de calidad y análisis composicional de la muestra. Los métodos tradicionales de análisis de componentes en alimentos en el laboratorio son caros, lentos, necesitan mano de obra especializada para su aplicación y conllevan el manejo de reactivos peligrosos y agresivos con el medio ambiente. El análisis rápido y barato, sin necesidad de preparación de la muestra, representa una de las principales ventajas de la técnica NIRS frente a los análisis tradicionales de laboratorio, por lo que se está utilizando en una amplia gama de aplicaciones en varios campos, por ejemplo, para mediciones en tiempo real en línea en condiciones industriales (Porep et al., 2015), en la industria farmacéutica (Chavez et al., 2015), química (Foster et al., 2013; Feng et al., 2015), alimentaria, incluyendo frutas y verduras (Font et al., 2005; Martínez et al., 2014; Schmitt et al., 2014; Guo et al., 2016) y agrícola (Murray, 1986; Norris et al., 1976; Shenk et al., 1993; Cozzolino et al., 2003; Font et al., 2006; Dimov et al., 2012; Van Maarschalkerweerd et al., 2015).

1.5. Ensayos de citotoxicidad con células HL-60

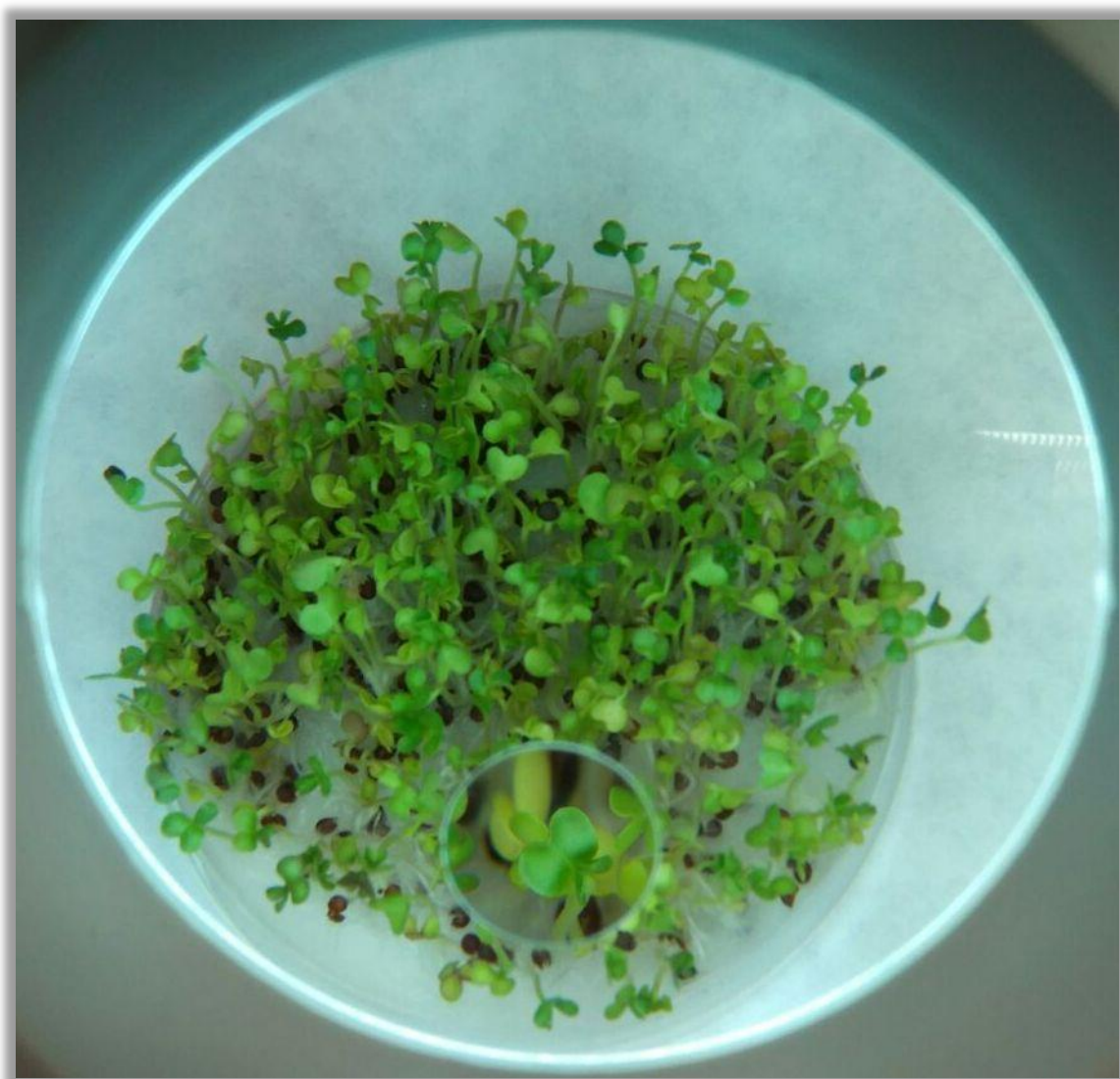
La utilización de cultivos celulares para el ensayo de características tóxicas de una sustancia química constituye una metodología asequible, rápida y evita el sacrificio de mamíferos.

La línea celular HL-60 ha sido seleccionada como un modelo en una gran variedad de sustancias candidatas para ser utilizadas como anticancerígenos y ha demostrado ser un sistema de prueba sólida para experimentos piloto de cribado *in vitro* (Akao et al., 2003). Fue aislada de leucocitos del torrente sanguíneo periférico de una paciente caucásica humana de 36 años de edad que padecía una leucemia promielocítica aguda (Collins et al., 1977). Estas células se caracterizan por proliferar continuamente en suspensión pero tras un largo periodo de cultivo (4 semanas), pierden su capacidad de división y se diferencian. Presentan aneuploidías y su metafase se caracteriza por la presencia de 44-46 cromosomas (Collins et al., 1977). En cultivo, se presentan en su

mayoría como neutrófilos promielocíticos de núcleo prominente (90%) y en menor porcentaje (10-12%) aparecen formas diferenciadas a mielocitos, metamielocitos y por último, granulocitos (neutrófilos, eosinófilos y basófilos) o macrófagos (monocitos) (Breitman et al., 1980; Collins et al., 1978; Yen et al., 1987).

No todos los compuestos que inducen la diferenciación del cultivo celular son de origen químico, también existen compuestos procedentes de plantas capaces de inducir la muerte en este tipo de células, estando algunas de estas plantas presentes en nuestra dieta (Chen et al., 2005; Matsui et al., 2005; Strissel et al., 2005). De esta forma, el estudio de la inducción de la diferenciación y apoptosis en células tumorales constituye una eficiente estrategia en la terapia contra el cáncer (Israels et al., 1999; Conte-Anazetti et al., 2003; Tsiftoglou et al., 2003).

La línea celular HL-60 se ha utilizado para ensayar las propiedades anticancerígenas de diversos grupos de isotiocianatos resultantes de la degradación de glucosinolatos, presentes en plantas del género *Brassica* (Xu et al., 2000; Jakubikova et al., 2005). Por ejemplo, recientemente, estudios *in vivo* e *in vitro* han demostrado el efecto protector en el ADN y quimiopreventivo de las partes verdes consumibles (hojas y peciolo) de la especie *B. carinata*, siendo los productos derivados de la hidrólisis de la sinigrina (el GSL mayoritario presente en esta especie) los responsables del efecto beneficioso para la salud (Lozano-Baena et al., 2015). Con el mismo fin de estudiar la actividad anticarcinogénica de los isotiocianatos derivados de los glucosinolatos, se han llevado a cabo otros estudios mediante ensayos *in vitro* de verduras de este género utilizando otros tipos celulares para evaluar el efecto quimiopreventivo frente a diferentes tipos de cáncer (Hwang et al., 2006; Juge et al., 2007; Singh et al., 2009; Keum et al., 2009; Traka et al., 2010; Villatoro-Pulido et al., 2012; Jie et al., 2014; Øverby et al., 2015; Kadir et al., 2015).



Capítulo II

**Hipótesis del plan
de investigación**

Objetivos

Capítulo II

Hipótesis del plan de investigación

Nuestra situación actual responde a lo que se conoce como el "trilema de la salud", que nos dice que la alimentación, la salud y el medio ambiente están íntimamente vinculados, siendo necesario establecer un equilibrio entre los mismos. Actualmente se observa una gran transformación de la dieta en todos los países en vías de desarrollo, de modo que la población que gana más dinero se traslada a las ciudades, y tiende a comprar y a consumir alimentos más caros como las carnes y alimentos procesados, al mismo tiempo que reduce el consumo de frutas y verduras. La producción de toda la comida necesaria para este tipo de dietas supone un aumento de las emisiones de gases de efecto invernadero, y tiene un impacto negativo sobre el medio ambiente y la salud humana (calentamiento global, aumento de los casos de diabetes, enfermedades del corazón y cánceres en todo el mundo). La solución va a venir tanto de la educación en cuanto a lo que es mejor para nosotros, como de la promoción de los alimentos que sean sabrosos, saludables y respeten el medio ambiente.

En España, y en Andalucía en particular, desde instituciones públicas y privadas, se viene realizando en los últimos años una apuesta clara y decidida en investigación dirigida a incrementar el consumo y el valor añadido de los productos hortofrutícolas producidos en nuestro país, como lo indica la Agencia de la Competencia de Andalucía (ADCA) en su informe elaborado en 2013.

En la actualidad son incuestionables las oportunidades multidireccionales de explotación de las propiedades químicas y nutricionales de verduras de la familia *Brassicaceae*. La composición química específica del género *Brassica*, en lo que respecta a los nutrientes los hace especialmente adecuado para la cadena de producción de alimentos saludables. Destaca el gran interés que se ha generado en la relación entre el contenido en glucosinolatos presentes en estas especies y la disminución de la incidencia de determinados tipos de cáncer en humanos. Sin embargo la gama de actividades de estos compuestos es muy amplia, algunos glucosinolatos son beneficiosos mientras que otros son perjudiciales para el consumo humano y animal. Como consecuencia, el cultivo y consumo de especies de *Brassica* en Europa está

umentando, dando lugar a una gran diversificación con la reintroducción de nuevas variedades, formas y productos locales.

Esta tesis ha sido desarrollada gracias a nuestra participación en los proyectos de investigación **“Calidad y resistencia a estreses bióticos en los cultivos de Brasicas: Papel de los metabolitos secundarios”** (Ref. AGL2009-09922), y **“Genética y mejora de brásicas hortícolas: papel de los metabolitos secundarios”** (Ref. AGL2012-35539), en colaboración con la Misión Biológica de Galicia, donde, como uno de los objetivos planteados en dichos proyectos, se llevó a cabo un programa de cultivo y evaluación de *Brassica rapa*, con el fin de estudiar su adaptación en la cuenca mediterránea y ampliar su área de cultivo y de consumo habitual. Las nabizas y grelos (*Brassica rapa* L. subsp. *rapa*) gozan de gran tradición en Galicia y tienen una gran importancia en la agricultura, no sólo del norte de España sino también en otros países de la Unión Europea como Italia o Portugal. En España este cultivo está limitado a la zona del norte debido, probablemente, a una falta de adaptación a las condiciones climáticas de áreas del sur. En la dieta mediterránea, basada en un elevado consumo de frutas y hortalizas, estos cultivos podrían ocupar un lugar destacado, pero hasta la fecha existe un gran desconocimiento de las posibilidades que pueden ofrecer los grelos y nabizas en estas zonas.

En el trabajo de tesis se ha evaluado una colección de germoplasma y cultivares de *Brassica rapa* recolectado en Galicia, seleccionando posteriormente aquellas líneas que mostraron mejores características agronómicas para el cultivo de *Brassica rapa* en la zona del sur de España. Durante todo el proceso de evaluación y selección se procedió al estudio de la capacidad de producción de nabizas y grelos así como del contenido en glucosinolatos, minerales y fibra de los productos cosechados como criterio de calidad del producto final.

Teniendo en cuenta la capacidad demostrada de la reflectancia en el infrarrojo cercano para el análisis rápido y preciso de componentes de calidad en matrices vegetales, de forma paralela con el trabajo anterior, se han desarrollado y evaluado por primera vez ecuaciones de calibración NIRS para el análisis del contenido en glucosinolatos, minerales y fibra ácido detergente en muestras de nabizas y de grelos. El uso de la técnica NIRS junto con las ecuaciones de calibración obtenidas facilitará y abaratará las tareas de cribado, caracterización y selección de genotipos, necesarios en los programas

de mejora genética de esta especie, y también podrán ser utilizadas en los trabajos de control de la calidad nutritiva de los productos obtenidos.

Finalmente se ha estudiado por primera vez el efecto anticarcinogénico y citotóxico (frente a células HL-60) del glucosinolato mayoritario de las nabizas y grelos, así como de su correspondiente isotiocianato, con vistas a proporcionar un mayor valor a estos productos y estimular su cultivo y su consumo.

En resumen, el presente trabajo de investigación tiene por finalidad aumentar el conocimiento del cultivo de *Brassica rapa* para su adaptación en la región mediterránea, conocer fechas de siembra adecuadas a la zona y la calidad nutritiva del producto obtenido; esto permitirá, la introducción de nuevos cultivos en la zona del sur de España, y sin duda, aumentar la diversificación de productos hortícolas que impulsen el consumo de verdura fresca en la población Andaluza. Con todas estas premisas, será de gran interés el potenciar este cultivo en otras áreas de España distintas a su zona típica de producción y llevar a cabo evaluaciones del material destinadas a mejorar la adaptación de variedades de *Brassica rapa* a la zona mediterránea.

Objetivos

La actividad científica desarrollada en la presente tesis doctoral trata de alcanzar los siguientes objetivos:

Objetivo 1: Evaluación del cultivo de *Brassica rapa* en localidades del sur de España (Córdoba y La Macaronesia) con vistas al estudio de la capacidad de producción de nabizas y grelos así como establecer una fecha óptima de siembra, en función de la producción de la cosecha (nabizas y grelos) y de su calidad nutricional (contenido en glucosinolatos y minerales).

Objetivo 2: Selección y caracterización agronómica de las variedades más prometedoras de nabizas y grelos en Córdoba (procedentes del Banco de Germoplasma de *Brassica* de la Misión Biológica de Galicia) y su evaluación respecto al contenido de glucosinolatos, minerales, fibra y análisis sensorial.

Objetivo 3: Desarrollo y evaluación de ecuaciones de calibración para el análisis rápido del contenido en minerales, glucosinolatos y fibra de las partes comestibles de *Brassica rapa* mediante el uso de la Reflectancia en el Infrarrojo Cercano (NIRS).

Objetivo 4: Evaluación de las propiedades quimiopreventivas y anticancerígenas de *Brassica rapa*: Estudio *in vitro* de la actividad citotóxica de las nabizas, del glucosinolato mayoritario intacto (gluconapina) y de sus productos de hidrólisis.



Capítulo III

**Ensayos
preliminares del
cultivo de *Brassica
rapa* en Andalucía y
La Macaronesia.**

Artículo en preparación

Obregón-Cano, S., Moreno-Rojas, R., Padilla, G., Cartea, E y De Haro-Bailón, A.

Capítulo III

Ensayos preliminares del cultivo de *Brassica rapa* en Andalucía y La Macaronesia.

Obregón-Cano, S.^a, Moreno-Rojas, R.^b Padilla, G.^c, Cartea, E.^c, y De Haro-Bailón, A.^a

^a Departamento de Mejora Genética, Instituto de Agricultura Sostenible, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Alameda del Obispo s/n, C.P. 14004. Córdoba, España.

^b Departamento de Bromatología, Universidad de Córdoba, Campus Universitario Rabanales. Carretera Nacional IV Km. 396. C.P. 14014. Córdoba, España.

^c Departamento de Genética de Plantas, Misión Biológica de Galicia, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Apartado 28, 36080 Pontevedra, España.

Introducción

Al papel clásico que le atribuía a los alimentos la nutrición de meros aportadores de sustancias imprescindibles para la vida, actualmente ha evolucionado hacia el estudio de ciertos componentes de los alimentos, que si bien no tienen por qué ser esenciales, pueden aportar efectos beneficiosos para la salud por su consumo a partir de ciertos alimentos a los que se les denomina “funcionales”. Los productos de origen vegetal son una fuente rica de sustancias biológicamente activas, tanto nutritivas como anti-nutritivas. Estos fitoquímicos y metabolitos secundarios están asociados con funciones biológicas tales como la prevención del estrés oxidativo, la regulación del sistema inmunológico, la inhibición de mutaciones cancerígenas y la reducción del riesgo de cáncer (Mi et al., 2007; Traka et al. 2009; Choi et al., 2010; Kestwal et al., 2011; Yamada et al., 2012).

Brassica es el grupo más grande de plantas de consumidas de la familia de las *Brassicaceas*. Además, las verduras de *Brassica* son muy apreciadas por sus valores nutricionales, ya que pueden proporcionar fitoquímicos que promueven la salud, incluyendo los glucosinolatos, antocianinas, flavonoides, terpenos, sulfóxido de S-metilcisteína, cumarinas y algunos antioxidantes bien conocidos como vitamina C, vitamina E, carotenoides y enzimas antioxidantes como catalasa, superóxido dismutasa y peroxidasa (Cartea et al., 2010; Manchali et al, 2012). Estos alimentos, al igual que

los procedentes de otras especies hortícolas de *Brassicaceas* se caracterizan por su bajo contenido en grasa y proteína y su alto contenido en fibras, minerales y vitaminas. Son particularmente ricas en minerales como potasio, cobre, magnesio, manganeso, hierro, cinc y calcio (Kopsell et al., 2004).

Brassica rapa ha sido cultivada en nuestro país desde tiempos ancestrales ya que fue uno de los primeros vegetales en ser introducidos en la península ibérica occidental (Gómez-Campo, 1999). Los cultivos de *B. rapa* son hortalizas de climas frescos, pero no soportan heladas repetidas (Rosa, 1999). Las temperaturas elevadas provocan una floración precoz a costa del desarrollo (Mainardi, 1995). El mismo efecto puede producirlo las bajas temperaturas, por lo que se necesita un emplazamiento abrigado durante el invierno en zonas muy frías (Maroto, 1995). Los mejores resultados se obtienen en las regiones templado-frías y en lugares no demasiado soleados.

En Galicia (noroeste de España) y en las regiones más frías de Portugal, se cultiva *Brassica rapa* subsp. *rapa* por sus tres aprovechamientos: nabos, nabizas y grelos. Los nabos son las raíces engrosadas, nabizas son las hojas jóvenes y los grelos son los tallos con brotes florales y hojas circundantes.

Teniendo en cuenta el creciente interés por este cultivo, y con vistas a su extensión a otras regiones de la península ibérica, se desarrolló el estudio del cultivo de nabizas y grelos en el sur de España, gracias a nuestra participación en los proyectos de investigación: **“Calidad y resistencia a estreses bióticos en los cultivos de Brasicas: Papel de los metabolitos secundarios”** (Ref. AGL2009-09922), y **“Genética y mejora de brásicas hortícolas: papel de los metabolitos secundarios”** (Ref. AGL2012-35539), en colaboración con la Misión Biológica de Galicia. Como uno de los objetivos de dichos proyectos se planteó un programa de cultivo y evaluación de germoplasma de *Brassica rapa* con el fin de estudiar su adaptación en la cuenca mediterránea y así ampliar su área de consumo habitual. Se determinó el contenido en glucosinolatos y minerales como factores de calidad, estudiando su importancia en la dieta por sus propiedades anticancerígenas y nutritivas.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la fecha óptima de siembra del cultivo en las nuevas localidades, en función de la producción de la cosecha (nabizas y grelos) y de su calidad nutricional (contenido en glucosinolatos y componentes inorgánicos).

Material y Métodos

Material vegetal

A partir de la colección existente en el Banco de Germoplasma de la Misión Biológica de Galicia, se seleccionaron 5 entradas de *Brassica rapa* (Tabla 1), en función del ciclo fenológico (tempranas y tardías) en su lugar de origen, para abarcar el mayor período potencial de producción de nabizas y grelos. Cuatro entradas procedían de cultivares locales sin ningún tipo de selección previa, mientras que la entrada BRS0163 procedía de tres ciclos de selección por rendimiento en fresco en Pontevedra. Cada entrada se identificó con las siglas BRS seguido del número de identificación en el Banco de Germoplasma de procedencia.

Tabla 1. Identificación y procedencia de entradas de *Brassica rapa* estudiadas en Pontevedra, La Palma y Córdoba.

ESPECIE	NOMBRE LOCAL	PROVINCIA	LOCALIDAD	IDENTIFICACIÓN
B. rapa	nabizas tempranas	Pontevedra	Vilar, Forcarey	BRS0082
B. rapa	nabizas tempranas	A Coruña	Lama, Boqueixón	BRS0143
B. rapa	nabizas	Ourense	Barcia, Melón	BRS0163
B. rapa	nabos	A Coruña	San Xiao, Coirós	BRS0401
B. rapa	nabos	A Coruña	Porta, Sobrado	BRS0472

Estas 5 entradas se evaluaron durante las temporadas agrícolas 2009-2010, 2010-2011 y 2011-2012 en tres localidades, Pontevedra (Galicia) (42°24'N, 8° 38'W, España), La Palma (Islas Canarias) (28°37'N, 17°45'W, España) y Córdoba (Andalucía) (37°51' N, 4°48'W, España). Pontevedra tiene un clima oceánico templado lluvioso. Las temperaturas son agradables a lo largo de todo el año con medias anuales de 15°C, y se registran amplitudes térmicas muy reducidas debido a la influencia marítima. Los meses de más calor son los de junio, julio y agosto, con medias de 19 y 20°C. La Palma tiene una temperatura media de 20°C, no sobrepasa los 26°C y no baja de 16°C, la isla de La Palma se caracteriza por gozar de un clima benigno con pocas variaciones durante todo el año. El clima en Córdoba es típico mediterráneo con una precipitación media de 650 mm, y el suelo es profundo, franco-arenoso, clasificado como Typic Xerofluent, los inviernos son suaves, aunque con algunas heladas que en ocasiones han llegado a ser fuertes, debido a su distancia del mar. Los veranos son muy calurosos, con importantes oscilaciones térmicas diarias.

Las semillas se germinaron en placas de petri en laboratorio y se trasplantaron a maceta a los 3-4 días. Cuando las plantas alcanzaron unos 10 cm de altura en maceta se trasplantaron a campo. Se programaron tres fechas de siembra en cada temporada, con el fin de averiguar la fecha de siembra óptima para el cultivo en esta zona. Las 5 entradas se cultivaron en un diseño de bloques al azar con 3 repeticiones. En la Tabla 2 se indican las fechas de siembra del cultivo en cada temporada y por localidades. En Pontevedra sólo se realizó una fecha de siembra, la habitual en esta región, sirviendo de control del resto de cultivos en las otras localidades. El estudio en La Palma sólo se llevó a cabo la primera temporada 2009/10. En Córdoba el ensayo se realizó durante tres temporadas, desde 2009 al 2012.

Tabla 2. Fechas de germinación de semilla y trasplante a campo de *B. rapa* en cada localidad por temporada y siembra.

Localidad	Temporada	Siembra	Germinación de semillas	Trasplante a campo
Pontevedra	2009/10	Siembra 1	18-08-09	24-09-09
		Siembra 2	03-11-09	02-12-09
La Palma	2009/10	Siembra 2	02-12-09	20-01-10
		Siembra 3	24-02-10	24-03-10
		Siembra 1	17-12-09	17-01-10
	2009/10	Siembra 2	17-01-10	15-03-10
		Siembra 3	10-03-10	20-04-10
		Siembra 1	22-07-10	23-09-10
Córdoba	2010/11	Siembra 2	01-10-10	29-10-10
		Siembra 3	08-11-10	10-01-11
		Siembra 1	05-09-11	05-10-11
	2011/12	Siembra 2	17-10-11	14-11-11
		Siembra 3	10-11-11	15-01-12

Preparación de las muestras

Durante cada temporada, en el momento óptimo para consumo, se tomaron muestras de nabizas (4 a 5 hojas por planta) y de grelos (3 a 4 tallos florales por planta) de las plantas seleccionadas para cada una de las entradas estudiadas. Todo el material vegetal se lavó a fondo con agua del grifo para eliminar la suciedad y el polvo de la superficie y se finalizó con un lavado en agua desionizada. A continuación se almacenaron a -80°C hasta el momento de su liofilización, que se realizó en un equipo Telstar® modelo Cryodos-50 (Telstar, Terrasa, España). Las muestras liofilizadas se molieron en un

molino IKA-Labortechnik® modelo A10, durante 20 segundos y se almacenaron en desecador hasta el momento de ser analizadas por el método de referencia.

Análisis de glucosinolatos

El análisis de glucosinolatos se realizó como indica la norma europea para determinación de glucosinolatos (ISO 9167-1, 1992). Se realizó una doble extracción en baño a 75°C con metanol al 70%, durante 15 min. En la primera extracción se añadieron 100µl de glucotropaolina como patrón interno. A continuación se realizó una desulfatación, el producto extraído se pasó por una columna de intercambio iónico de Sephadex (DEAE-A25, Sigma) añadiendo posteriormente sulfatasa purificada (de *Helix pomatia*, Sigma) y se dejó actuar 18-19 horas. Transcurrido ese tiempo, se eluyeron los glucosinolatos retenidos en la columna añadiendo H₂O ultrapura. El contenido y cuantificación de glucosinolatos se realizó mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), usando un equipo Waters, modelo 600, con un detector de absorbancia (modelo 486 UV) a una longitud de onda de 229 nm. La columna fue del tipo Lichrocart 125-4 con lichrospher 100 RP-18 y un tamaño de partícula de 5 µm (Merck). Se usaron como solventes H₂O ultrapura y acetonitrilo al 25%. La identificación de los distintos glucosinolatos fue establecida por comparación con patrones de referencia certificados y recomendados por la Unión Europea e ISO (CRMs 366, 190 y 367) (Wathelet et al., 1991). La cuantificación de cada glucosinolato individual fue calculada por el programa informático del equipo de HPLC (Millenium32), atendiendo al área del patrón interno. El total de glucosinolatos fue calculado como la suma de todos los glucosinolatos individuales presentes en la muestra.

Análisis de componentes inorgánicos

Los minerales analizados en las muestras de nabizas y grelos fueron K, Ca, P, Mg, Na, Fe, Zn, Mn y Cu. La digestión de la muestra se realizó por vía húmeda con ácido nítrico y ácido perclórico (Isaac et al., 1990). Los análisis de Ca, Mg, Fe, Mn, Zn y Cu se llevaron a cabo por espectrofotometría de absorción atómica y los de Na y K se hicieron por emisión atómica. El equipo utilizado fue un espectrofotómetro de absorción atómica Varian® modelo SpectrAA-50/55, con llama de aire-acetileno y lámparas de cátodo hueco de un solo elemento y corrección de fondo con lámpara de deuterio para el análisis de Mn. Para la determinación de Ca y Mg, se añadió cloruro de lantano a fin de

evitar interferencias aniónicas. El análisis de P, como ácido molibdo-vanado-fosfórico, se hizo por colorimetría (AOAC, 1991) en un espectrofotómetro UV-visible (Beckman® modelo DU640).

Análisis estadístico

Se utilizó el análisis de la varianza (ANOVA) para evaluar estadísticamente las diferencias entre las medias obtenidas para los diferentes parámetros de calidad analizados. El valor de $p < 0,05$ fue considerado como significativo. Los resultados se expresaron como medias. Se utilizó el software estadístico SPSS versión 21.0 (SPSS Inc., Chicago, IL).

Resultados y discusión

Las localidades donde se llevaron a cabo los ensayos, Córdoba y La Palma, son lugares de muy diferentes condiciones ambientales y agronómicas respecto a Pontevedra. Las cinco entradas seleccionadas fueron cultivadas en Pontevedra en las condiciones tradicionales de la zona para servir de control del cultivo. Los resultados en la composición de glucosinolatos y minerales de la cosecha de Pontevedra sirvieron de referencia para comparar con el material obtenido en las demás localidades.

En la Tabla 3 se presenta un resumen de las principales fechas de cultivo en las distintas localidades de nabizas y grelos. En Pontevedra, el trasplante en campo se realizó en septiembre, la cosecha de nabizas se llevo a cabo en diciembre y los grelos fueron recogidos a lo largo de varios meses, de diciembre a abril.

En la Palma, la primera siembra se realizó en diciembre, la segunda en enero y la tercera en marzo. No se encontraron grandes diferencias en el desarrollo de las plantas a lo largo de las tres siembras, posiblemente debido a que el clima en La Macaronesia está caracterizado por temperaturas moderadas, masas de aire templadas y tropicales durante todo el año. Las dos primeras siembras (diciembre y enero) dieron lugar a la formación de nabizas y grelos en todas las entradas ensayadas, sin embargo no se obtuvieron grelos en la tercera siembra (marzo), esto fue debido a que la fecha de la tercera siembra se realizó en primavera lo que determinó que las plantas rápidamente subieran a flor y no formaran grelos (Figura 1).

Tabla 3. Resumen de fechas de siembra y fechas de cosechas de nabizas y grelos por localidades, temporadas y siembras.

Localidad	Temporada	Siembra	Trasplante a campo	Cosecha nabizas	Cosecha grelos
Pontevedra (Control)	2009/10	Siembra 1	24-09-09	Dic-2009	Dic-2009 a Abril 2010
		Siembra 1	02-12-09	28-01-10	23-02-10 a 07-04-10
La Palma	2009/10	Siembra 2	20-01-10	24-03-10	24-03-10 a 20-05-10
		Siembra 3	24-03-10	29-04-10	NO
		Siembra 1	17-01-10	12-04-10	NO
Córdoba	2009/10	Siembra 2	15-03-10	NO	NO
		Siembra 3	20-04-10	07-06-10	NO
		Siembra 1	23-09-10	13-12-10	25-01-10
	2010/11	Siembra 2	29-10-10	04-03-11	11-03-11
		Siembra 3	10-01-11	NO	NO
		2011/12	Siembra 1	05-10-11	14-11-11
Siembra 2	14-11-11		01-02-12	21-02-12	
Siembra 3	15-01-12		NO	NO	



Figura 1. Planta en floración temprana

En Córdoba los resultados del estudio del cultivo durante la primera temporada se diferencian notablemente respecto de las dos siguientes. En la primera siembra de la primera temporada, la cosecha de nabizas fue muy escasa y no se consiguió producción de grelos, esto se debió al pobre desarrollo que alcanzaron las plantas, la fecha de siembra fue muy tardía para las condiciones ambientales de Córdoba. La segunda siembra se perdió debido a las desfavorables condiciones climáticas de ese año elevadas precipitaciones que provocaron el encharcamiento y anegación de la parcela y, por consiguiente, la asfixia radicular y la muerte de las plantas. En la tercera siembra (abril) el desarrollo de las plantas fue superior al obtenido hasta el momento en la fase de

nabizas, no obstante estas plantas no llegaron a formar grelos debido al aumento de la temperatura en primavera que determinó que subieran a flor rápidamente (Figura 1). A pesar de que sólo se cosecharon nabizas, el cultivo en campo evolucionó satisfactoriamente de manera semejante al cultivo sembrado en Pontevedra. A la vista de los resultados obtenidos en la primera temporada, se decidió adelantar todas las fechas de siembra en las siguientes temporadas con el fin de obtener mejores resultados de producción. La primera siembra se adelantó al mes de septiembre, la segunda se realizó en noviembre y la tercera en enero. En las dos temporadas siguientes el cambio de fechas favoreció notablemente la adaptación del cultivo en Córdoba, se mejoró el desarrollo de las plantas en campo, y en condiciones agronómicas óptimas para la planta, se consiguió mejorar la producción de nabizas y grelos en todas las entradas.

Glucosinolatos

Se determinó el contenido en glucosinolatos de todas las muestras recogidas en Pontevedra, La Palma y en las tres temporadas de cultivo en Córdoba. Los resultados de los análisis de glucosinolatos se encuentran recogidos en Tablas en el ANEXO I (página 214):

Glucosinolatos en Pontevedra (control): Temporada 2009/10: nabizas (Tabla III.1) y grelos (Tabla III.2).

Glucosinolatos en La Palma: Temporada 2009/10: nabizas (Tabla III.3) y grelos (Tabla III.4).

Glucosinolatos en Córdoba: Temporada 2009/10: nabizas (Tabla III.5), Temporada 2010/11: nabizas (Tabla III.6) y grelos (Tabla III.7), Temporada 2011/12: nabizas (Tabla III.8) y grelos (Tabla III.9).

En la Figura 2 se muestra un resumen del contenido de glucosinolatos individuales de las muestras de Pontevedra, La Palma y Córdoba. En cada barra de la gráfica se representa el valor medio de gluconapina (GNA), por ser el glucosinolato mayoritario en *Brassica rapa*, el valor medio de progoitrina (PRO), por ser un glucosinolato de interés por su posible efecto antinutricional y el valor del resto de glucosinolatos (RESTO) que dan lugar al contenido total de glucosinolatos de la parte comestible.

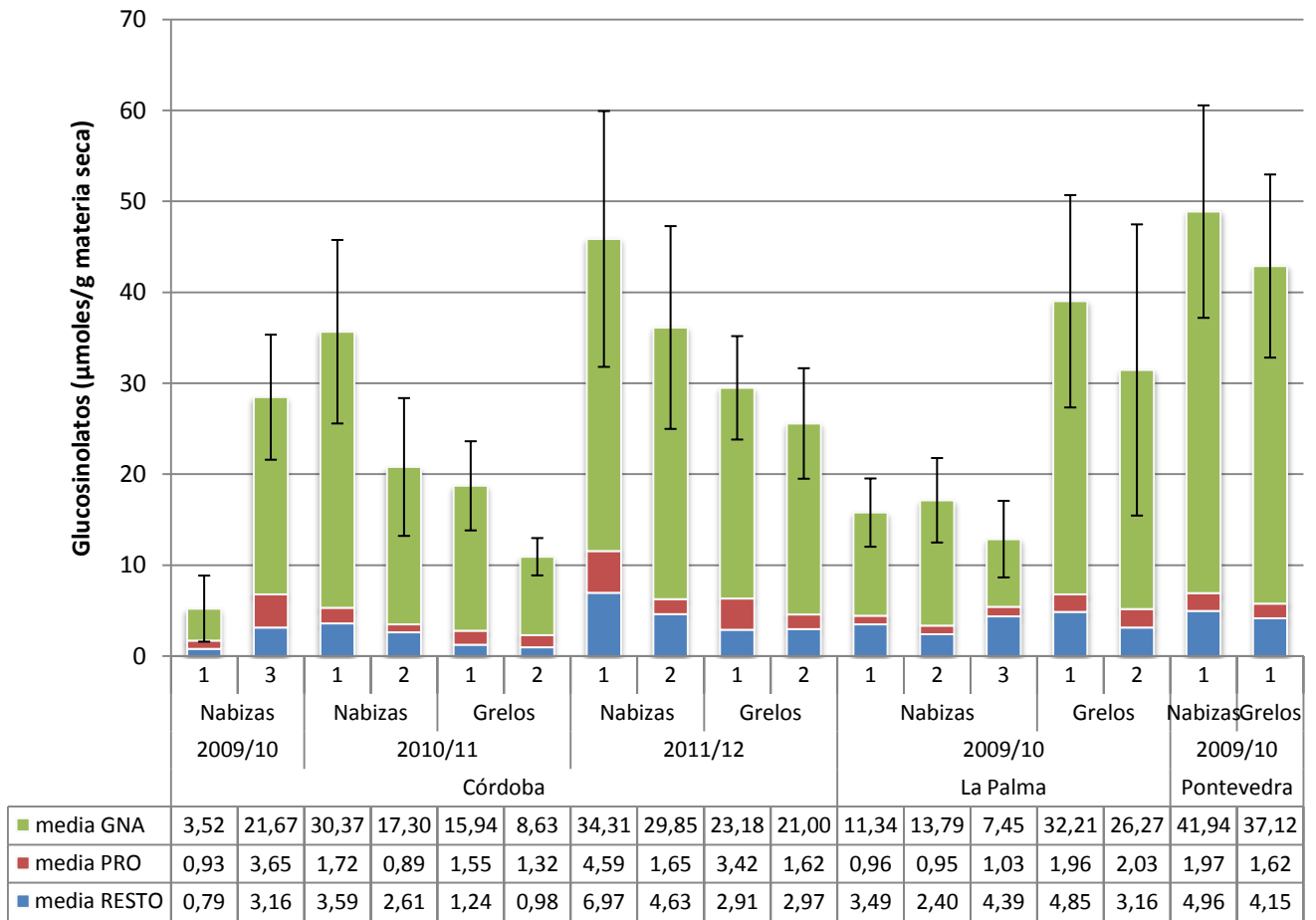


Figura 2. Contenido medio de gluconapina (GNA), progoitrina (PRO) y resto de glucosinolatos (RESTO) de nabizas y grelos de las diferentes siembras (1, 2 y 3 en eje de abscisas) y temporadas en Córdoba, La Palma y Pontevedra. Las barras de error representan la desviación estándar del total de glucosinolatos.

En la mencionada Figura 2 se puede observar que el cultivo en Pontevedra comprende valores de glucosinolatos totales entre 42,89 y 48,87 µmoles/g materia seca, siendo mayor el contenido en nabizas que en grelos. En La Palma el contenido medio de glucosinolatos en nabizas es menor respecto a los grelos, los cuales presentan valores incluidos en el intervalo de Pontevedra. En Córdoba, los resultados del contenido de glucosinolatos en la primera siembra de la primera temporada se diferenciaron notablemente de los demás debido al escaso desarrollo de las plantas ya comentado anteriormente. Hubo un claro aumento del contenido medio de glucosinolatos en las nabizas en las temporadas siguientes, se alcanzaron valores medios de hasta 45,8 µmoles/g materia seca, siendo las concentraciones de glucosinolatos superiores en plantas sembradas en la primera siembra (septiembre) respecto a la segunda (noviembre).

Tabla 4. Contenido medio de glucosinolatos totales de nabizas y grelos de las 5 entradas sembradas en Córdoba, La Palma y Pontevedra.

	BRS0082	BRS0143	BRS0163	BRS0401	BRS0472	Total
Córdoba (tres temporadas)						
Nabizas	28,36*	21,05*	43,80*	33,86*	28,08*	31,03*
Grelos		25,30			20,51	24,96*
Córdoba (3^o temporada)						
Nabizas	37,06*	30,05*	60,86*	47,73*	37,44*	42,63*
Grelos		27,37				27,37*
La Palma						
Nabizas	11,63*	13,93*	17,86*	19,17*	13,75*	15,27*
Grelos	23,05*	22,42	44,22	49,37	37,17	35,25*
Pontevedra						
Nabizas	34,43*	46,99*	63,71*	56,71*	42,57*	48,88*
Grelos	43,25*	30,31	54,35	46,46	40,12	42,90*

Diferencias significativas entre localidades ($p < 0,05$)

El contenido medio en glucosinolatos por entradas y localidades se presenta en la Tabla 4. En la entrada BRS0082, el contenido medio de glucosinolatos en nabizas de Córdoba fue de 28,36 $\mu\text{moles/g}$ materia seca, ligeramente inferior al obtenido en muestras de Pontevedra (34,43 $\mu\text{moles/g}$ materia seca) y ambos muy superiores al obtenido en La Palma (11,63 $\mu\text{moles/g}$ materia seca). Al igual que en el caso de las nabizas, el contenido total en glucosinolatos de los grelos cosechados en La Palma fue inferior al de los grelos cosechados en Pontevedra (23,05 frente a 43,25 $\mu\text{moles/g}$ materia seca).

De la entrada BRS0143 en Córdoba se cosecharon grelos con un contenido medio de 25,30 $\mu\text{moles/g}$ materia seca y una cosecha de nabizas con una concentración menor que en grelos (21,05 $\mu\text{moles/g}$ materia seca). En ambas cosechas se obtuvieron contenidos medios menores que en Pontevedra, que presentó valores de 46,99 y 30,31 $\mu\text{moles/g}$ materia seca, en nabizas y grelos respectivamente. En La Palma esta entrada dio lugar a los grelos de más bajo contenido en glucosinolatos de todas las demás, sin embargo la media no difiere significativamente de los valores obtenidos en Córdoba y Pontevedra. El contenido en nabizas fue inferior al contenido obtenido en grelos (13,93 $\mu\text{moles/g}$ materia seca).

La entrada BRS0163 presentó el contenido medio en glucosinolatos más alto respecto al resto de entradas estudiadas, los valores en Pontevedra estuvieron comprendidos entre 63,71 y 54,36 $\mu\text{moles/g}$ materia seca en nabizas y grelos respectivamente, y este

carácter de alta concentración, se mantuvo en Córdoba. En Córdoba no se consiguió la producción de grelos de esta entrada en ninguna temporada, sin embargo se produjo una buena cosecha nabizas con un contenido de glucosinolatos ligeramente inferior al de las muestras de Pontevedra (43,80 $\mu\text{moles/g}$ materia seca). Al igual que en casos anteriores, las muestras de nabizas de La Palma mostraron un contenido en glucosinolatos inferior al de las muestras de Córdoba y Pontevedra.

En Córdoba la entrada BRS0401 no llegó producir grelos, el contenido medio en glucosinolatos de nabizas fue de 33,86 $\mu\text{moles/g}$ materia seca, obteniéndose los valores más altos en la temporada 2011/12, como ocurrió en entradas anteriores. En La Palma el contenido en nabiza fue inferior al de Pontevedra pero el contenido en grelos fue similar en ambas localidades.

Por último, la entrada BRS0472 en Córdoba formó grelos en la primera siembra de la segunda temporada, y el valor (20,51 $\mu\text{moles/g}$ materia seca) no difiere significativamente de los obtenidos en Pontevedra y La Palma. De forma similar a lo que ocurrió con otras entradas, el contenido de glucosinolatos en nabizas cosechadas en La Palma fue el más bajo, seguido por las muestras de Córdoba y las de Pontevedra.

En la Figura 3 se representa el contenido de glucosinolatos de nabizas y grelos de las 5 entradas, cosechadas en Córdoba en la última temporada del ensayo (2011-12). Destacó la entrada BRS0143 por su capacidad de formar grelos y la entrada BRS0163 por su alto contenido en gluconapina y su bajo contenido en progoitrina. Hay que destacar también que las nabizas y los grelos cosechados en Córdoba mantuvieron el mismo perfil de glucosinolatos individuales y niveles de concentración semejantes a los de Pontevedra, donde el consumo de estas verduras es habitual.

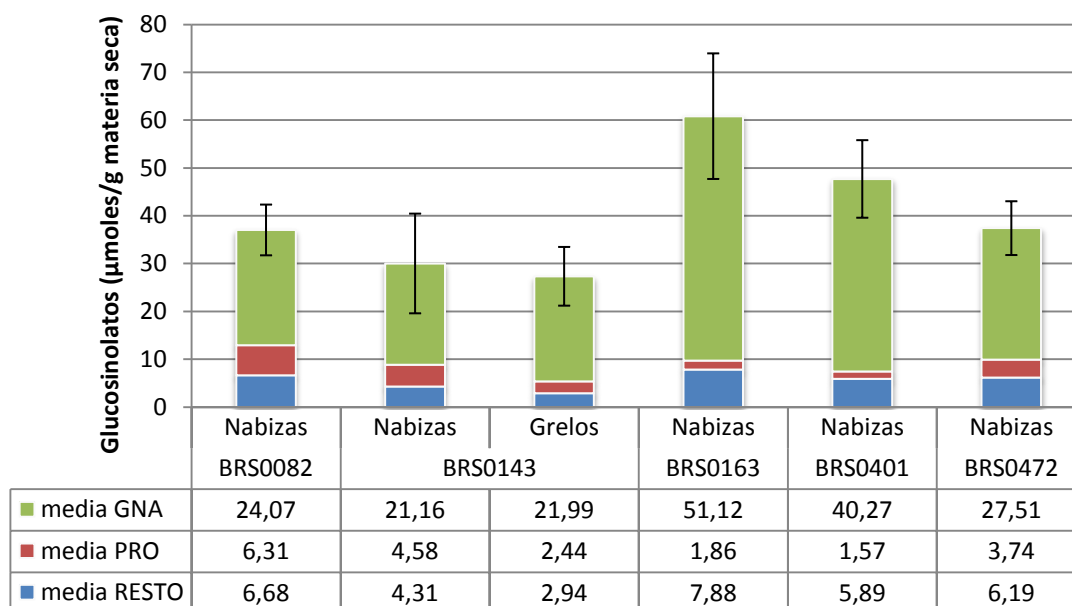


Figura 3. Contenido medio de gluconapina (GNA), progoitrina (PRO) y resto de glucosinolatos (RESTO) de nabizas y grelos de las 5 entradas sembradas en Córdoba en la temporada 2011-12. Las barras de error representan la desviación estándar del total de glucosinolatos.

Componentes inorgánicos

Todos los resultados de los análisis de minerales y electrolitos realizados a nabizas y grelos se encuentran recogidos en Tablas en el ANEXO I (página 228):

Componentes inorgánicos en Pontevedra (control): Temporada 2009/10: nabizas (Tabla III.10) y grelos (Tabla III.11)

Componentes inorgánicos en La Palma: Temporada 2009/10: nabizas (Tabla III.12) y grelos (Tabla III.13)

Componentes inorgánicos en Córdoba: Temporada 2009/10: nabizas (Tabla III.14), temporada 2010/11: nabizas (Tabla III.15) y grelos (Tabla III.16), temporada 2011/12: nabizas (Tabla III.17) y grelos (Tabla III.18)

En la Figura 4 y 5 se resume del contenido medio de componentes inorgánicos de nabizas y grelos sembrados en las tres localidades, en la Figura 4 se encuentran los minerales y electrolitos (expresados en mg/g materia seca) y en la Figura 5 los elementos traza (expresados en µg/g de materia seca).

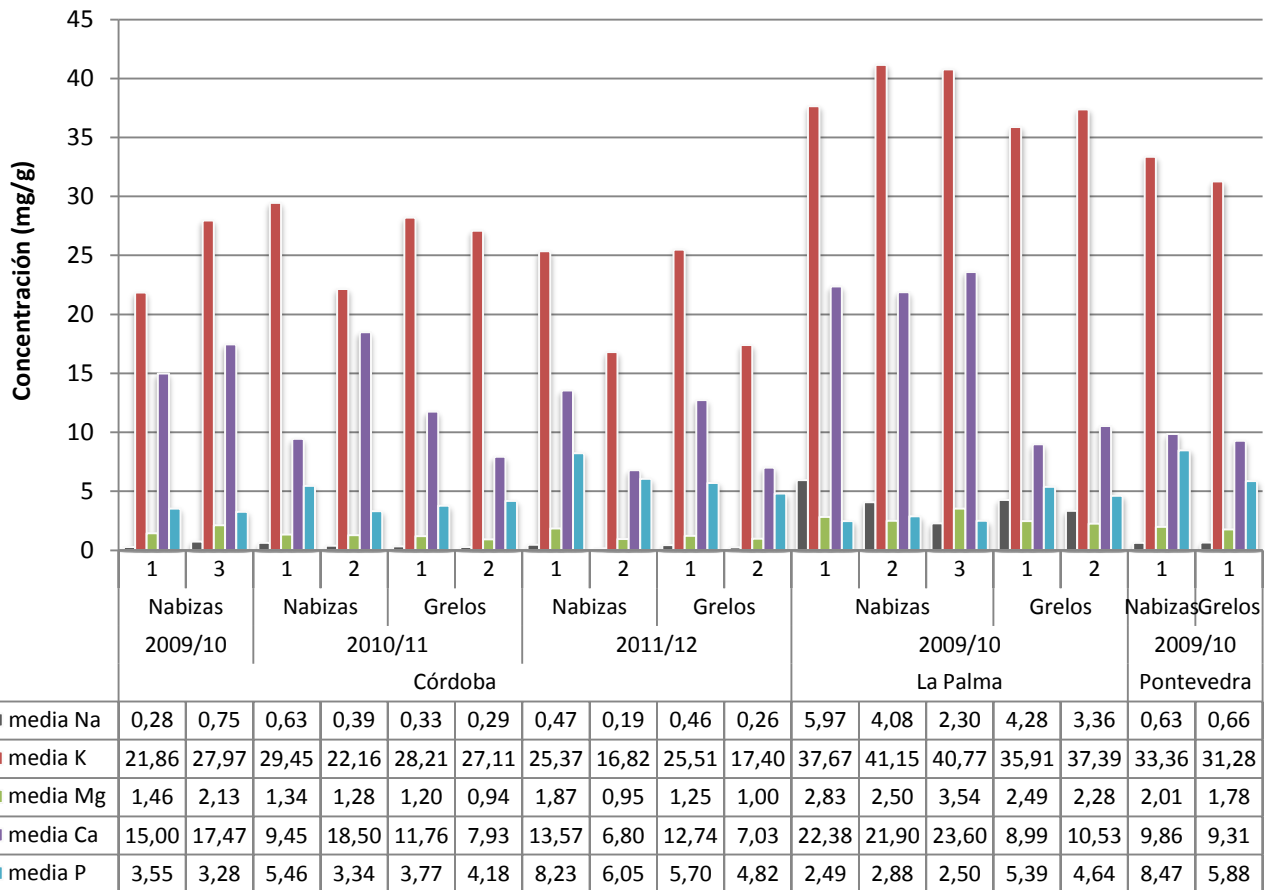


Figura 4. Contenido medio de minerales y electrolitos (mg/g de materia seca) en nabizas y grelos de las tres localidades y distintas fechas de siembra (1, 2 y 3 en el eje de abscisas).

El perfil mineral y de electrolitos analizado en las muestras de grelos y nabizas obtenidas en Córdoba y La Palma es el mismo que se obtiene en las muestras de Pontevedra (Tablas 4 y 5). Las medias de los valores en cada uno de los minerales y electrolitos estudiados, en las nabizas y algunos grelos de cada entrada, sí varían significativamente en función de la localidad. El nivel del desarrollo de las plantas parece que no afectó al contenido inorgánico, lo que se comprueba al observar que en Córdoba no obtuvimos grandes diferencias entre el contenido de componentes inorgánicos de los productos de la primera temporada y de la última temporada, donde sí encontramos una clara diferencia en el desarrollo de las plantas. Cabe destacar el contenido de K, Fe y Ca en muestras de La Palma que fueron las concentraciones más altas obtenidas de las tres localidades. En Córdoba la concentración de componentes inorgánicos fue semejante al contenido medio inorgánico de nabizas y grelos de Pontevedra y se mostró una ligera influencia de las fecha de siembra, las

concentraciones de componentes inorgánicos fueron mayores en la primera siembra respecto a las demás.

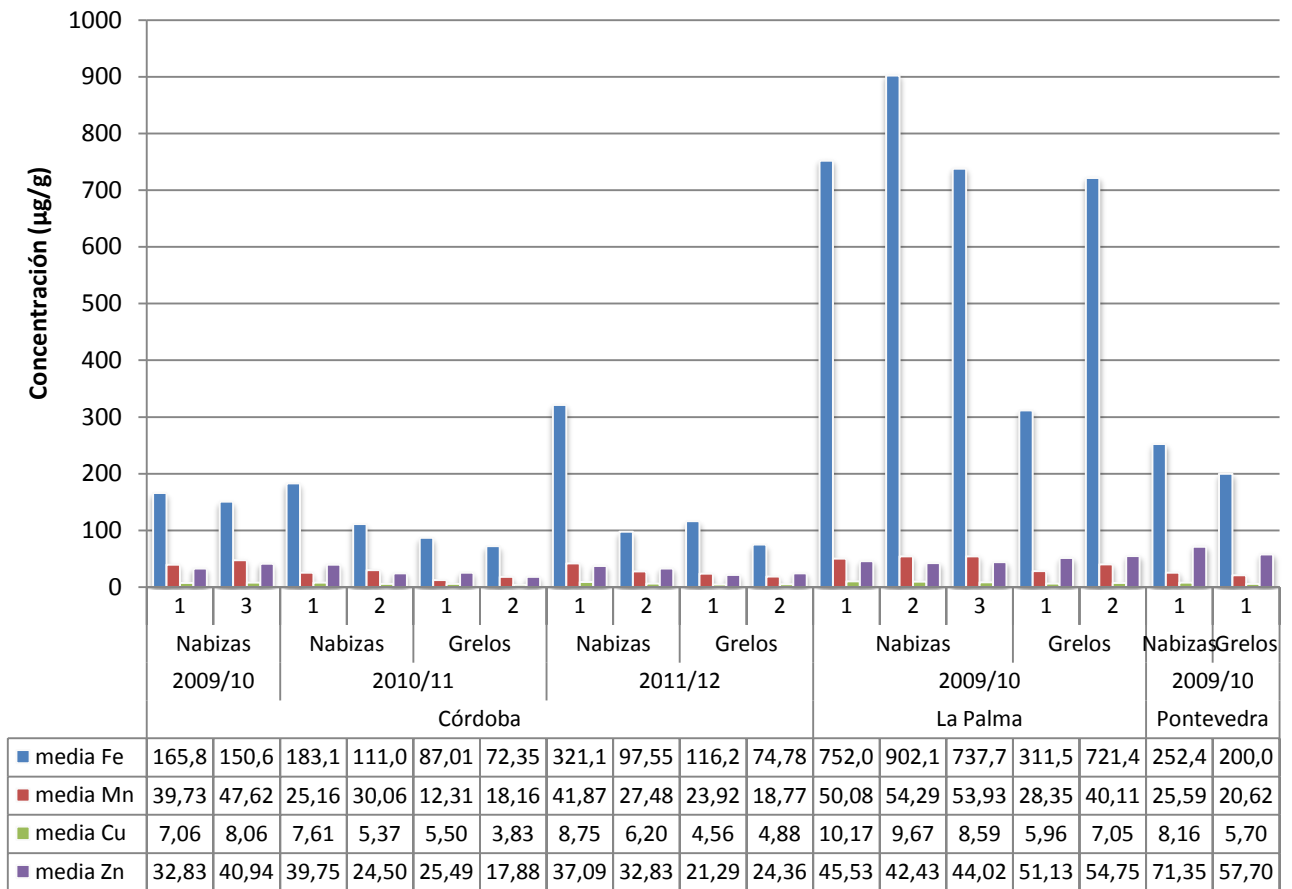


Figura 5. Contenido medio de elementos traza (mg/g de materia seca) en nabizas y grelos de las tres localidades y distintas fechas de siembra (1, 2 y 3 en el eje de abscisas).

El contenido medio de componentes inorgánicos en nabizas y grelos en las 5 entradas por localidades se muestra en las Tablas 5 y 6. En cuanto al Na (Tabla 5), el contenido medio en La Palma es mayor respecto al resto de localidades y al publicado en la Base Española de Composición de Alimentos (1,04 mg/g materia seca). El tipo de suelo (suelo volcánico) o la concentración de Na en el agua de riego puede ser un motivo por el cual estos niveles estuvieron fuera del rango habitual de estas verduras. En el caso de Córdoba los contenidos de Na presentaron valores dentro del intervalo de los obtenidos en Pontevedra.

En lo que se refiere al K (Tabla 5), todas las nabizas y grelos cosechados en las tres localidades contienen elevados niveles respecto los mostrados en la Base Española de Composición de Alimentos (11,84 mg/g materia seca). Los contenidos en Pontevedra

también son muy altos cercanos al contenido de K de otras verduras como las coles (30,9 mg/g materia seca) o el espárrago (39,05 mg/g materia seca) (BEDCA).

Tabla 5. Contenido medio de minerales y electrolitos en las 5 entradas sembradas en Córdoba, La Palma y Pontevedra.

	Minerales y electrolitos (mg/g)									
	Na		K		Mg		Ca		P	
	Grelos	Nabizas	Grelos	Nabizas	Grelos	Nabizas	Grelos	Nabizas	Grelos	Nabizas
Córdoba										
BRS0082		0,41*		23,36*		1,58*		10,23*		5,82*
BRS0143	0,33*	0,53*	22,94*	25,58*	1,08*	1,58*	9,49	18,13*	4,90*	4,29*
BRS0163		0,46*		22,52*		1,56*		12,94*		5,33*
BRS0401		0,43*		23,18*		1,48*		14,88*		4,45*
BRS0472	0,45*	0,43*	27,34*	25,06*	1,50*	1,34*	14,93*	11,14*	3,49*	5,04*
La Palma										
BRS0082	3,35*	3,88*	37,32	38,59*	2,31	2,94*	7,76	20,15*	5,17	2,66*
BRS0143	4,65*	4,03*	39,09*	41,55*	2,34*	3,20*	13,10	24,95*	3,90*	2,60*
BRS0163	4,68*	4,57*	37,06	40,64*	2,56*	2,68*	9,42	21,85*	5,79	2,96*
BRS0401	4,03*	3,67*	33,54	38,64*	2,25*	3,07*	10,23	23,65*	4,86	2,11*
BRS0472	2,39*	4,44*	36,25*	39,90*	2,46*	2,90*	8,30*	22,52*	5,37*	2,80*
Pontevedra										
BRS0082	0,60*	0,60*	32,76	35,39*	2,01	2,24*	9,18	8,98*	6,19	9,45*
BRS0143	0,42*	0,61*	28,62*	31,06*	1,82*	1,92*	9,34	9,80*	5,86*	8,63*
BRS0163	0,75*	0,70*	29,51	33,38*	1,66*	2,03*	7,90	8,36*	6,39	8,63*
BRS0401	0,89*	0,53*	30,93	31,96*	1,70*	1,79*	11,20	12,76*	4,77	7,12*
BRS0472	0,65*	0,74*	34,59*	35,03*	1,74*	2,06*	8,92*	9,41*	6,17*	8,52*

* Diferencias significativas entre localidades ($p < 0,05$)

Las concentraciones en La Palma son las más altas de las tres localidades con niveles mayores de 33,54 mg/g materia seca, estos niveles son semejantes al contenido de K en espinacas (40,67 mg/g materia seca) (BEDCA). Los contenidos en Córdoba son un poco más bajos, su intervalo va de 22,52 a 27,34 mg/g materia seca, semejantes por ejemplo a otras verduras como las judías verdes (26,9 mg/g materia seca) (BEDCA).

En relación con Mg (Tabla 5), las concentraciones en Pontevedra y La Palma fueron algo superiores a las publicadas en BEDCA (1,5 mg/g materia seca) y semejantes a las concentraciones de Mg en el espárrago (2,5 mg/g materia seca) (BEDCA).

Respecto al Ca, obtuvimos mucha variabilidad en los análisis de nabizas y grelos de Córdoba, como se observa en la Tabla 5. Las concentraciones están en consonancia con las aportadas por BEDCA (14,63 mg/g materia seca en grelos) y son similares al contenido en el cardo (18,69 mg/g materia seca). Los contenidos en La Palma volvieron

a ser muy superiores a las otras dos localidades, principalmente en nabizas, con valores superiores incluso a los del cardo.

En el caso del P (Tabla 5), en Pontevedra las concentraciones en las nabizas fueron superiores las obtenidas en Córdoba y La Palma, con valores máximos de 9,45 mg/g materia seca; en Córdoba los valores fueron algo más bajos que en Pontevedra, siendo las plantas de la tercera temporada las de más altas concentraciones. En La Palma las mayores concentraciones en glucosinolatos se encontraron en los grelos. En general los valores están en concordancia con los datos de la Base Española de Composición de Alimentos (5,22 mg/g materia seca).

Tabla 6. Contenido medio de elementos traza en nabizas y grelos de las 5 entradas sembradas en Córdoba, La Palma y Pontevedra.

	Elementos traza ($\mu\text{g/g}$)							
	Fe		Mn		Cu		Zn	
	Grelos	Nabizas	Grelos	Nabizas	Grelos	Nabizas	Grelos	Nabizas
Córdoba								
BRS0082		185,78*		28,80*		8,00*		40,78*
BRS0143	88,27*	145,78*	19,00*	46,13*	4,65*	6,48*	22,71*	29,89*
BRS0163		193,74*		36,15*		7,57*		35,94*
BRS0401		197,15*		35,22*		6,87*		32,57*
BRS0472	108,99*	135,31*	16,99*	30,29*	6,66	6,97*	26,40*	34,10*
La Palma								
BRS0082	256,55*	930,23*	25,21	54,30*	7,29	9,79*	57,53	44,13*
BRS0143	1005,10*	940,18*	47,91*	60,34*	6,00*	9,65*	39,98*	42,71*
BRS0163	632,41	714,20*	37,49	50,94*	5,81	9,87*	53,61	44,17*
BRS0401	356,11*	640,39*	28,88	45,37*	5,75	8,95*	51,72	43,87*
BRS0472	332,26*	761,56*	31,68*	52,86*	7,66	9,12*	61,86*	45,09*
Pontevedra								
BRS0082	162,86*	251,80*	20,32	25,79*	8,33	9,07*	66,36	69,79*
BRS0143	200,72*	224,79*	21,12*	24,17*	5,11*	8,06*	58,41*	76,94*
BRS0163	186,63	250,66*	19,92	28,02*	4,00	8,09*	51,86	72,97*
BRS0401	153,78*	262,97*	19,07	24,24*	5,78	6,81*	46,67	68,63*
BRS0472	296,14*	272,17*	22,69*	25,71*	5,29	8,78*	65,20*	68,42*

* Diferencias significativas entre localidades ($p < 0,05$)

En Tabla 6 se muestran los datos del contenido medio de Fe, destacaron las altas concentraciones en muestras de La Palma, muy superiores a los niveles que mostraron las nabizas y grelos de las otras dos localidades, incluso superiores a los datos de la Base Española de Composición de Alimentos (460 $\mu\text{g/g}$ ms) (BEDCA). Las nabizas y

grelos de La Palma se podrían considerar como una excelente fuente vegetal de hierro, aunque sería necesario comprobar el grado de biodisponibilidad de las mismas.

En relación a los minerales Mn y Cu (Tabla 6), no tenemos valores de referencia en la Base Española de Composición de Alimentos; Son minerales que se encuentran en muy baja concentración en las nabizas y grelos, sin embargo los contenidos de Cu obtenidos en los análisis de las tres localidades estuvieron en torno a los publicados por otros autores, que muestran valores de 5 $\mu\text{g/g}$ en Cu (Francisco et al., 2009). En cuanto al contenido en Mn, en todas las localidades la concentración en estas verduras fue inferior al aportado por estos autores, 91 $\mu\text{g/g}$ (Francisco et al., 2009).

Por último, los niveles de Zn (Tabla 6) en La Palma y en Córdoba fueron más bajos que los valores indicados en la Base Española de Composición de Alimentos (60 $\mu\text{g/g}$), sin embargo estos niveles de concentración fueron semejantes a las nabizas y grelos de Pontevedra.

Conclusiones

La Palma

- Las plantas de *Brassica rapa* dieron cosechas de nabizas y grelos en la primera y en la segunda siembra. La tercera siembra debido a la entrada de la primavera, las plantas subieron a flor rápidamente sin formar grelos. En todas las entradas estudiadas se obtuvo cosecha de nabizas en las tres fechas de siembra, sin embargo sólo se obtuvo cosecha de grelos en las dos primeras siembras. Considerando estos datos, la fecha óptima de siembra en La Palma estaría en torno a diciembre, sin embargo sería necesario completar el estudio aumentando los años de ensayo para ajustar la fecha más propicia para obtener cosechas de gran producción y calidad.
- En cuanto al contenido en glucosinolatos, en las nabizas el contenido medio (15,27 $\mu\text{moles/g}$ materia seca) no llegó a alcanzar ni el 50% del contenido medio en Pontevedra (48,88 $\mu\text{moles/g}$ materia seca), sin embargo la concentración de glucosinolatos en grelos (35,25 $\mu\text{moles/g}$ materia seca) alcanza valores cercanos al cultivo sembrado en Pontevedra (42,9 $\mu\text{moles/g}$ materia seca) (Tabla 4).
- Respecto al contenido de componentes inorgánicos, el perfil inorgánico obtenido en La Palma fue igual que el del cultivo sembrado en Pontevedra, fue la localidad que mayores concentraciones mostró en la mayoría de los minerales y

electrolitos, y no se encontraron claras diferencias dependiendo de la fecha de siembra.

Córdoba

- La primera siembra (septiembre) y segunda siembra (noviembre) fueron las más productivas, con formación de nabizas en todas las entradas y formación de grelos sólo en algunas entradas (BRS0143 y BRS0472). En la tercera siembra (enero) no se consiguió un buen desarrollo de las plantas en ninguna de las temporadas de ensayo, esto fue debido a que en el mes de febrero el desarrollo de las plantas fue muy lento y el rápido aumento de las temperaturas, por la llegada de la estación de primavera, hizo que las plantas (de escaso porte vegetativo) subieran a flor y no se pudiera cosechar ni nabizas ni grelos.
- Se encontraron diferencias en la concentración de glucosinolatos en nabizas respecto a los valores obtenidos en las localidades de La Palma y Pontevedra. Las concentraciones más altas de glucosinolatos se obtuvieron en la tercera temporada de siembra en Córdoba y la fecha de siembra que presentó mayores concentraciones de glucosinolatos fue la realizada en el mes de septiembre.
- El perfil inorgánico encontrado en las muestras de Córdoba fue el mismo que el de las muestras del cultivo sembrado en Pontevedra, sin embargo las concentraciones en la mayoría de los minerales y electrolitos fueron inferiores a los obtenidos en La Palma y semejantes a los valores mostrados en el cultivo sembrado en Pontevedra, exceptuando el Zn y K que fueron más bajos. Merece la pena destacar la concentración obtenida en Ca en nabizas (18,50 mg/g), mayor a la determinada en nabizas de Pontevedra (9,86 mg/g), ya que está considerado un micronutriente esencial que, en el norte de España y Portugal, es aportado a la dieta, entre otros alimentos, a través del consumo de plantas de *Brassica* como las nabizas y los grelos.

Con el cultivo de *Brassica rapa* durante tres temporadas en Córdoba se optimizó finalmente la fecha de siembra óptima del cultivo. El mes de septiembre fue el más propicio y adecuado para obtención de nabizas y grelos de calidad nutritiva equiparable a cultivos control en Pontevedra. Del cultivo de *Brassica rapa* en Córdoba se pueden obtener buenas cosechas de nabizas y es necesario seleccionar las entradas más adecuadas para la obtención de grelos. Las concentraciones de glucosinolatos y componentes inorgánicos en nabizas y grelos están en su mayoría cercanas a los valores,

incluso en algunos parámetros superiores a los datos del cultivo sembrado en Pontevedra y a los publicados en bibliografía.

Si consideramos el amplio intervalo y la variabilidad encontrada en el conjunto de muestras analizadas desde el 2009 hasta el 2012 en las tres localidades tanto en glucosinolatos como en minerales, resulta evidente que dichas muestras constituyen un material idóneo para el desarrollo de ecuaciones de calibración mediante técnicas espectroscópicas en el infrarrojo cercano (NIRS) (Capítulo V y VI), con vistas a su utilización en proyectos futuros relacionados con la mejora de la calidad de este cultivo. Además de demostrar que *Brassica rapa* en Córdoba se puede cultivar obteniendo una buena cosecha de nabizas y grelos, se mostró que la calidad nutritiva, respecto al contenido de glucosinolatos y minerales, fue semejante al cultivo en Pontevedra. Estos resultados revelaron que las nabizas y grelos puede ser un cultivo próspero en la zona, que puede proporcionar productos innovadores en el sur de España y con alta probabilidad de éxito en el mercado hortofrutícola de Andalucía.

Agradecimientos

Agradecimiento al Ministerio de Economía y Competitividad del gobierno español por la financiación de los proyectos: "Calidad y resistencia a estreses bióticos en los cultivos de Brassicas: papel de los metabolitos secundarios" (Ref. AGL2009-09922) y "Genética y mejora de brásicas hortícolas: papel de los metabolitos secundarios" (Ref. AGL2012-35539).

Referencias

- Association of Official Analytical Chemists Official Methods (AOAC) 991.25 (1991).
Second supplement. In *Official methods of analysis*. (15th). Helrich, K. Eds.
Arlington, Virginia (USA).
- Base de Datos Española de Composición de Alimentos (BEDCA):
<http://www.bedca.net/bdpub/index.php>
- Cartea, M.E., Francisco, M., Soengas P. and Velasco, P. (2010). Phenolic Compounds
in *Brassica* Vegetables. *Molecules*. 16(1), 251.
- Choi, H.S., Cho, M.C., Lee, H.G. and Yoon, D.Y. (2010). Indole-3-carbinol induces
apoptosis through p53 and activation of caspase-8 pathway in lung cancer A549
cells. *Food Chem Toxicol*. 48(3), 883-890.
- Francisco, M., Padilla, G., Lema, M., Velasco, P. (2009). El grelo de Galicia.
Horticultura. 210, 44-49.
- Gómez-Campo, C. (1999). Taxonomy. In *Biology of Brassica coenospecies*. Gómez-
Campo, C. Eds., Elsevier Science B.V. Amsterdam, Holanda, pp 3-32.
- Isaac, R.A. and Johnson, W.C. (1990). Collaborative study of wet and dry ashing
techniques for the elemental analysis of plant tissue by atomic absorption
spectrophotometry. *Journal of AOAC International*. 58(3), 436-440.
- ISO norm (1992). Rapessed- Determination of glucosinolates content - Part 1: method
using high-performance liquid chromatography. ISO 9167-1, 1-9.
- Kestwal, R.M., Lin, J.C., Bagal-Kestwal, D., Chiang B.H. (2011). Glucosinolates
fortification of cruciferous sprouts by sulphur supplementation during
cultivation to enhance anti-cancer activity. *Food Chem*. 126, 1164-1171
- Kopsell, D.E., Kopsell, D.A., Lefsrud, M.G. and Curran-Celentano, J. (2004).
Variability in elemental accumulations among leafy *Brassica oleracea* cultivars
and selections. *J Plant Nutr*. 27(10), 1813-1826.
- Mainardi, F. (1995). Manual práctico del horticultor moderno. Eds. De Vecchi, S.A.
Barcelona, España.
- Manchali, S., Murthy, K.N.C., Patil B.S. (2012). Crucial facts about health benefits of
popular cruciferous vegetables. *J Funct Foods*. 4, 94-106
- Maroto, J.V. (1995). Horticultura herbácea especial. Eds. Mundi Prensa, S.A. Madrid,
España.

- Mi, L., Wang, X., Govind, S., Hood, B.L., Veenstra, T.D., Conrads, T.P., Saha, D.T., Goldman, R., Chung, F.L. (2007). The role of protein binding in induction of apoptosis by phenethyl isothiocyanate and sulforaphane in human non-small lung cancer cells. *Cancer Res.* 67(13), 6409-6416.
- Rosa, E.A.S. (1999). Chemical composition. In *Biology of Brassica coenospecies* Gómez-Campo, C. Eds., Elsevier Science B.V., Amsterdam, pp 315-357.
- Traka, M. and Mithen, R. (2009). Glucosinolates, isothiocyanates and human health. *Phytochem Rev.* 8, 269-282.
- Wathelet, J.P., Wagstaffe, P., Boenke, A. (1991). The certification of the total glucosinolate and sulphur contents of three rapeseeds (colza), CRMs 190, 366 and 367. Commission of the European Communities, report EUR 13339 EN, 1-75.
- Yamada-Kato, T., Nagai, M. Ohnishi, M. and Yoshida, K. (2012). Inhibitory Effects of Wasabi Isothiocyanates on Chemical Mediator Release in RBL-2H3 Rat Basophilic Leukemia Cells. *J Nutr Sci Vitaminol.* 58, 303-307.



Capítulo IV

**Cultivo de
Brassica rapa en
Córdoba para
producción de
nabizas y grelos.
Caracterización
nutricional.**

Artículo en preparación

Obregón-Cano, S., Moreno-Rojas, R., Cartea, E. y De Haro-Bailón, A.

Capítulo IV

Cultivo de *Brassica rapa* en Córdoba para producción de nabizas y grelos. Caracterización nutricional.

Obregón-Cano, S.^a, Moreno-Rojas, R.^b, Cartea, E.^c y De Haro-Bailón, A.^a

^a Departamento de Mejora Genética, Instituto de Agricultura Sostenible (CSIC), Alameda del Obispo s/n, C.P. 14004. Córdoba, España.

^b Departamento de Bromatología, Universidad de Córdoba, Campus Universitario Rabanales. Carretera Nacional IV Km. 396. C.P. 14014. Córdoba, España.

^c Departamento de Genética de Plantas, Misión Biológica de Galicia (CSIC), Apartado 28, 36080 Pontevedra, España.

Introducción

Hoy día debemos responder a los grandes cambios que nuestro sector agrícola está sufriendo no solo en el ámbito de su rentabilidad, sino también en el de otros caracteres como los de naturaleza sociológica y ecológica (formas de vida, costumbres alimentarias, políticas agrarias y medioambientales, variables climáticas). Esto conlleva la búsqueda de nuevas herramientas, nuevas fórmulas, técnicas e incluso nuevas culturas agrícolas, nuevos cultivos y variedades que se adapten a este rápido proceso de cambio global en el que estamos inmersos. En este sentido, el cultivo de grelos y nabizas (*Brassica rapa*) puede ser un buen candidato para introducir como cultivo innovador en el sur de España, al tener un gran potencial como verduras de carácter funcional, ricas en sustancias biológicamente activas y que promueven la salud. Gracias a la participación en los proyectos “Calidad y resistencia a estreses bióticos en los cultivos de Brasicas: Papel de los metabolitos secundarios” (Ref. AGL2009-09922), y “Genética y mejora de brásicas hortícolas: papel de los metabolitos secundarios” (Ref. AGL2012-35539), en colaboración con la Misión Biológica de Galicia, se evaluó del comportamiento del cultivo de *Brassica rapa* en Córdoba durante tres temporadas (Capítulo III) donde se demostró que *Brassica rapa* se puede cultivar en esta zona, y

sembrando en la fecha de siembra adecuada (septiembre) el desarrollo de las plantas fue el óptimo y se obtuvieron cosechas de nabizas y grelos de calidad equiparable a los cultivos en Pontevedra.

El objetivo de este trabajo fue profundizar en el estudio de *Brassica rapa* en Córdoba, mediante la selección de las entradas más prometedoras para la obtención de nabizas y grelos de calidad. Se caracterizó el cultivo de *Brassica rapa* de forma agronómica y nutricional, en cuanto al contenido en glucosinolatos, minerales y fibra de las cosechas de nabizas y grelos de las entradas seleccionadas. Finalmente el estudio se completó con una caracterización organoléptica del producto obtenido en Córdoba, realizado por expertos catadores de grelos en Galicia.

Material y Métodos

Material vegetal y diseño experimental

En la temporada 2013-2014, se realizó una selección de 19 entradas de *Brassica rapa* subsp. *rapa* procedentes del Banco de Germoplasma de la Misión Biológica de Galicia, en función de las características agronómicas y del contenido en glucosinolatos. La caracterización de esas entradas se llevó a cabo en Pontevedra en los años 2007-2008 gracias a la participación en un proyecto de investigación "**Genética y mejora de los cultivos de brásicas hortícolas**" (Ref. AGL2012-35539) en colaboración con la Misión Biológica de Galicia, donde uno de sus objetivos fue la evaluación, por su contenido de glucosinolatos en hojas, de 45 entradas locales de *Brassica rapa* recolectadas por todo el Noreste de España (Cartea et al., 2012).

En la Tabla 1 se presenta una relación del origen de cada entrada utilizada en el estudio. Cada entrada local se identifica con las siglas BRS y el número que le corresponde por orden de entrada en el banco de germoplasma.

Las semillas se germinaron en placas de petri en laboratorio y se trasplantaron a maceta a los 3-4 días. Cuando las plantas alcanzaron unos 10 cm de altura en maceta se volvieron a trasplantar a campo en el mes de septiembre, que es la fecha más idónea para el cultivo de nabizas y grelos en Córdoba según el estudio desarrollado en el Capítulo III.

Tabla 1. Identificación y procedencia de entradas de *Brassica rapa* estudiadas en Córdoba, temporada 2013-2014.

Nombre local	Provincia	Localidad	Identificación
nabizas para grelos	A Coruña	Lama, Boqueixón	BRS0140
nabizas tempranas	A Coruña	Lama, Boqueixón	BRS0143
grelos	A Coruña	Iria Flavia, Padrón	BRS0427
nabos	Lugo	A Fonsagrada	BRS0438
nabo blanco para nabizas	A Coruña	Lago, Valdoviño	BRS0450
nabos del país	Lugo	Barreiros, Antas de Ulla	BRS0458
Nabos, grelos	A Coruña	Campos, Melide	BRS0463
Nabos, grelos	A Coruña	Outes, Valadares, Noia	BRS0466
nabizas, grelos	Lugo	As Oiras, Alfoz, Foz	BRS0469
nabo de Lugo para grelos	Lugo	San Julián de Tor, Monforte	BRS0470
nabo de Santiago	Lugo	San Julián de Tor, Monforte	BRS0471
nabos	A Coruña	Iglesario, Luhía, Ortigueira	BRS0484
nabos tempranos para grelo	A Coruña	Fosado, Montao, Ordes	BRS0496
nabos tardíos para grelo	A Coruña	Fosado, Montao, Ordes	BRS0498
nabo temprano para grelo	A Coruña	Lubris, Olas, Ordes	BRS0499
nabo de grelo temprano	A Coruña	Mazaricos	BRS0504
nabiza de grelo	A Coruña	Santa Comba	BRS0507
nabos	A Coruña	Arteixo	BRS0544
Especie sintética	A Coruña	-	BRSin05-C2

En función de su homogeneidad en la producción de grelos y rendimiento en campo durante esa temporada, 6 entradas fueron seleccionadas para la siembra en la temporada siguiente, 2014-2015. En la Tabla 2 se presenta la relación de las 6 entradas seleccionadas con su identificación del banco de germoplasma.

El esquema de cultivo en ambas temporadas fue un diseño de bloques al azar con 3 repeticiones. Las cosechas fueron evaluadas nutricionalmente en cuanto al contenido en glucosinolatos, minerales y fibra.

Tabla 2. Identificación y procedencia de entradas de *Brassica rapa* estudiadas en Córdoba, temporada 2014-2015.

Nombre local	Provincia	Localidad	Identificación
nabizas tempranas	A Coruña	Lama, Boqueixón	BRS0143
grellos	A Coruña	Iria Flavia, Padrón	BRS0427
nabos tempranos para grelo	A Coruña	Fosado, Montao, Ordes	BRS0496
nabos tardíos para grelo	A Coruña	Fosado, Montao, Ordes	BRS0498
nabo de grelo temprano	A Coruña	Mazaricos	BRS0504
especie sintética	A Coruña	-	BRSin05-C2

Preparación de las muestras para análisis de referencia

Durante cada temporada agrícola, en el momento óptimo para consumo, se tomaron muestras de nabizas (4 a 5 hojas por planta) y de grelos (3 a 4 tallos florales por planta) de las plantas seleccionadas para cada una de las entradas estudiadas. Todo el material vegetal se lavó a fondo con agua del grifo para eliminar la suciedad y el polvo de la superficie y se finalizó con un lavado en agua desionizada. A continuación se almacenaron a -80 °C hasta el momento de su liofilización, que se realizó en un equipo Telstar® modelo Cryodos-50 (Telstar, Terrasa, España). Las muestras liofilizadas se molieron en un molino IKA-Labortechnik® modelo A10, durante 20 segundos y se almacenaron en desecador hasta el momento de ser analizadas por el método de referencia.

Análisis de glucosinolatos

El análisis de glucosinolatos se realizó como indica la norma europea para determinación de los mismos (ISO 9167-1, 1992). La extracción de glucosinolatos se realiza en dos fases. En la primera etapa, se pesó 100 mg de material liofilizado y la extracción se llevó a cabo en un baño de agua a 75°C para desactivar la enzima mirosinasa, la muestra se calentó durante 15 min en una solución con 2,5 ml de metanol acuoso al 70% y con adición de 100 µl de glucotropolina a 10 mM como patrón interno. La segunda etapa de extracción se llevó a cabo después de un proceso de centrifugación, mediante una nueva adición de la solución de 2,5 ml de metanol acuoso al 70%. Un mililitro de extracto de glucosinolatos se hizo pasar por una columna de intercambio iónico que contiene 1 ml de Sephadex (DEAE-A25, Sigma). La desulfatación se llevó a cabo mediante la adición de 75 µl de solución de sulfatasa

purificada (de *Helix pomatia*, Sigma). Los glucosinolatos desulfatados se eluyeron con 2,5 ml de agua ultrapura y luego se analizaron en un equipo Waters de HPLC modelo 600, provisto de un detector de absorbancia ultravioleta-visible modelo 486 a una longitud de onda de 229 nm (Waters). La separación de los glucosinolatos se llevó a cabo mediante el uso de una columna Lichrospher 100 RP-18 con LiChroCART 125-4 de 5 micras de tamaño de partícula (Merck). Los disolventes de HPLC y gradiente se establecieron de acuerdo con el protocolo ISO (ISO 9167-1, 1992). La cantidad de cada glucosinolato individual presente en la muestra se calculó por medio del patrón interno y se expresó como micromoles por gramo de materia seca de material. Los resultados de los datos fueron analizados utilizando el programa informático de trabajo de Waters Millennium 32. El cromatograma de HPLC se comparó con el perfil de desulfoglucosinolatos de materiales de referencia certificada, según lo recomendado por UE e ISO (CRMs 366, 190 y 367) (Wathelet et al., 1991). El contenido total de glucosinolatos se calculó como la suma de todos los glucosinolatos individuales presentes en la muestra.

Análisis de componentes inorgánicos

Los componentes inorgánicos analizados en las muestras de nabizas y grelos fueron K, Ca, P, Mg, Na, Fe, Zn, Mn y Cu. La digestión de la muestra se realizó por vía húmeda con ácido nítrico y ácido perclórico (Isaac et al., 1990). Los análisis de Ca, Mg, Fe, Mn, Zn y Cu se llevaron a cabo por espectrofotometría de absorción atómica y los de Na y K se hicieron por emisión atómica. El equipo utilizado fue un espectrofotómetro de absorción atómica Varian® modelo SpectrAA-50/55, con llama de aire-acetileno y lámparas de cátodo hueco de un solo elemento y corrección de fondo con lámpara de deuterio para el análisis de Mn. Para la determinación de Ca y Mg, se añadió cloruro de lantano a fin de evitar interferencias aniónicas. El análisis de P, como ácido molibdo-vanado-fosfórico, se hizo por colorimetría (AOAC, 1991) en un espectrofotómetro UV-visible (Beckman® modelo DU640).

Análisis de fibra

El contenido de fibra neutro detergente y fibra ácido detergente se determinó de acuerdo con los procedimientos descritos por Goering y Van Soest (1970) en un aparato Dosi-Fiber (Selecta®, España).

Fibra neutro detergente (FND)

Se pesaron 0,5 g de muestra liofilizada y molida en crisoles de vidrio filtrantes (porosidad 2). Se sometieron a digestión durante 1 hora en 100 ml de solución neutra (compuesta por lauril sulfato sódico, 2-etoxietanol, EDTA, tetraborato sódico y fosfato disódico). Posteriormente, la digestión de la muestra fue filtrada para obtener el residuo considerado como la fibra neutro detergente de la muestra. A continuación el residuo fue lavado con agua caliente y acetona y se secaron en estufa a 110°C durante 1 hora y media. Tras la estufa, se mantuvieron en desecador durante media hora para atemperar y evitar la absorción de humedad y pesar los crisoles con exactitud. Cada digestión de la muestra se hace por duplicado, el resultado de FND será el valor medio de ambas medidas. El contenido en fibra neutro detergente de la muestra se calculó de acuerdo con la fórmula:

$$\text{FND}(\%) = \frac{P3 - P1}{P2 - P1} * 100$$

Donde P1 es el peso crisol, P2 es el peso del crisol con la muestra y P3 es el peso del crisol y la fibra (después de la digestión).

Fibra ácido detergente (FAD)

Se pesó 0,5 g de muestra liofilizada y molida en crisoles de vidrio filtrantes (porosidad 2). Se sometieron a digestión durante 1 hora en 100 ml de bromuro de cetiltrimetilamonio caliente en medio ácido (ácido sulfúrico), la digestión de la muestra fue filtrada para obtener el residuo considerado como la fibra ácido detergente de la muestra. A continuación el residuo fue lavado con agua caliente y acetona y se secaron en estufa a 110°C durante 1 hora y media. Tras la estufa, se mantuvieron en desecador durante media hora para atemperar y evitar la absorción de humedad y pesar los crisoles con exactitud. Cada digestión de la muestra se hace por duplicado, el resultado de FAD será el valor medio de ambas medidas. El contenido en fibra ácido detergente de la muestra se calculó de acuerdo con la fórmula:

$$\text{FAD}(\%) = \frac{P3 - P1}{P2 - P1} * 100$$

Donde P1 es el peso crisol, P2 es el peso del crisol con la muestra y P3 es el peso del crisol y la fibra (después de la digestión).

Caracteres agronómicos

Los caracteres agronómicos descritos en este trabajo se adaptaron a partir de los descriptores para *Brassica* y *Raphanus* del Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos (IBPGR, 1990) y de la Unión Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales (UPOV, 2001).

Durante el ciclo del cultivo de la temporada 2014/15 se tomaron diversos caracteres agronómicos que se encuentran detallados a continuación:

- **Materia fresca de nabiza:** Peso fresco promedio de una hoja (g) (media de 25 hojas por parcela)
- **Materia fresca de grelo:** Peso fresco promedio de un grelo (g) (media de todos los grelos tomados de 5 plantas por parcela)
- **Humedad de nabizas:** Porcentaje de peso fresco de una hoja fresca (%)
- **Humedad de grelos:** Porcentaje de peso fresco de un grelo fresco (%)
- **Tallos secundarios:** Número promedio de tallos secundarios por planta (media de 5 plantas por parcela)
- **Producción fresca de grelos:** Materia fresca de grelos por el número de tallos secundarios (kg)
- **Tiempo para producción de grelos:** Días desde el trasplante hasta la producción del primer grelo.

Caracteres organolépticos. Cata sensorial.

Los grelos recogidos en el momento óptimo de consumo en Córdoba en la temporada 2014/15, fueron enviados por correo urgente en condiciones de refrigeración para una cata sensorial en Pontevedra.

En la cata de Pontevedra, los grelos se cocieron en olla a presión durante dos minutos en un litro de agua y sal. Entre 8-12 catadores participaron en la cata, evaluándose los siguientes parámetros, todos ellos en función de una escala subjetiva de 1 a 5.

- **Sabor:** en función de la apreciación global se asignó un 1 al peor sabor y 5 al mejor.
- **Fibrosidad:** 1 para las hojas menos fibrosas y 5 para las más fibrosas
- **Amargor:** 1 menos amargo a 5 más amargo
- **Dureza:** 1 para texturas duras y 5 para texturas blandas.

Como referencia la Denominación de Origen (D.O.) "Grelos de Galicia", formada en el 2009, define las características del producto de la siguiente forma:

"Una vez preparado en condiciones de consumo, presenta las siguientes características organolépticas: verde intenso, más pronunciado a medida que la planta se acerca al punto de floración; sabor ligeramente ácido, combinado con cierto amargor; textura ligeramente fibrosa, más pronunciado si la variedad es de hoja estrecha con alto porcentaje de pecíolos; y dureza muy baja debido al contenido bajo de fibra".

Análisis estadístico

Se utilizó el análisis de la varianza (ANOVA) en combinación con el test de rango múltiple de Duncan, para evaluar estadísticamente las diferencias entre las medias obtenidas para los diferentes parámetros de calidad analizados. El valor de $\alpha < 0,05$ fue considerado como significativo. Los resultados se expresaron como medias. Se empleó el coeficiente de correlación de Pearson para medir la relación entre dos componentes de la fibra. Se utilizó el software estadístico SPSS versión 21.0 (SPSS Inc., Chicago, IL).

Resultados y Discusión

Glucosinolatos

Todos los resultados de los análisis de glucosinolatos realizados a nabizas y grelos se encuentran recogidos en Tablas en el ANEXO I (página 243): años 2013/14: nabizas (Tabla IV.1) y grelos (Tabla IV.2), años 2014/15: nabizas (Tabla IV.3) y grelos (Tabla IV.4).

En la Figura 1 se presenta un resumen del contenido medio de glucosinolatos en nabizas de 17 entradas (no hay datos de nabizas de las entradas BRS0140 y BRS0463). En la Figura 2 se representa el contenido medio de glucosinolatos de los grelos de las 12 entradas que los formaron.

En la temporada 2013/14 el cultivo de *Brassica rapa* se desarrolló con normalidad, y la cosecha de nabizas y grelos fue muy abundante en casi todas las entradas, de las 19 sembradas, 12 entradas formaron grelos. El contenido medio de glucosinolatos en nabizas fue mayor que el obtenido en grelos, en ambos, el glucosinolato mayoritario fue la gluconapina, como es habitual en la especie, en nabizas destacó la entrada BRS0438

con 41,21 $\mu\text{moles/g}$ materia seca y en grelos la entrada BRS0544 con 41,70 $\mu\text{moles/g}$ materia seca. En cuanto a la progoitrina se obtuvieron dos entradas BRS0471 y BRS0438 con unos valores más altos que el resto (3,07 y 5,70 $\mu\text{moles/g}$ materia seca).

NABIZAS 2013/14

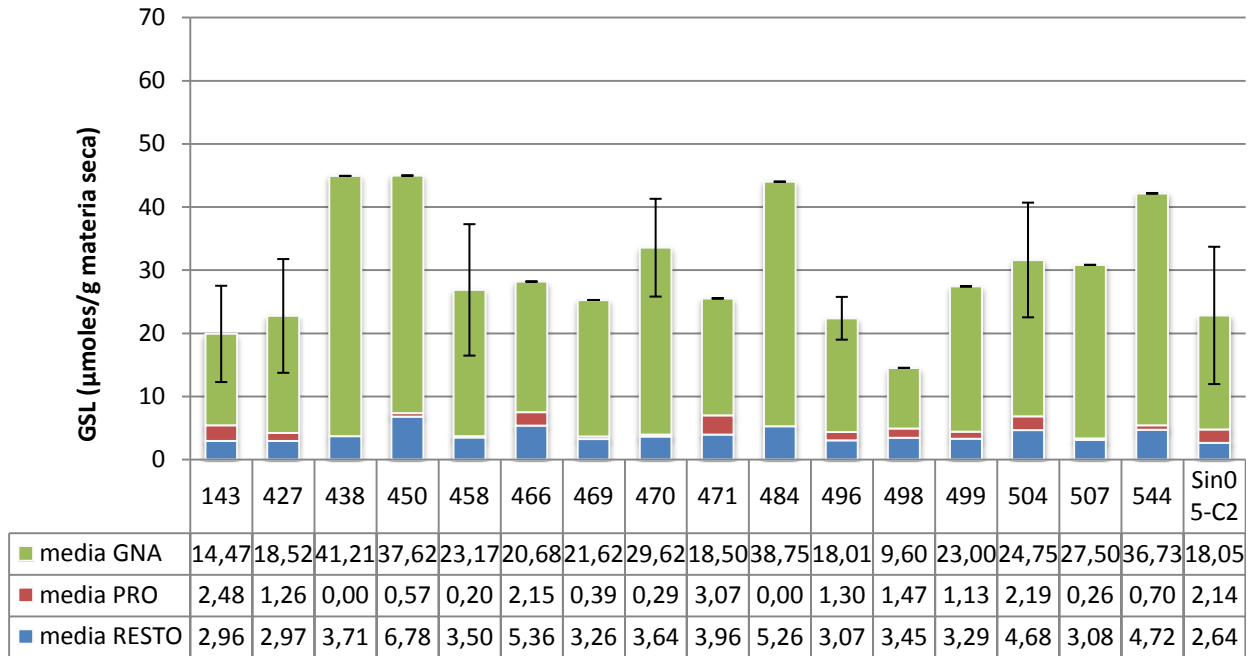


Figura 1. Contenido medio de gluconapina (GNA), progoitrina (PRO) y resto de glucosinolatos (RESTO) en nabizas de 17 entradas de *Brassica rapa*. Las barras de error representan la desviación estándar de los glucosinolatos totales.

GRELOS 2013/14

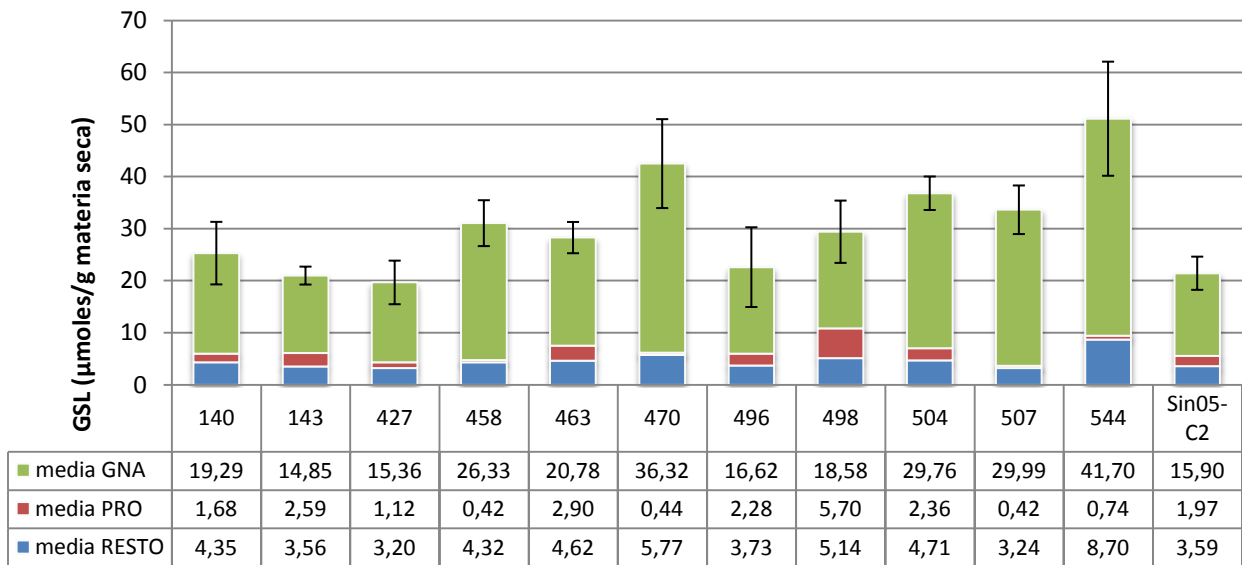


Figura 2. Contenido medio de gluconapina (GNA), progoitrina (PRO) y resto de glucosinolatos (RESTO) en grelos de 12 entradas de *Brassica rapa*. Las barras de error representan la desviación estándar de los glucosinolatos totales.

De las 12 entradas que formaron grelos en el año 2013/14, 6 fueron seleccionadas para la siembra en la temporada siguiente 2014/15. Esta selección fue en base al comportamiento de la entrada en campo y en función de la capacidad de formación de grelos.

En las Figura 3 y 4 se resume el contenido medio de glucosinolatos en nabizas y grelos de las 6 entradas seleccionadas durante la temporada 2014/15.

NABIZAS 2014/15

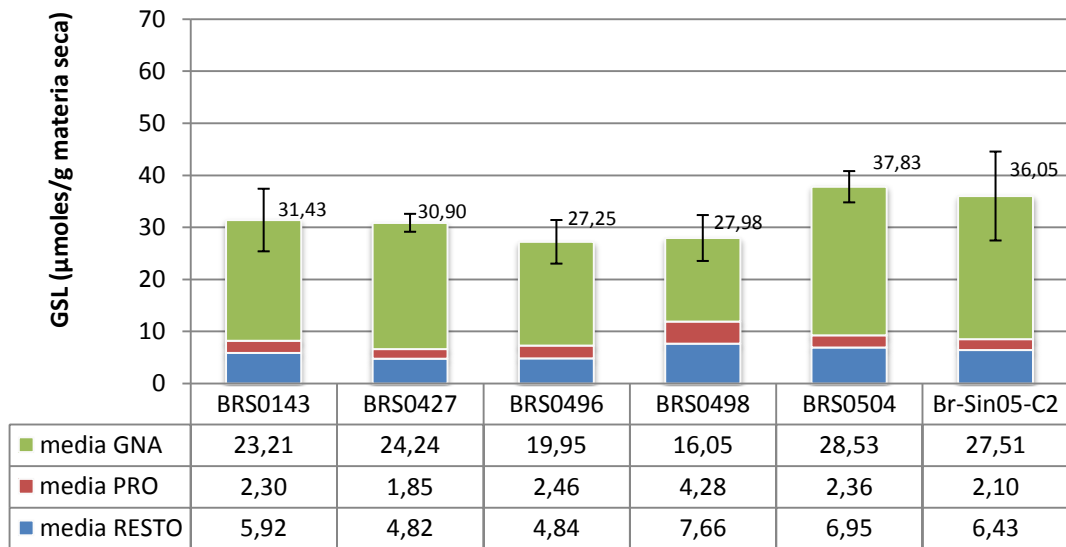


Figura 3. Contenido medio de GNA, PRO y resto de glucosinolatos (RESTO) de nabizas de las 6 entradas de *Brassica rapa*. Las barras de error representan la desviación estándar de los glucosinolatos totales.

Todas las entradas sembradas en la temporada 2014/15 formaron grelos. El contenido en glucosinolatos totales fue significativamente diferente ($p < 0,05$) entre nabizas y grelos. El intervalo de valores de glucosinolatos totales en nabizas fue (27,25-37,83 $\mu\text{moles/g}$ materia seca) más alto que el obtenido en grelos (14,49-29,95 $\mu\text{moles/g}$ materia seca).

Los contenidos medios en glucosinolatos totales entre las entradas no fueron significativamente diferentes ni en nabizas ni en grelos. Sin embargo, podemos señalar que en las nabizas la entrada BRS0498 presentó el contenido más bajo de glucosinolatos (27,25 $\mu\text{moles/g}$ materia seca) y la entrada BRS0504 el contenido más alto (37,98 $\mu\text{moles/g}$ materia seca), y esta tendencia se mantuvo también en los grelos.

GRELOS 2014/15

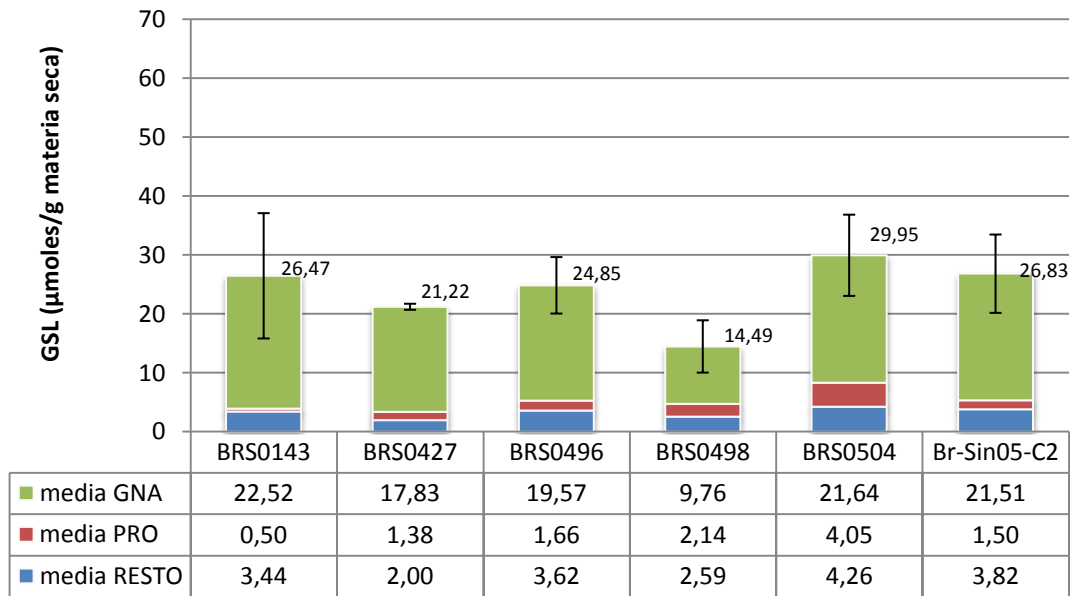


Figura 4. Contenido medio de GNA, PRO y resto de glucosinatos (RESTO) de grelos de las 6 entradas de *Brassica rapa*. Las barras de error representan la desviación estándar de los glucosinatos totales.

Las entradas BRS0143, BRS0504 y BRSin05-C2 presentaron altos contenidos en gluconapina, tanto en nabizas como en grelos. Existen numerosos trabajos que señalan que es un glucosinolato beneficioso para la salud por el poder quimiopreventivo de su producto de degradación (3-butenil-isotiocianato), el cual, es capaz de producir la muerte celular inducida principalmente a través de la necrosis de células tumorales (Kadir, 2015; Yamada, 2012; Mithen, 2001). Además, en esta tesis se ha estudiado la toxicidad celular de las nabizas, del glucosinolato mayoritario intacto (GNA) y de sus productos de hidrólisis, y hemos demostrado que *B. rapa* posee propiedades antiproliferativas en cultivos de células tumorales y podemos resaltar los beneficios del uso de entradas con alta concentración en GNA en la quimiopreención del cáncer (Capítulo VIII).

En cuanto a la progoitrina, es considerada como uno de los glucosinatos antinutricionales, ya que el isotiocianato 5-vinyloxazolidina-2-tiona (derivado de la progoitrina), interfiere en la absorción del yodo en animales monogástricos, provocando la hipertrofia del tiroides (Rosa, 1999). Cabe destacar que la progoitrina estuvo presente en todas las entradas de la colección, sin embargo, su nivel de concentración fue bajo en las entradas analizadas (de 0,5 a 4,05 μ moles/g materia seca). La entrada BRS0504 fue la que presentó el mayor contenido en progoitrina respecto a todas las demás.

Teniendo en cuenta los resultados de glucosinolatos obtenidos, estas entradas tienen gran potencial para desarrollar genotipos con altos niveles de glucosinolatos (entre ellos los más beneficiosos para la salud, como por ejemplo gluconapina) y niveles bajos en otros (los más perjudiciales para la salud, como por ejemplo progoitrina) en la localidad de Córdoba.

Componentes inorgánicos

Todos los resultados de los análisis de los componentes inorgánicos realizados a nabizas y grelos se encuentran recogidos en Tablas en el ANEXO I (página 249): Temporada 2013/14: nabizas (Tabla IV.5) y grelos (Tabla IV.6) y temporada 2014/15: nabizas (Tabla IV.7) y grelos (Tabla IV.8).

De las 19 entradas de la temporada 2013/14, sólo se analizaron 7 con el fin de tener una aproximación del contenido inorgánico de las nabizas y grelos en esta temporada en Córdoba. En la Figura 5 y 6 se muestran los resultados obtenidos de componentes inorgánicos en *Brassica rapa*, respectivamente.

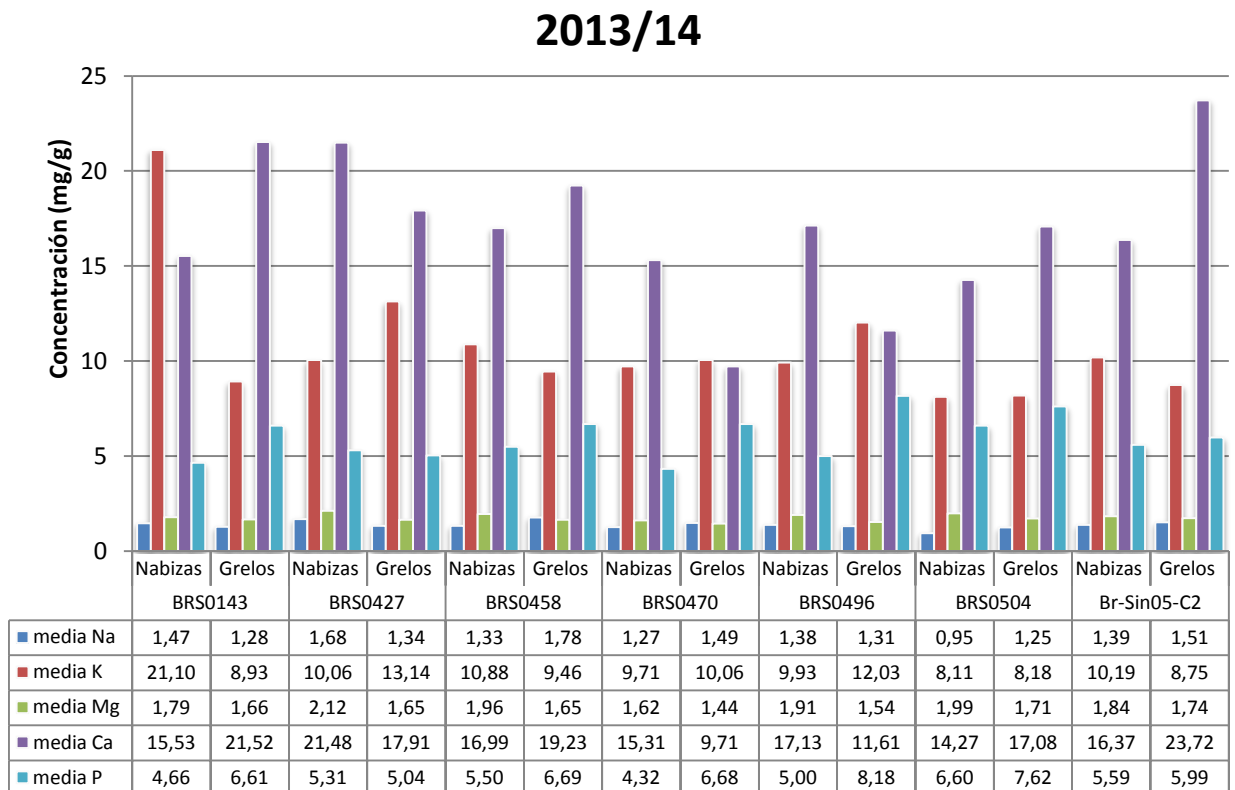


Figura 5. Contenido medio de minerales y eelectrolitos (mg/g de materia seca) en nabizas y grelos de 7 entradas de Córdoba en la temporada 2013-14.

De los electrolitos y minerales analizados destacó el intervalo del Ca que presentó valores entre 9,71 a 23,72 mg/g con un valor medio de 16,99 mg/g, mayor al publicado en BEDCA y al obtenido en Pontevedra en el 2009/10 (Capítulo III). En cuanto a los niveles de K también se observó una gran variabilidad respecto a este electrolito (8,11 a 21,10 mg/g). Del resto de minerales y electrolitos se observó que las concentraciones que presentan las nabizas y grelos de Córdoba están contenidas en intervalos habituales en estas verduras según la Base Española de Composición de Alimentos consultada (BEDCA).

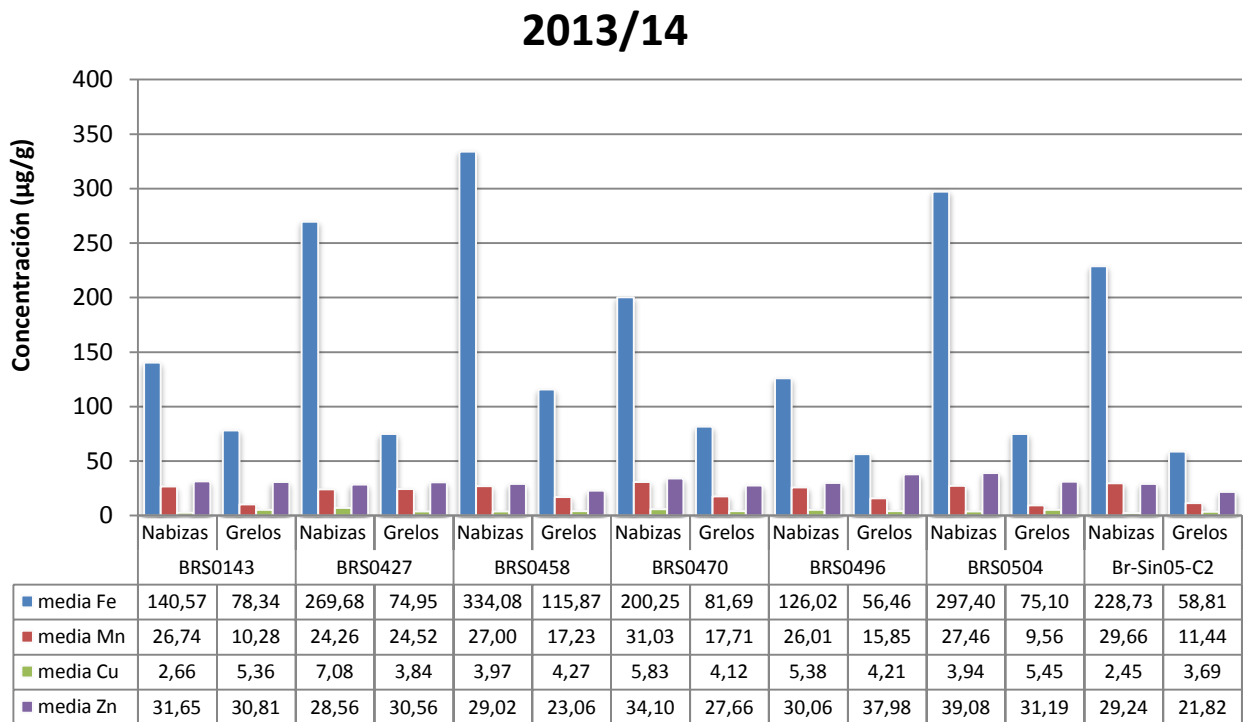
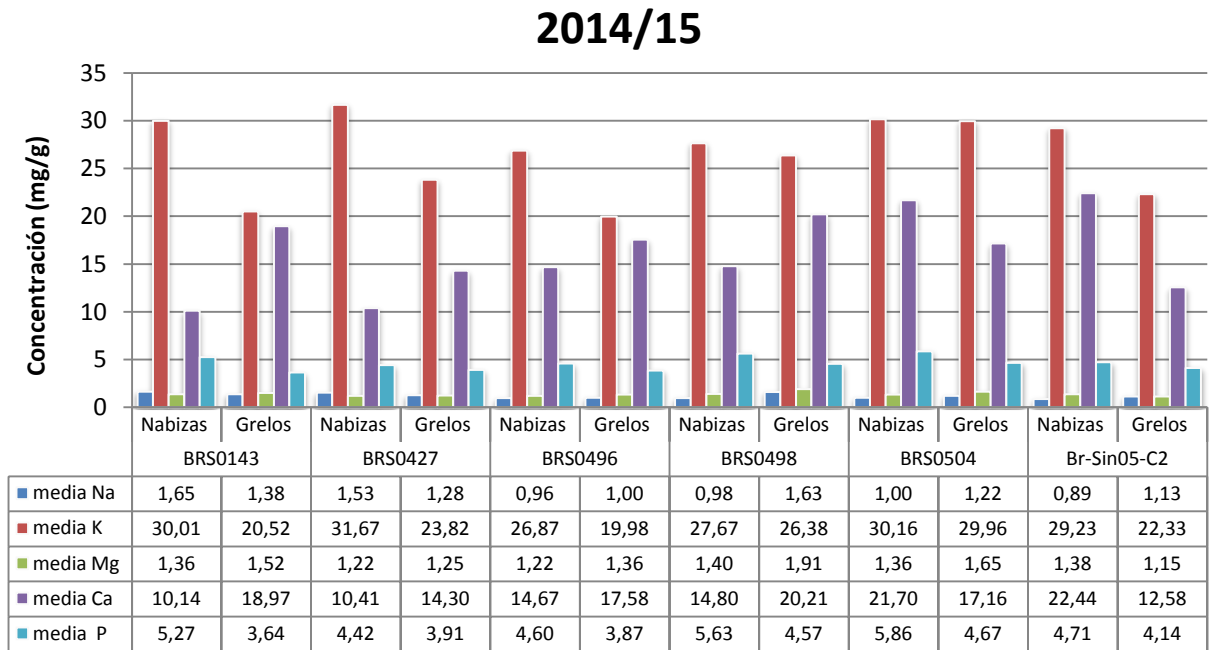


Figura 6. Contenido medio de elementos traza en nabizas y grelos de 7 entradas de *Brassica rapa* en la temporada 2013-14.

En cuanto a los elementos traza analizados (Figura 6), destacó la variabilidad encontrada en Fe entre las entradas principalmente en las nabizas, con valores comprendidos entre 58,81 a 334,08 µg/g, siendo la entrada BRS0458 la que presentó el contenido más alto. El resto de minerales Zn, Cu y Mn tienen baja variabilidad entre las entradas.

En la temporada 2014/15 (Figura 7 y 8), los intervalos de valores en el contenido de la mayoría de los componentes inorgánicos en las 6 entradas se mantienen respecto a la temporada 2013/14, a excepción del K que aumentó considerablemente su

concentración (de 20,31 a 31,67 mg/g), esto hizo que el contenido total de los minerales y electrolitos fuese superior en el año 2014/15 que en el año anterior.



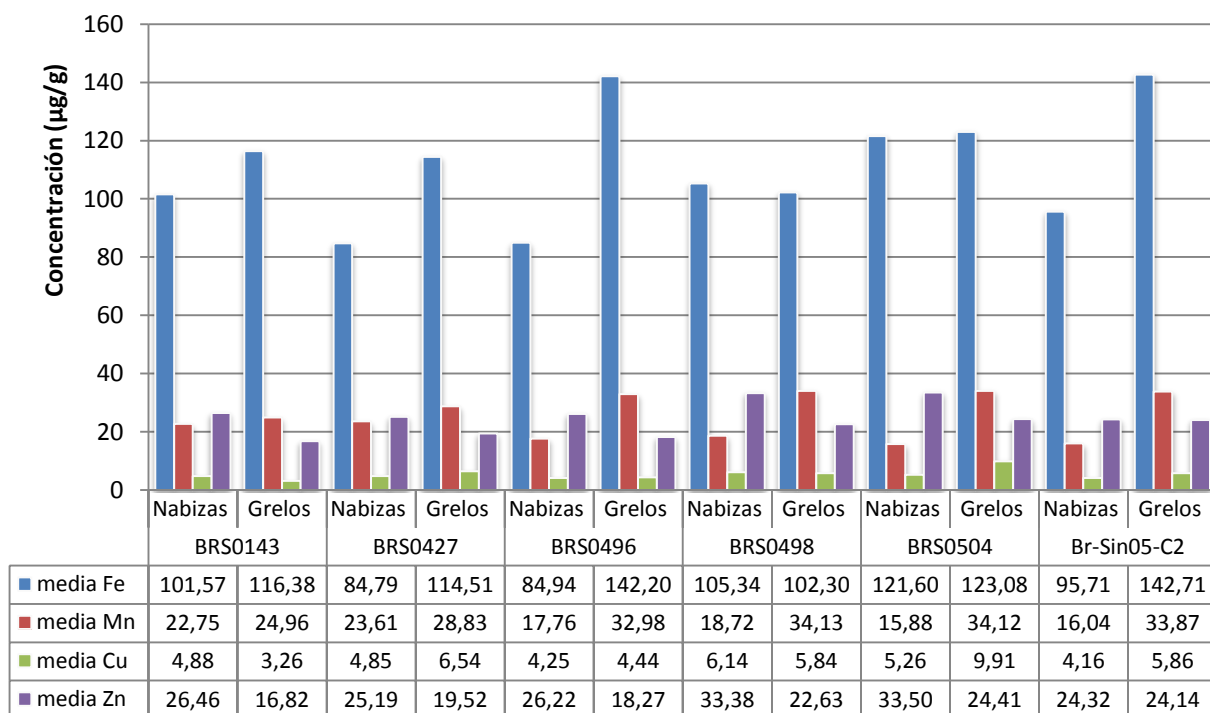
Mineral (mg/g)		BRS0143	BRS0427	BRS0496	BRS0498	BRS0504	BRSin05-C2
Mg	Grelos	1,52 ^{bc*}	1,25 ^{ab}	1,36 ^{ab}	1,91 ^d	1,65 ^{cd}	1,15 ^a
	Nabizas	10,14 ^a	10,41 ^a	14,67 ^a	14,80 ^a	21,70 ^b	22,44 ^b
Ca	Grelos	18,97 ^{bc}	14,30 ^{ab}	17,58 ^{abc}	20,21 ^c	17,16 ^{abc}	12,58 ^a

* Los valores de cada fila seguidos por distintas letras presentan diferencias estadísticamente significativas obtenidas por test de rango múltiple de Duncan ($p < 0,05$).

Figura 7. Contenido medio de minerales y electrolitos en nabizas y grelos de 6 entradas de Córdoba.

Se demuestra que tanto para nabizas como para grelos el contenido de Ca difiere significativamente según las entradas, en la Figura 7 se muestran las diferencias significativas según el test de rango múltiple de Duncan y separa en entradas altas, medias y bajas en Ca. Teniendo en cuenta datos bibliográficos de composición de minerales en verduras, llegamos a comprobar que nabizas y grelos son una de las verduras que mayor concentración de Ca poseen, junto con el cardo. El Mg también fue significativamente diferente en las distintas entradas de grelos.

2014/15



Mineral (µg/g)	BRS0143	BRS0427	BRS0496	BRS0498	BRS0504	Br-Sin05-C2
Cu Nabizas	4,88 ab*	4,85 ab	4,25 a	6,14 c	5,26 b	4,16 a
Zn Nabizas	26,46 a	25,19 a	26,22 a	33,38 b	33,50 b	24,32 a

* Los valores de cada fila seguidos por distintas letras presentan diferencias estadísticamente significativas obtenidas por test de rango múltiple de Duncan ($p < 0,05$).

Figura 8. Contenido medio de elementos traza en nabizas y grelos de 6 entradas de Córdoba.

En cuanto a los elementos traza, sólo en las nabizas se encuentran diferencias significativas en el contenido mineral de Zn y Cu (Figura 8). El contenido de Fe fue el que mayor concentración presentó, con un intervalo de 84,79 a 142,7 µg/g materia seca. En cuanto a la relación (Ca/P), las nabizas y grelos contienen una adecuada relación de ambos minerales, mayor proporción de Ca que de P. Una relación inversa podría tener repercusiones directas sobre la osteoporosis, favoreciendo la desmineralización ósea y movilizándolo el Ca óseo (NRC, 1989).

Fibra

El contenido de fibra en los vegetales es esencial para la digestibilidad del alimento; es reconocido que la ingesta de fibra proporciona muchos beneficios a la salud humana,

contribuyendo a la prevención de cáncer de colon y a reducir el riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares, infarto cerebral, hipertensión, diabetes, obesidad y ciertos desórdenes gastrointestinales (Anderson et al. 2009). Es un factor importante, por tanto, a tener en cuenta en la composición nutricional de las nabizas y grelos. Los métodos de análisis del contenido en fibra y sus componentes son caros, lentos, agresivos con el medio ambiente y necesitan mano de obra especializada para su aplicación. En nabizas y grelos en la temporada 2013/14 sólo se determinó la fibra ácido detergente de las muestras para tener una estimación aproximada del contenido de fibra. Todos los resultados de los análisis de fibra neutro detergente (FND) y ácido detergente (FAD) realizados a nabizas y grelos se encuentran recogidos en Tablas en el ANEXO I (página 255): Temporada 2013/14: nabizas y grelos (Tabla IV.9), temporada 2014/15: nabizas y grelos (Tabla IV.10).

En la Figura 9 se representa el contenido medio de FAD en nabizas y grelos de las 19 entradas sembradas en Córdoba. El intervalo de FAD en nabizas comprende valores de 10,84 a 13,52 % y el intervalo de valores en grelos es de 13,75 a 18,46% sobre masa seca, estadísticamente es clara la diferencia significativa obtenida en el contenido de fibra en ambas partes de la planta siendo mayor en los grelos. Esto es debido a que parte del grelo lo forman los tallos, una de las partes más fibrosas de la planta. El crecimiento de las plantas, aumenta la protección y firmeza de los tejidos, que en su mayoría consisten en lignina e hidratos de carbono estructurales, tales como celulosa y hemicelulosas. Por lo tanto, en la madurez de las plantas hay un aumento de los componentes estructurales que incrementan las cantidades de fibra (Arzani et al., 2004). En los grelos, la entrada con mayor contenido en FAD es la BRS507 con un contenido de 18,4% y el menor valor lo encontramos en la entrada BRS0496 (13,7%).

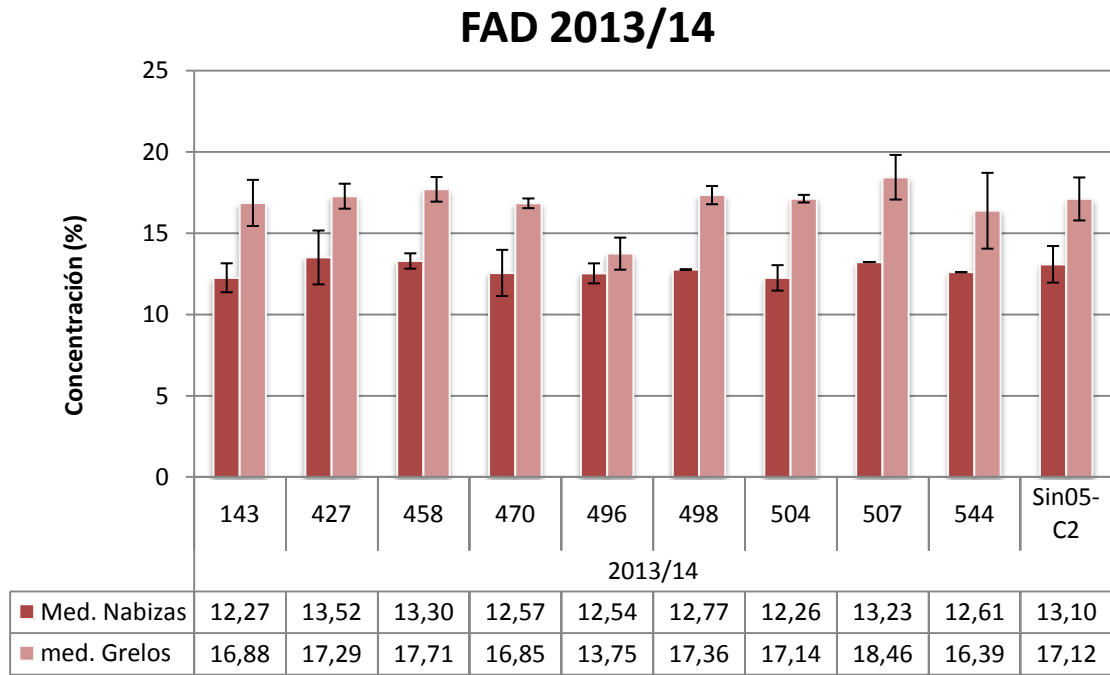
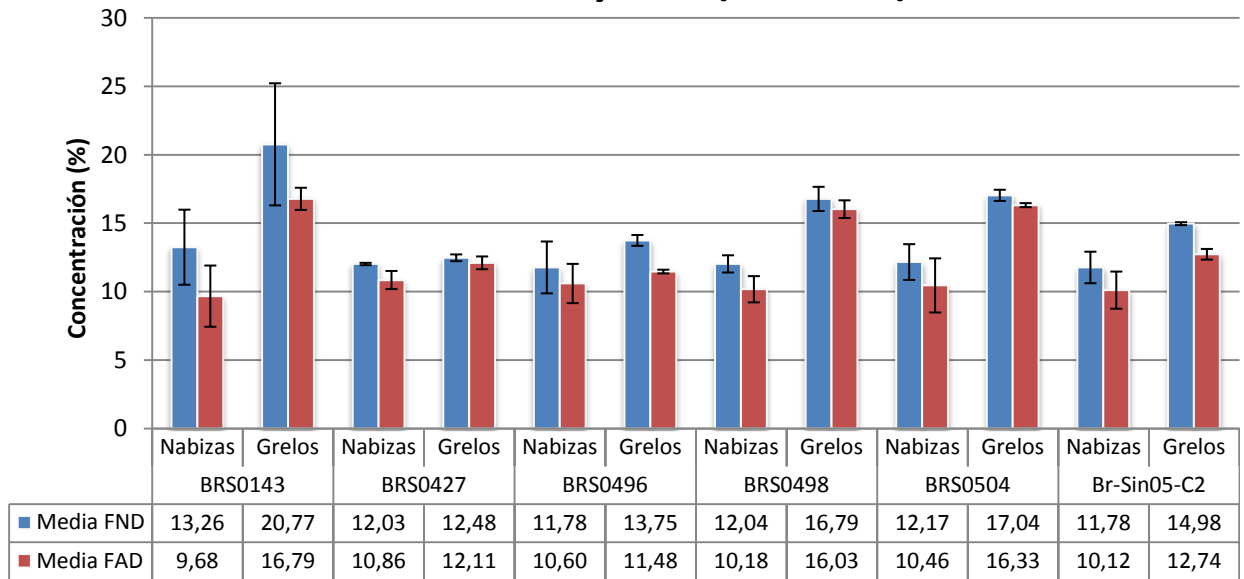


Figura 9. Contenido medio de fibra ácido detergente (FAD) en nabizas y grelos en Córdoba. Las barras de error representan la desviación estándar de los datos.

En la temporada 2014/15, se determinó la FND para la mejor caracterización de los componentes de la fibra en las nabizas y grelos de las entradas seleccionadas. Los resultados evidenciaron que el análisis de FAD es un buen estimador del contenido en fibra ya que se correlacionan positivamente, a valores altos en FAD le corresponden valores altos en FND, (coeficiente de correlación de Pearson de 0,861; la correlación es significativa al nivel 0,01) (Figura 10). En las nabizas el intervalo de valores para FND fue de 11,78 a 13,26% y en FAD entre 9,68 y 10,86%. El contenido de fibra en los grelos fue menor que en la temporada anterior, el intervalo de FND comprendió valores de 12,48 a 20,77% y el intervalo de FAD de 11,48 a 16,79 %, la entrada BRS0496 mantuvo el más bajo contenido de fibra (11,48%).

Los resultados obtenidos mostraron que los componentes FND y FAD tienen diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las entradas en los grelos pero no en nabizas, según el test de Duncan se diferencian significativamente entradas con bajo contenido (BRS0427), con valor medio (BRS0498) y con alto contenido en fibra (BRS0143), sin embargo la variabilidad en estas entradas es inferior a la publicada en otros trabajos, donde se presentaron valores de FAD en hojas de *Brassica rapa* de 23,50% (Türk et al. 2009); en fibra cruda de 12,9 % y en FAD de 23,5 % (Francisco et al. 2011).

FND y FAD (2014/15)



Fibra		BRS0143	BRS0427	BRS0496	BRS0498	BRS0504	BRSin05-C2
FND (%)	Grelos	20,77 ^{c*}	12,48 ^a	13,75 ^{ab}	16,79 ^b	17,04 ^{bc}	14,98 ^{ab}
FAD (%)	Grelos	16,79 ^b	12,11 ^a	11,48 ^a	16,03 ^b	16,33 ^b	12,74 ^a

* Los valores de cada fila seguidos por distintas letras presentan diferencias estadísticamente significativas obtenidas por test de rango múltiple de Duncan (p<0,05).

Figura 10. Contenido medio de fibra ácido detergente (FAD) y fibra neutro detergente (FND) en nabizas y grelos de 6 entradas en Córdoba.

Caracteres agronómicos

A lo largo del ciclo de cultivo de las 6 entradas de *Brassica rapa* sembradas en 2014/15 se evaluaron diversos caracteres agronómicos. En la Tabla 3 se incluyen además los datos de los caracteres agronómicos medidos en nabizas y grelos de cultivos en Pontevedra, estos datos sirvieron de referencia para evaluar el cultivo y el desarrollo de la planta en Córdoba.

Es notable la diferencia de la materia fresca por nabiza en ambas localidades, el peso fresco por hoja en Córdoba es menor que en Pontevedra, esto puede ser debido a las diferencias en condiciones ambientales de ambas localidades que determinan el nivel de desarrollo de la planta. En cambio en Córdoba se observó mayor número de grelos por planta y su producción media es un mes y medio más temprana respecto a Pontevedra. No obstante y de forma general, los resultados demuestran que la producción y

rendimiento del cultivo de nabizas y grelos es muy semejante a la de Pontevedra incluso pueden, en función de las condiciones ambientales, llegar a dar mejor producción en fresco que en determinados lugares de origen del cultivo.

Tabla 3. Caracteres agronómicos de la cosecha de nabizas y grelos 2014/15.

	Nabizas		Grelos				
	mf ^a /hoja (g)	H ^b (%)	mf/grelo (g)	H (%)	Tallos Secundarios (n°)	pf ^c (Kg)	T ^d
BR0143	6,04	80,94	49,46	90,85	20,58	0,96	120
BR0427	5,37	80,04	47,14	90,27	17,80	0,94	98
BR0496	5,85	80,69	33,44	90,33	12,14	0,55	98
BR0498	7,33	79,09	113,87	92,88	19,94	2,39	134
BR0504	7,55	81,80	107,11	93,09	19,39	2,22	134
BRSin05-C2	5,73	79,70	45,36	85,58	21,84	1,05	106
Promedio	6,43	80,38	66,06	90,50	18,62	1,35	115
*Promedio Pontevedra	22,12	90	63,02	91	12,13	0,97	162,3

*Fuente: Francisco, M. (2011)

^a Materia fresca. ^b Humedad. ^c Producción fresca. ^d Tiempo para producción de grelos (días desde trasplante a grelos)

Características organolépticas de nabizas y grelos.

El análisis sensorial de los grelos producidos en Córdoba se llevó a cabo en Pontevedra en un panel de cata con expertos. Se tomaron cuatro entradas comerciales de Galicia como muestras control (Control 1, 2, 3 y 4) y se compararon con 6 entradas sembradas en Córdoba y enviadas a Pontevedra para su evaluación.

Los resultados obtenidos en el panel de cata se resumen en la Tabla 4.

Tabla 4. Medias y error estándar del análisis sensorial de 4 entradas comerciales de grelos (controles), 6 entradas locales sembradas en Córdoba.

ENTRADA	SABOR	AMARGOR	DUREZA	FIBROSIDAD
Control 1	2.42 ± 0.29	4.25 ± 0.22	3.08 ± 0.29	3.50 ± 0.25
Control 2	3.75 ± 0.25	2.50 ± 0.23	2.83 ± 0.21	3.08 ± 0.23
Control 3	3.17 ± 0.39	3.75 ± 0.33	1.92 ± 0.23	1.92 ± 0.31
Control 4	3.44 ± 0.18	2.89 ± 0.26	3.22 ± 0.15	3.00 ± 0.24
BRS0143	3.58 ± 0.19	2.42 ± 0.29	3.08 ± 0.23	3.25 ± 0.18
BRS0427	3.33 ± 0.26	3.08 ± 0.19	3.17 ± 0.32	3.83 ± 0.24
BRS0496	4.00 ± 0.17	2.25 ± 0.18	2.58 ± 0.23	2.00 ± 0.25
BRS0498	3.22 ± 0.25	1.33 ± 0.15	2.44 ± 0.16	2.22 ± 0.25
BRS0504	2.67 ± 0.26	2.56 ± 0.37	2.22 ± 0.31	2.33 ± 0.18
BRSin05-C2	3.42 ± 0.26	3.33 ± 0.22	2.83 ± 0.21	2.75 ± 0.22

Si comparamos entre las entradas locales y comerciales se encontraron diferencias en cuanto a los 4 caracteres organolépticos evaluados (sabor, amargor, dureza y fibrosidad):

Sabor: el rango obtenido va de 2,42 a 4, siendo las entradas de mejor sabor las de escala mayor, en este caso y en orden decreciente son: BRS0496, C2, BRS0143, C4, BRSin05-C2, BRS0427.

Las entradas de peor sabor, con valores bajos en la escala fueron: C1, BRS0504.

Ninguna entrada obtuvo valores por debajo de 2,42 en el sabor, y los valores obtenidos en general estaban muy cercanos a los controles e incluso fueron superados por algunas entradas locales. De todas las entradas destacamos la BRS0496 por su sabor.

Amargor: el rango obtenido es de 1,33 a 4,25, es un rango muy amplio lo cual señala la gran diversidad que se da en todas las entradas en cuanto a este parámetro. Las entradas con mayor amargor (las más cercanas a 5 en la escala) fueron: C1 (4,3) y C3 (3,8). La entrada con menor amargor fue BRS0498 (1,7). Las entradas con niveles medios de amargor fueron: BRSin05-C2, BRS0427, C4, BRS0504.

Observando los datos obtenidos en los controles, el amargor es un parámetro característico en estas verduras y el consumidor lo acepta y lo espera al consumirlo.

Este parámetro puede estar relacionado directamente con el contenido en glucosinolatos y no necesariamente con la entrada que mayor concentración total de glucosinolatos tenga, ya que los productos de degradación son muy diversos y dependen directamente del glucosinolato en cuestión y la presencia de mirosinasa. Como ya hemos indicado la variabilidad en cuanto a la concentración de los diversos glucosinolatos en las entradas de *Brassica rapa* es muy grande y su nivel de degradación depende de muchos factores.

Textura: es la propiedad sensorial de los alimentos que es detectada por el tacto, la vista y el oído y que se manifiesta cuando el alimento sufre una deformación. El término “textura” reúne numerosos parámetros denominados “atributos de textura”. El análisis que se realizó en la cata implicó la evaluación de la dureza y fibrosidad.

Dureza: con este parámetro se determinó el grado de dureza de la verdura tras la cocción, el valor óptimo en la escala es de 3 (1 es una textura muy blanda y en el 5 una textura muy dura). Las entradas con mejor textura (valores de escala próximos a 3) fueron: C4, BRS0427, BRS0143, C1, C2, BRSin05-C2, BRS0496. Las entradas con peor textura (valores de escala próximos a 1 y a 5) fueron: C3, BRS0504 y BRS0498.

La sensación de dureza, depende, en gran medida, de la disposición de las células, de la adherencia entre ellas y de su turgencia. Cuando la adherencia entre las células es débil o se pierde, hay más células que se deslizan entre sí que células rotas, desaparece la firmeza, se dice que tienen menos *textura* (Vicent, 2003).

Fibrosidad: es una medida de textura que pretende determinar la mayor o menor sensación de fibras en la masticación y la resistencia de estas a perder su estructura. El rango estuvo comprendido entre valores de 1,9 - 3,8. Las entradas mejores en fibrosidad (valores más bajos) fueron: C3, BRS0496, BRS0498, BRS0504 y las entradas peores en fibrosidad (valores más altos) fueron: BRS0427, C1, BRS0143.

Los datos de cata fueron relacionados con los datos composicionales y destacaron tres entradas por sus características:

Los grelos de la entrada BRS0143 destacaron por su alto contenido en GNA y glucosinolatos totales y alto porcentaje en fibra. En cuanto al contenido mineral destaca

por su alto contenido en Ca. La valoración por el panel de cata es de mejor textura, sabor y valor medio de amargor.

Los grelos de la entrada BRS0496 destacaron por su alto contenido en Fe y en Ca y la valoración por el panel de cata es de mejor textura, sabor y valor medio de amargor. En este caso no destacaron por sus contenidos en glucosinolatos ni fibra, su contenido en GNA es medio dentro del rango obtenido al igual que su contenido en fibra.

Los grelos de la entrada BRS0498 destacaron por su sabor y textura con un amargor bajo, y a nivel composicional por su alto contenido en GNA, Fe, Ca, Mg, Cu y Zn y está clasificada por contenido medio en fibra.

Los grelos de las entradas BRS0498 y BRS0496 se caracterizaron por tener un contenido medio en fibra, recordemos que en la Denominación de Origen de "Grelos de Galicia" describen que el gredo es de dureza muy baja debido principalmente al bajo contenido en fibra (DOUE, 2009).

Conclusiones

El contenido en glucosinolatos totales fue significativamente diferente ($p < 0,05$) entre nabizas y grelos. El contenido medio de glucosinolatos totales, en nabizas (31,97 $\mu\text{moles/g}$ materia seca) fue mayor que la concentración media en grelos (23,97 $\mu\text{moles/g}$ materia seca). Todas mantuvieron el perfil de glucosinolatos respecto al cultivo control de Pontevedra, sin embargo, la concentración total e individual de glucosinolatos fue mayor que la obtenida en el control. Las entradas BRS0143, BRS0504 y BRSin05-C2 presentaron altos contenidos en gluconapina, tanto en nabizas como en grelos, por tanto, tienen gran potencial para desarrollar genotipos con altos niveles de glucosinolatos, entre ellos uno de los más beneficiosos para la salud.

Respecto al contenido en componentes inorgánicos los valores obtenidos en Córdoba estuvieron en consonancia con los datos publicados en la Base Española de Composición de Alimentos. De los minerales y electrolitos destacaron el alto contenido en Ca y K, con valores medios de 16,38 y 54,42 mg/g, respectivamente. El contenido en Ca difiere significativamente ($p < 0,05$) entre las entradas tanto en nabizas como en grelos. En nabizas se diferenciaron entradas con contenido alto (BRS0504 y BRSin05-C2) del resto de entradas. Estas diferencias no fueron significativas en los grelos

obtenidos de estas mismas entradas, que mostraron mayor variabilidad y destacó la entrada BRSin05-C2 por baja concentración (12,58 mg/g) y la entrada BRS0498 con alta concentración (20,22 mg/g). En cuanto a los elementos traza sólo en las nabizas se encuentran diferencias significativas en el contenido de Zn y Cu, y se evidencia un grupo con alto contenido en Zn, que diferencia a las entradas BRS0498 y BRS0504 del resto. La mayor concentración de Fe llegó a alcanzar un máximo de 142,87 µg/g en la entrada BRS0496.

En lo referente al contenido en fibra, los resultados obtenidos mostraron que las entradas difieren significativamente en el contenido medio de FND y FAD en los grelos pero no en nabizas. El test de rango múltiple de Duncan permitió establecer diferencias entre las entradas BRS0143 y BRS0504 con alto contenido en fibra, de las entradas BRS0498 y BRSin05-C2 con un contenido medio de fibra y de las entradas BRS0427 y BRS0496 con el menor contenido en fibra. Los resultados confirmaron que los grelos son una buena fuente de fibra con concentraciones altas, medias y bajas, lo que indicaría que este parámetro puede ser objetivo de mejora en estudios futuros de estas entradas.

La toma de datos y evaluación del cultivo según los caracteres agronómicos evaluados en campo permitió comprobar que la producción y rendimiento del cultivo de nabizas y grelos en Córdoba se comportó de forma muy semejante al cultivo control en Pontevedra. Se obtuvieron muy buenos valores de producción fresca de grelos y el número por planta también fue muy adecuado. A pesar de los datos favorables obtenidos, sería conveniente continuar con el trabajo de mejora genética para optimizar la homogeneidad y rendimiento del cultivo. En cuanto a los caracteres organolépticos, las mejores entradas fueron la BRS0496 que destacó por su sabor, su baja fibrosidad, poco amargor y niveles medios de textura. La entrada BRS0143 por su sabor y textura, niveles medios de amargor y fue bastante fibrosa. La BRSin05-C2 destacó por su sabor y textura, intermedia en amargor y por último la BRS0427 por su sabor y textura, valores intermedios en amargor e inadecuada en fibrosidad. La entrada menos valorada fue la BRS0504, que se puntuó bajo en sabor y textura, de forma intermedia respecto al amargor y poca fibrosidad.

Finalmente destacaron tres entradas por sus características organolépticas y sus datos de composición nutricional: BRS0143, BRS0498 y BRS0496. Los resultados demuestran que estas entradas reúnen las características nutricionales y organolépticas más

adecuadas para ser sembradas en el Sur de España y obtener verduras de calidad similar a los obtenidos en el lugar tradicional de cultivo.

En este estudio se ha seleccionado el material más idóneo para el cultivo de *Brassica rapa* en Córdoba y se han evaluado las partes cosechables óptimas para consumo (nabizas y grelos), atendiendo fundamentalmente al estudio del contenido de los glucosinolatos, minerales y fibra como factores de calidad del producto final. Todos los resultados obtenidos complementan y mejoran el conocimiento del cultivo de *Brassica rapa* para su adaptación a la región mediterránea. La introducción de estos nuevos cultivos en la zona permite aumentar la diversificación de productos hortícolas y estimular el consumo de verdura fresca en la población andaluza.

Agradecimientos

Agradecimiento al Ministerio de Economía y Competitividad del gobierno español por la financiación del proyecto *Genética y mejora de los cultivos de brásicas hortícolas*, Ref. AGL2006-04055 y al proyecto *Genética y Mejora de Brasicas hortícolas: papel de los metabolitos secundarios*, Ref. AGL2012-35539.

Referencias

- Anderson, J.W., Baird, P., Davis, Jr R.H., Ferreri, S., Knudtson, M., Koraym, A., Waters, V. and Williams, C.L. (2009). Health benefits of dietary fiber. *Nutrition Reviews*. 67(4), 188-205.
- Arzani, H., Zohdi, M., Fish, E., Zahedi Amiri G.H., Nikkhah, A and Wester, D. (2004). Phenological Effects on Forage Quality of Five Grass Species. *Rangeland Ecology & Management*. 57(6), 624-629.
- Association of Official Analytical Chemists Official Methods (AOAC) 991.25 (1991). Second supplement. In *Official methods of analysis*. (15th). Helrich, K. Eds. Arlington, Virginia (USA).
- Base de Datos Española de Composición de Alimentos (BEDCA): <http://www.bedca.net/bdpub/index.php>
- Cartea, M.E., De Haro, A., Obregón, S., Soengas, P. and Velasco, P. (2012). Glucosinolate variation in leaves of *Brassica rapa* crops. *Plant Foods Hum Nutr*. 67, 283-288.
- Diario Oficial de la Unión Europea (DOUE). (2009). Reglamento (CE) nº 510/2006 del Consejo «GRELOS DE GALICIA» Nº CE: ES-PGI-0005-0469-13.06.2005.
- Francisco, M., Velasco, P., Lema, M., Cartea, M.E. (2011). Genotypic and Environmental Effects on Agronomic and Nutritional Value of *Brassica rapa*. *Agron J*. 103,735-742.
- Goering, H.K. and Van Soest, P.J. (1970). Forage fiber analysis; apparatus, reagents, procedures, and some applications. USDA-ARS Agric. Handbook No. 379. U.S. Gov. Print. Office: Washington DC.
- IBPGR (1990). Descriptors for *Brassica* and *Raphanus*. International Board for Plant Genetic Resources. Rome, Italy.
- Isaac, R.A. and Johnson, W.C. (1990). Collaborative study of wet and dry ashing techniques for the elemental analysis of plant tissue by atomic absorption spectrophotometry. *Journal of AOAC International*. 58(3), 436-440.
- ISO norm (1992). Rapessed- Determination of glucosinolates content - Part 1: method using high-performance liquid chromatography. ISO 9167-1, 1-9.
- Kadir, N.H., David, R., Rossiter, J.T., Gooderham, N.J. (2015). The selective cytotoxicity of the alkenyl glucosinolate hydrolysis products and their presence in *Brassica* vegetables. *Toxicology*. 334, 59-71.

- Mithen R.F. (2001). Glucosinolates and their degradation product. *Adv Bot Res.* 35, 213-262.
- National Research Council (US) Subcommittee on the Tenth Edition of the Recommended Dietary Allowances. Recommended Dietary Allowances: 10th Edition. Washington (DC): National Academies Press (US); 1989.
- Real Decreto 1669/2009, de 6 de noviembre, por el que se modifica la norma de etiquetado sobre propiedades nutritivas de los productos alimenticios, aprobada por el Real Decreto 930/1992, de 17 de julio.
- Rosa, E.A.S. (1999). Chemical composition. In *Biology of Brassica coenospecies*. C. Gómez-Campo (eds). Amsterdam: Elsevier Science B.V. pp 315-357.
- Türk, M., Albayrak, S., Balabanli, C., Yüksel, O. (2009). Effects of fertilization on root and leaf yields and quality of forage turnip (*Brassica rapa* L.). *J Food, Agri Environ.* 7(34), 339-342.
- UPOV. 2001. Guidelines for the conduct of test for distinctness, uniformity and stability. Turnip (*Brassica rapa* L. var. *rapa*). Ginebra, Suiza.
- Wathelet, J.P., Wagstaffe, P., Boenke, A. (1991). The certification of the total glucosinolate and sulphur contents of three rapeseeds (colza), CRMs 190, 366 and 367. Commission of the European Communities, report EUR 13339 EN, 1-75.
- Yamada-Kato, T., Nagai, M. Ohnishi, M. and Yoshida, K. (2012). Inhibitory Effects of Wasabi Isothiocyanates on Chemical Mediator Release in RBL-2H3 Rat Basophilic Leukemia Cells. *J Nutr Sci Vitaminol.* 58, 303-307.



CAPÍTULO V

**Análisis del contenido
en minerales en nabizas
y grelos (*Brassica rapa*
L. var. rapa) mediante
reflectancia en el
infrarrojo cercano**

Artículo publicado en *CyTA- Journal of Food*

Obregón-Cano, S., Moreno-Rojas, R. Jurado-Millán, A. y De Haro-Bailón, A.

Capítulo V

Análisis del contenido en minerales en nabizas y grelos (*Brassica rapa* L. var. *rapa*) mediante reflectancia en el infrarrojo cercano.

Analysis of mineral content in turnip greens and turnip tops (*Brassica rapa* L. var. *rapa*) by Near-Infrared Reflectance Spectroscopy.

S. Obregón-Cano^{a*}, R. Moreno-Rojas^b, A.M. Jurado-Millán^a y A. De Haro-Bailón^a.

^a Departamento de Mejora Genética, Instituto de Agricultura Sostenible (CSIC), Alameda del Obispo s/n, C.P. 14004. Córdoba, España;

^b Departamento de Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Universidad de Córdoba, Campus Universitario Rabanales. Carretera Nacional IV Km. 396. C.P. 14014. Córdoba, España.

Agradecimientos

Agradecimiento al Ministerio de Economía y Competitividad del gobierno español por la financiación del proyecto: *Genética y Mejora de Brasicas hortícolas: papel de los metabolitos secundarios*. Referencia AGL2012-35539.

Resumen

El objetivo de este trabajo fue la evaluación del potencial de la espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS) para el análisis del contenido mineral en muestras liofilizadas de nabizas y grelos (*Brassica rapa* L. subsp. *rapa*). Se aplicó el método de mínimos cuadrados parciales modificados (MPLS) para desarrollar ecuaciones de calibración (n=298). Se evaluó la capacidad predictiva de las ecuaciones de calibración obtenidas mediante un lote de muestras (n=69) independientes del colectivo de calibración. Los coeficientes de determinación (r^2_{ve}) y errores de predicción (SEP) obtenidos en la validación externa para los distintos minerales fueron K=0,86(SEP=4,90) ; Ca=0,91(SEP=1,66); P=0,73(SEP=0,86) ; Mg=0,85(SEP=0,32) ; Na=0,87(SEP=0,21); Fe=0,90(SEP=60,48); Zn=0,80(SEP=5,83); Mn=0,81(SEP=5,72)y

Cu=0,62(SEP=1,13). Las ecuaciones para Ca y Fe fueron las que mostraron mayor capacidad predictiva. Estos resultados demuestran el potencial del NIRS para el análisis rápido, no destructivo y preciso del contenido mineral en nabizas y grelos.

Abstract

The objective of this study was to evaluate the potential and accuracy of near-infrared reflectance spectroscopy (NIRS) for predicting the mineral content in lyophilized samples of turnip greens and turnip tops (*Brassica rapa* L. subsp. *rapa*). Mathematical treatments of the spectra and modified partial least squares regression (MPLS) were used for developing calibrations equations (n=298). An independent set of samples (n=69) was used to evaluate and validate the performance of the calibrations equations. The coefficients of determination obtained in the external validation (r^2_{ev}) and error of prediction (SEP) for the different minerals were K=0.86 (SEP=4,90), Ca=0.91 (SEP=1,66), P=0.73 (SEP=0,86), Mg=0.85 (SEP=0,32), Na=0.87 (SEP=0,21), Fe=0.90 (SEP=60,48), Zn=0.80 (SEP=5,83), Mn=0.81 (SEP=5,72) and Cu=0.62 (SEP=1,13). The calibration equations obtained for Ca and Fe showed the highest predictive ability. These results support the idea that NIRS technology is suitable for the fast, non-destructive, and accurate prediction of mineral content in turnip greens and turnip tops.

Palabras Clave: *Brassica rapa*, NIRS, potasio, calcio, fósforo, magnesio, sodio, hierro, cinc, manganeso, cobre.

Keywords: *Brassica rapa*, NIRS, potassium, calcium, phosphorus, magnesium, sodium, iron, zinc, manganese, copper.

Introducción

Las especies pertenecientes a la familia de las Crucíferas están consideradas como uno de los primeros grupos de plantas domesticadas por el hombre, y desde entonces el hombre ha sido capaz, mediante selección, de modificar casi todas las partes de la planta (raíces, tallos, hojas, inflorescencias y semillas) con vistas a su uso alimentario (hortícola, oleaginosa, condimento, pienso), industrial (fabricación de plásticos, lubricantes, combustibles) y ambiental (fitorremediación, biofumigación). El consumo de las especies hortícolas de esta familia de plantas ha experimentado un fuerte aumento en los países industrializados en los últimos años, debido al descubrimiento de las propiedades saludables de una serie de compuestos exclusivos que contienen, los

glucosinolatos, capaces de proteger frente a la aparición de determinados tipos de cánceres (Farnham, Wilson, Stephenson & Fahey, 2004; Traka & Mithen 2009, Villatoro et al., 2012).

Brassica rapa fue la primera especie de *Brassica* domesticada por el hombre hace miles de años, apareciendo ya citada en la literatura sánscrita con el nombre de Siddharta, lo que prueba la antigüedad de su cultivo (Prakash, 1961). Existen numerosas subespecies de *B. rapa* originadas en dos centros de origen independientes, uno en Europa para los tipos oleaginosos y otro en Asia que dio lugar a las formas hortícolas (Gómez & Prakash, 1999).

En el norte de España y Portugal los cultivos hortícolas de *Brassica rapa* tienen una gran tradición, distribución y consumo, tanto en fresco como envasado (De Haro, Del Río, Cartea & Ordás, 2006). De la misma planta se cosechan los nabos, que son la raíz engrosada (hipocotilo), las nabizas, que son las hojas vegetativas, y los grelos que son los tallos junto con las hojas florales previos a la floración de la planta, formando parte de numerosos platos de la cocina tradicional (p. ej. “Lacón con grelos”). Estos alimentos, al igual que los procedentes de otras especies hortícolas de *Brassica* se caracterizan por su bajo contenido en grasa y proteína y su alto contenido en fibras, minerales y vitaminas. Comparados con otras hortalizas destacan por su elevado contenido en vitaminas A, C, E, B6, K, luteína, carotenoides y folatos (Rosa, 1999; Jahangir, Kim, Choi & Verpoorte, 2009; USDA, 2015). También son particularmente ricas en minerales potasio, cobre, magnesio, manganeso, hierro, cinc y calcio (D.E. Kopsell, D.A. Kopsell, Lefsrud, & Curran, 2004).

Los métodos tradicionales de análisis del contenido en minerales por vía húmeda, como por ejemplo la espectrometría de absorción atómica (AAS), la espectrometría de emisión atómica de plasma acoplado inductivamente (ICP-AES), o la espectrometría de masas de plasma acoplado inductivamente (ICP- MS) son caros, lentos, agresivos con el medio ambiente y necesitan mano de obra especializada para su aplicación. Como alternativa a estos métodos, desde los últimos 40 años se viene utilizando la espectroscopía por reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS) para el análisis de una gran diversidad de componentes de la calidad en los alimentos, así como de otras sustancias de interés para la industria farmacéutica (Chavez et al., 2015), química (Foster, Kakani, Ge & Mosali, 2013; Feng, Wu & Zeng, 2015), alimentaria, incluyendo frutas y verduras (Font, Del Río, Cartea & De Haro, 2005; Martínez, Font, Gómez, Blanco & Del Río, 2014; Schmitt, Garrigues & De la Guardia, 2014; Guo, Ni & Kokot,

2016) y agrícola (Dimov, Suprianto, Hermann & Möllers, 2012; Cozzolino, Fassio & Fernández, 2003; Font, Del Río & De Haro, 2006; Murray, 1986; Norris, Barnes, Moore & Shenk, 1976; Shenk & Westerhaus, 1993; Van Maarschalkerweerd & Husted, 2015).

Aunque los minerales no poseen bandas de absorción en la región del infrarrojo pueden estar asociados a estructuras orgánicas en forma de óxidos, quelatos u otras moléculas que permitan poder ser estimados mediante ecuaciones de calibración desarrolladas para el NIRS, como se ha comprobado en trabajos publicados previamente en otras matrices vegetales (Cozzolino & Moron, 2004; García et al., 2012; I. González, Hernández & J. M. González, 2007; Liao, Wu, Chen, Guo & Shi, 2012; Martínez, Font, Gómez, Blanco & Del Río, 2014; Menesatti et al. 2010; Plans, Simó, Casañas & Sabaté, 2012; Villatoro et al., 2012).

Teniendo en cuenta el creciente interés por este cultivo, y con vistas a su extensión a otras regiones de la Península Ibérica, desde los últimos años se están desarrollando programas de mejora genética que nos permitan obtener variedades de nabizas y grelos adaptadas a las condiciones edafoclimáticas mediterráneas y de alto valor nutracéutico, con especial énfasis en el estudio del contenido en minerales y glucosinolatos en sus partes consumibles.

El objetivo del presente trabajo fue estudiar las posibilidades del NIRS para el análisis rápido y preciso del contenido en potasio (K), calcio (Ca), fósforo (P), magnesio (Mg), sodio (Na), hierro (Fe), cinc (Zn), manganeso (Mn) y cobre (Cu) en muestras de nabizas y grelos.

Materiales y Métodos

Material Vegetal

Durante los años agrícolas 2010-2011, 2011-2012 y 2012-2013, un conjunto de 25 variedades de *Brassica rapa* L. subsp. *rapa* se cultivaron en la finca experimental del IAS de Córdoba, (37°51' N, 4°48'W, España) en un diseño de bloques al azar con 3 repeticiones. El clima es típico mediterráneo con un precipitación media de 650 mm, y el suelo es profundo, franco-arenoso, clasificado como Typic Xerofluvent.

Las variedades de *Brassica rapa* L. subsp. *rapa* procedían del Banco de Germoplasma de *Brassica* de la Misión Biológica de Galicia (CSIC), en donde habían sido evaluadas por sus características agronómicas y su aptitud para producción de nabizas y grelos. Durante cada año agrícola, y en el momento óptimo para consumo, se tomaron muestras

de nabizas (4 a 5 hojas por planta) y de grelos (3 a 4 tallos florales por planta) de las plantas seleccionadas para cada una de las variedades estudiadas. En total se cosecharon 373 muestras (228 de nabizas y 145 de grelos), de las cuales 135 se cosecharon en 2010-2011, 160 muestras procedían de la cosecha 2011-2012 y 78 muestras se cosecharon en 2012-2013. Todo el material vegetal se lavó a fondo con agua del grifo para eliminar la suciedad y el polvo de la superficie y se finalizó con un lavado en agua desionizada. A continuación se almacenaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el momento de su liofilización, que se realizó en un equipo Telstar® modelo Cryodos-50 (Telstar, Terrasa, Spain). Las muestras liofilizadas se molieron en un molino IKA-Labortechnik® modelo A10, durante 20 segundos y se almacenaron en desecador hasta el momento de ser analizadas por el método de referencia o por el equipo NIRS.

Análisis del contenido mineral por métodos de referencia

Los minerales analizados en las 373 muestras de nabizas y grelos fueron K, Ca, P, Mg, Na, Fe, Zn, Mn y Cu. La digestión de la muestra se realizó por vía húmeda con ácido nítrico y ácido perclórico (Isaac & Johnson, 1990). Los análisis de Ca, Mg, Fe, Mn, Zn y Cu se llevaron a cabo por espectrofotometría de absorción atómica y los de Na y K se hicieron por emisión atómica. El equipo utilizado fue un espectrofotómetro de absorción atómica Varian® modelo SpectrAA-50/55, con llama de aire-acetileno y lámparas de cátodo hueco de un solo elemento y corrección de fondo con lámpara de deuterio para el análisis de Mn. Para la determinación de Ca y Mg, se añadió cloruro de lantano a fin de evitar interferencias aniónicas. El análisis de P, como ácido molibdo-vanado-fosfórico, se hizo por colorimetría (AOAC, 1991) en un espectrofotómetro UV-visible (Beckman® modelo DU640).

Desarrollo de ecuaciones NIRS

Se utilizó un espectrofotómetro de infrarrojo cercano modelo 6500 (Foss-NIRSystems®, Inc., Silver Spring, MD, EE.UU.) para llevar a cabo los registros de los espectros de las muestras en modo de reflectancia. Se registró un espectro por cada muestra. Las muestras se colocaron en una cápsula redonda de 3 cm de diámetro, compuesta de vidrio de cuarzo y aluminio anodizado para evitar interferencias en la absorción. De cada muestra se obtuvieron los espectros de reflectancia en el intervalo de longitudes de onda de 400 a 2500 nm, a intervalos de 2 nm. La recogida de los datos

espectrales y el análisis quimiométrico de los mismos se llevó a cabo mediante el programa WinISI II v1,50 (Infrasoft International, Port Matilda, PA, USA).

La detección de anomalos espectrales se realizó mediante un análisis de componentes principales (PCA) aplicado a todo el conjunto de la población basado en el cálculo de la distancia de Mahalanobis (H) (Shenk & Westerhaus, 1991, 1996). Éste análisis además de ser una herramienta para la selección de muestras del colectivo de calibración, es una técnica de gran utilidad en el análisis para transformar los datos espectrales originales (valores de absorbancia) en nuevas variables (componentes principales) ortogonales, eliminando con ello la colinealidad (información redundante) (Martens & Næs, 1989). Se utilizó el algoritmo CENTER incluido en el programa WinISI II (versión 1.50 Infrasoft International, Port Matilda, PA, USA) para el cálculo de las distancias H entre los espectros de las distintas muestras respecto al espectro medio. De acuerdo con Shenk & Westerhaus (1991), las muestras con un valor del estadístico H superior a 3 unidades se definieron como espectros atípicos y se eliminaron para el desarrollo de las ecuaciones. Se encontraron un total de 6 espectros con valores de H comprendidos entre 3,045 y 21,33 que fueron eliminados del conjunto de muestras utilizado en el trabajo. El número final de muestras seleccionadas fue de 367 que fueron divididas en dos grupos: el conjunto de calibración compuesto por 298 muestras y fue usado para el desarrollo de las diferentes ecuaciones de calibración, y el grupo de validación externa formado por 69 muestras (20% del total) y fue usado para evaluar la capacidad predictiva de cada una de las ecuaciones desarrolladas. La selección de las muestras del grupo de validación externa se realizó a partir del listado de muestras ordenadas en base a sus valores de H, eligiendo 1 de cada 5 muestras del listado ordenado (Shenk & Westerhaus, 1991). De esta manera, las muestras de validación externa seleccionadas representan todo el intervalo de variabilidad del conjunto de la población (Hruschka, 2001). Para el desarrollo de las ecuaciones de calibración se aplicó el método de regresión por mínimos cuadrados parciales modificados (MPLS), del que se ha mostrado su utilidad para la evaluación de los minerales, utilizando todo el intervalo espectral (400-2500 nm) (Cozzolino & Moron, 2004; Font, Del Río & De Haro, 2006; I. González, Hernández & J.M. González, 2007; Martínez, Font, Gómez, Blanco & Del Río, 2014; Ward, Nielsen & Moller, 2011).

Se aplicó el procedimiento de corrección de espectros SNV+DT que proporciona el programa WinISI para eliminar la dispersión debida a los efectos causados por las diferencias en tamaño de partícula o la variación de longitud de camino entre la

dispersión de las muestras y ajustar la línea base (Barnes, Dhanoa & Lister, 1989). Los tratamientos matemáticos seleccionados aplicado a los espectros fueron (1, 4, 4, 1) y (2, 5, 5, 2), donde el primer número indica el orden de derivada (primera o segunda derivada del logaritmo de $1/R$), el segundo número es la amplitud o distancia entre los segmentos a sustraer, el tercer número es la longitud del segmento a ser suavizado y el cuarto número indica un segundo suavizado (Shenk, Workman & Westerhaus, 1992). Los estadísticos que definen las ecuaciones de calibración obtenidas son el coeficiente de determinación (R^2) que muestra el porcentaje de la variabilidad existente en las concentraciones de minerales explicado por la ecuación de regresión, y el error estándar de la calibración (SEC) que es el error estándar de los residuales para el colectivo de calibración. Hay que destacar que el error estándar de la calibración solamente nos indica el ajuste de los valores de referencia a la línea de regresión, por lo que no puede considerarse un estadístico adecuado para evaluar la validez de la ecuación de calibración obtenida (Shenk & Westerhaus, 1996).

Validación de las ecuaciones

Para evaluar la capacidad predictiva de las ecuaciones de calibración se utilizaron dos modelos de validación que permiten establecer una comparación (mediante diferentes criterios estadísticos) entre el valor verdadero (valor obtenido por método de referencia) y el valor estimado (valor obtenido por NIRS). En primer lugar se realizó una validación cruzada, basada únicamente en los datos empleados en la etapa de calibración, para calcular el número óptimo de términos de la regresión. El algoritmo selecciona diferentes colectivos de calibración y validación dentro del total de la población considerada, realizando con cada selección una simulación del algoritmo de regresión (Martens & Næs, 1989; Shenk & Westerhaus, 1991). Finalmente el programa de cálculo seleccionó la ecuación que hace mínimo el error estándar de validación cruzada (SECV). Los estadísticos resultantes de la validación cruzada fueron el coeficiente de determinación de la validación cruzada (r_{vc}^2), el error estándar de la validación cruzada (SECV), que representa el error estándar de los residuales para el colectivo de validación cruzada, y el estadístico (RPD) (Williams & Sobering, 1996) que es la relación entre la desviación estándar y el error estándar de la validación cruzada ($SD/SECV$). El RPD_{vc} es un estadístico que permite la evaluación del SECV en función de la desviación estándar de los datos de referencia para la población en estudio (Williams, 2001).

En segundo lugar se realizó una evaluación de las ecuaciones de calibración seleccionadas con muestras que no intervinieron en la calibración (colectivo de validación, $n=69$ en nuestro trabajo), proceso que se denomina validación externa (Shenk & Westerhaus, 1991; Font, 2003; Martínez et al., 2014; Kim, 2014; Bagchi, 2016; Lee, 2014; Sánchez, 2013). Las estadísticas de la validación externa incluyen el coeficiente de determinación de la validación (r^2_{ve}), el error estándar de predicción (SEP), el RPD_{ve} (que es la relación SD/SEP) y el RER (Williams & Sobering, 1996) que es la relación entre el intervalo de los datos de cada mineral y el error estándar de la predicción. Los estadísticos RPD y RER permiten la comparación del rendimiento del modelo a través de poblaciones con diferentes desviaciones estándar (Cozzolino & Moron, 2004).

Las mejores ecuaciones de calibración para cada mineral se seleccionaron considerando la combinación óptima de los siguientes estadísticos de la validación externa: altos valores de los coeficientes de determinación (r^2_{ve}) y altos valores de RPD_{ve} y de RER. Aquellas ecuaciones cuyo RPD es superior a 3 se consideran con excelente capacidad de predicción, las que tienen RPD entre 2 y 3 permiten realizar predicciones aproximadas, y aquellas cuyo RPD está entre 1,5 y 2 sólo pueden utilizarse con fines de clasificación en grupos de alto-medio-bajo contenido. Igualmente, los valores de RER obtenidos con las distintas ecuaciones de calibración con buena capacidad predictiva deben ser mayores de 10 (Williams & Sobering, 1996; Williams, 2001).

El error estándar de laboratorio (SEL) para el análisis de minerales se determinó y se comparó con el SEP para todas las ecuaciones. Se seleccionaron 10 muestras y se analizaron por duplicado en diferentes momentos y por diferentes analistas, para obtener una estimación del error total del método de referencia. La relación SEP/SEL también fue calculada, este estadístico permite relacionar el error de NIRS con el error en el método de referencia.

Resultados y Discusión

Análisis de referencia de minerales en Brassica rapa

El contenido en minerales de las muestras de nabizas y grelos analizadas por el método de referencia (vía húmeda) se muestra en la Tabla 1. Estos resultados confirman que *Brassica rapa* es una buena fuente de minerales con concentraciones muy altas en K (valor medio de 34,27 g / kg), Ca (13,38 g / kg) y P (4,93 g / kg) y concentraciones más

bajas de Na (1,18 g / kg), Mg (1,95 g / kg), Mn (33,15 mg / kg), Fe (269,19 mg / kg), Zn (39,2 mg / kg) y Cu (6.84 mg / kg). Estos valores superan a los encontrados en otras hortalizas como el calabacín (de 800 a 5100 mg/kg en la pulpa y de 100 a 5900 mg/kg en la piel) (Martínez, Font, Gómez, Blanco & Del Río, 2014). El intervalo de contenido en K encontrado en las muestras de nabizas y grelos (de 13,39 a 142,85 g/kg) también es alto y mayor que el encontrado en brócoli para este mineral (de 321,58 a 521,78 mg/100g muestra fresca) (Dos Santos et al., 2013).

Tabla 1. Contenido en minerales de las muestras (n= 373) de *Brassica rapa*, analizadas según el método de referencia

Table 1. Mineral content of *Brassica rapa* samples (n=373) analysed by reference method

Mineral	Intervalo	Media	SD^a
K (g/kg)	13,39-142,85	34,27	20,68
Ca (g/kg)	5,23-31,27	13,38	5,68
P (g/kg)	1,23-20,26	4,93	1,84
Mg (g/kg)	0,75-6,32	1,95	0,87
Na (g/kg)	0,16-5,89	1,18	1,37
Fe (mg/kg)	50-1727	269,19	290,19
Zn (mg/kg)	15,43-111,53	39,20	14,71
Mn (mg/kg)	7,34-219,51	33,15	19,68
Cu (mg/kg)	2,91-11,49	6,84	1,85

Nota: ^a Desviación estándar

Note: ^a Standard deviation

Calibración y Validación

Las muestras fueron divididas en el grupo de calibración (n=298) y grupo de validación externa (n=69). En la Tabla 2 se muestran el intervalo, la media, la desviación estándar y el coeficiente de variación del contenido en minerales de las muestras pertenecientes a estos grupos.

Tabla 2. Contenido en minerales del grupo de calibración y del grupo de validación externa de las muestras (n=373) de *Brassica rapa*, analizadas según el método de referencia.

Table 2. Mineral content of calibration and validation sets of *Brassica rapa* samples (n=373) analyzed by the reference method

Componente	grupo calibración (n =298)			grupo validación (n= 69)		
	Intervalo	Media	SD ^a	Intervalo	Media	SD ^a
K (g/kg)	13,39-95,97	30,79	12,83	14,96-83,2	31,08	12,23
Ca (g/kg)	5,24-27,08	12,98	5,21	5,69-30,14	13,21	5,42
P (g/kg)	1,29-9,94	4,87	1,65	1,74-9,59	4,80	1,60
Mg (g/kg)	0,75-3,98	1,89	0,81	0,78-4,05	1,93	0,82
Na (g/kg)	0,16-2,8	0,66	0,59	0,17-2,64	0,67	0,57
Fe (mg/kg)	50-980	206,47	177,53	55-917	217,56	193,01
Zn (mg/kg)	15,44-78,58	37,85	12,91	16,57-71,57	36,84	11,59
Mn (mg/kg)	7,34-64,75	29,54	12,33	9-67,27	29,88	13,01
Cu (mg/kg)	2,91-12,48	6,85	1,86	3,32-11,18	6,79	1,81

Nota:

^a Desviación estándar

Note:

^a Standard deviation

Los resultados de las ecuaciones de calibración obtenidas por regresión MPLS se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Estadísticos de calibración y de validación cruzada para contenido en minerales en muestras de *Brassica rapa* utilizando SNVD+DT y primera o segunda derivadas.

Table 3. Calibration and cross-validation statistics for mineral content in samples of *Brassica rapa* using SNVD+DT and first or second derivatives

Componente	Calibración (n=298)								Validación cruzada			
	TM ^a	Muestras	Intervalo	Media	SD ^b	SEL ^c	SEC ^d	R ^{2e}	SECV ^f	RPD _{vc} ^g	CV ^h	r ² _{vc} ⁱ
K (g/kg)	1,4,4,1	279	13,39-95,97	30,79	12,83	2,97	3,51	0,92	4,07	3,15	13,22	0,90
Ca (g/kg)	2,5,5,2	270	5,24-27,08	12,98	5,21	1,12	1,23	0,94	1,50	3,47	11,56	0,92
P (g/kg)	2,5,5,2	276	1,29-9,94	4,87	1,65	0,24	0,57	0,88	0,70	2,35	14,37	0,82
Mg (g/kg)	1,4,4,1	277	0,75-3,98	1,89	0,81	0,14	0,25	0,90	0,29	2,84	15,34	0,87
Na (g/kg)	2,5,5,2	260	0,16-2,8	0,66	0,59	0,04	0,16	0,93	0,19	3,02	28,79	0,89
Fe (mg/kg)	2,5,5,2	264	50-980	206,47	177,53	22,30	45,95	0,93	57,56	3,08	27,88	0,89
Zn (mg/kg)	2,5,5,2	274	15,44-78,58	37,85	12,91	4,23	5,03	0,85	5,69	2,27	15,03	0,80
Mn (mg/kg)	1,4,4,1	277	7,34-64,75	29,54	12,33	2,42	3,80	0,90	4,43	2,78	15,00	0,87
Cu (mg/kg)	2,5,5,2	279	2,91-12,48	6,85	1,86	0,63	0,98	0,72	1,08	1,73	15,77	0,66

Nota:

^a Tratamiento matemático de los espectros.

^b Desviación estándar.

^c Error estándar de laboratorio

^d Error estándar de la calibración.

^e Coeficiente de determinación de la calibración.

^f Error estándar de la validación cruzada.

^g Relación entre la desviación estándar y el error estándar de la validación cruzada. ^h Coeficiente de variación (%): relación entre el SECV y el valor medio

ⁱ Coeficiente de determinación de la validación cruzada.

Note:

^a Mathematical treatment of spectra.

^b Standard deviation.

^c Standard error of laboratory

^d Standard error of calibration.

^e Coefficient of determination of the calibration.

^f Standard error of cross validation.

^g Ratio Performance Deviation: Ratio of the standard deviation to standard error of cross validation.

^h Coefficient of variation (%): Ratio of SECV to mean

ⁱ Coefficient of determination in the cross validation.

Para el desarrollo de las ecuaciones NIRS de los minerales Na, Ca, P, Fe, Cu, Zn, se obtuvieron los mejores resultados aplicando la segunda derivada a los datos espectrales (2, 5, 5, 2; SNV + DT). En el caso de K, Mn y Mg los mejores resultados se obtuvieron tras aplicar la primera derivada a los datos espectrales (1, 4, 4, 1; SNV + DT). Todas las ecuaciones obtenidas presentaron unos valores altos en el coeficiente de determinación de la calibración, superiores a 0,9 para Ca (0,94), Fe (0,93), Na (0,93), K (0,92), Mg (0,9) y Mn (0,9), siendo inferiores para P (0,88), Zn (0,85) y Cu (0,72) (Tabla 3). Un coeficiente de determinación mayor de 0,9 indica que más del 90% de la varianza en los datos puede ser explicada por el modelo desarrollado, el 10% restante es atribuible a otros factores como la preparación de la muestra o los análisis de referencia (Williams, 2001). Los R^2 obtenidos para cada uno de los minerales resultaron más altos que los obtenidos en otras verduras como *Eruca vesicaria* Na=0,66, Cu=0,52, Fe=0,78, Mn=0,41, K=0,79, Ca=0,39, Mg=0,44 y Zn=0,71 (Villatoro et al., 2012).

Las ecuaciones de calibración finales para cada mineral fueron seleccionadas en base a maximizar el r^2_{vc} y a minimizar el SECV. Los valores de estos estadísticos obtenidos para las ecuaciones de calibración de los diferentes minerales fueron, de mayor a menor: Ca=0,92 (SECV=1,5); K=0,9 (4,07); Na=0,89 (0,19); Fe=0,89 (57,56); Mg=0,87 (0,29); Mn=0,87 (4,43); P=0,82 (0,7); Zn=0,8 (5,69) y Cu=0,66 (1,08). El intervalo de los valores del coeficiente de variación (CV) de la validación cruzada está comprendido entre 11,56% para el Ca y 28,79% para el Na; en la validación externa el intervalo del CV para los distintos minerales está comprendido entre el 12,57% para el Ca y el 31,34% para el Na. Estos valores son similares a los obtenidos por otros autores en calabacín, en donde el intervalo del CV de la validación cruzada está comprendido entre el 12,22% del Zn y 45,71% del Cu, y en la validación externa el intervalo del CV está comprendido entre 13,73% de Mg al 65,38% del Cu (Martínez, Font, Gómez, Blanco-Díaz & Del Río, 2014). Los valores de RPD_{vc} de la validación cruzada para cada mineral varían entre 3,47 para el Ca y 1,73 para el Cu (Tabla 3). En algunos casos (Ca,

Mg), estos valores superan a los descritos en la bibliografía para los mismos minerales contenidos en otras matrices vegetales: en alfalfa Ca=3,10 (González, I., Hernández, & González, J. M., 2007); en hojas de naranja Ca=1,5 y Mg=2 (Menesatti et al, 2010); en *Eruca vesicaria* Ca=0,78 y Mg=1,1 (Villatoro et al, 2012) y en tomate Ca=2,73 y Mg=2,51 (García et al, 2012); y en otros minerales los valores obtenidos en este trabajo también superan a otros descritos en cidra: K=1,2, P=1,4 y Fe=1,7 (Liao, Wu, Chen, Guo, & Shi, 2012). Merece la pena destacar el RPD_{vc} obtenido para la ecuación de calibración del Ca (3,47) ya que está considerado un micronutriente esencial que, en el norte de España y Portugal, es aportado a la dieta fundamentalmente a través del consumo de plantas de *Brassica* como las nabizas y los grelos. Los valores de RPD_{vc} superiores a 3 que se obtuvieron para Ca, K, Na y Fe son indicativos de que las ecuaciones de calibración pueden utilizarse con fines de diagnóstico e investigación. Las ecuaciones para el resto de los minerales, con una RPD_{vc} inferior a 3, solamente permiten realizar una predicción aproximada del contenido en dichos minerales (Williams & Sobering, 1996). En la Figura 1 se representan los valores de laboratorio frente a los de predicción de NIRS para los minerales objeto de nuestro estudio en el grupo de muestras de la validación cruzada.

Una vez seleccionadas las ecuaciones de calibración para cada mineral, se procedió a su evaluación mediante el empleo de las mismas para la predicción del colectivo de validación, que contenía espectros de 69 muestras de nabizas y grelos, no incluidas en la calibración. En la Tabla 4, presentamos los estadísticos de la validación externa obtenidos para las ecuaciones de cada uno de los minerales estudiados.

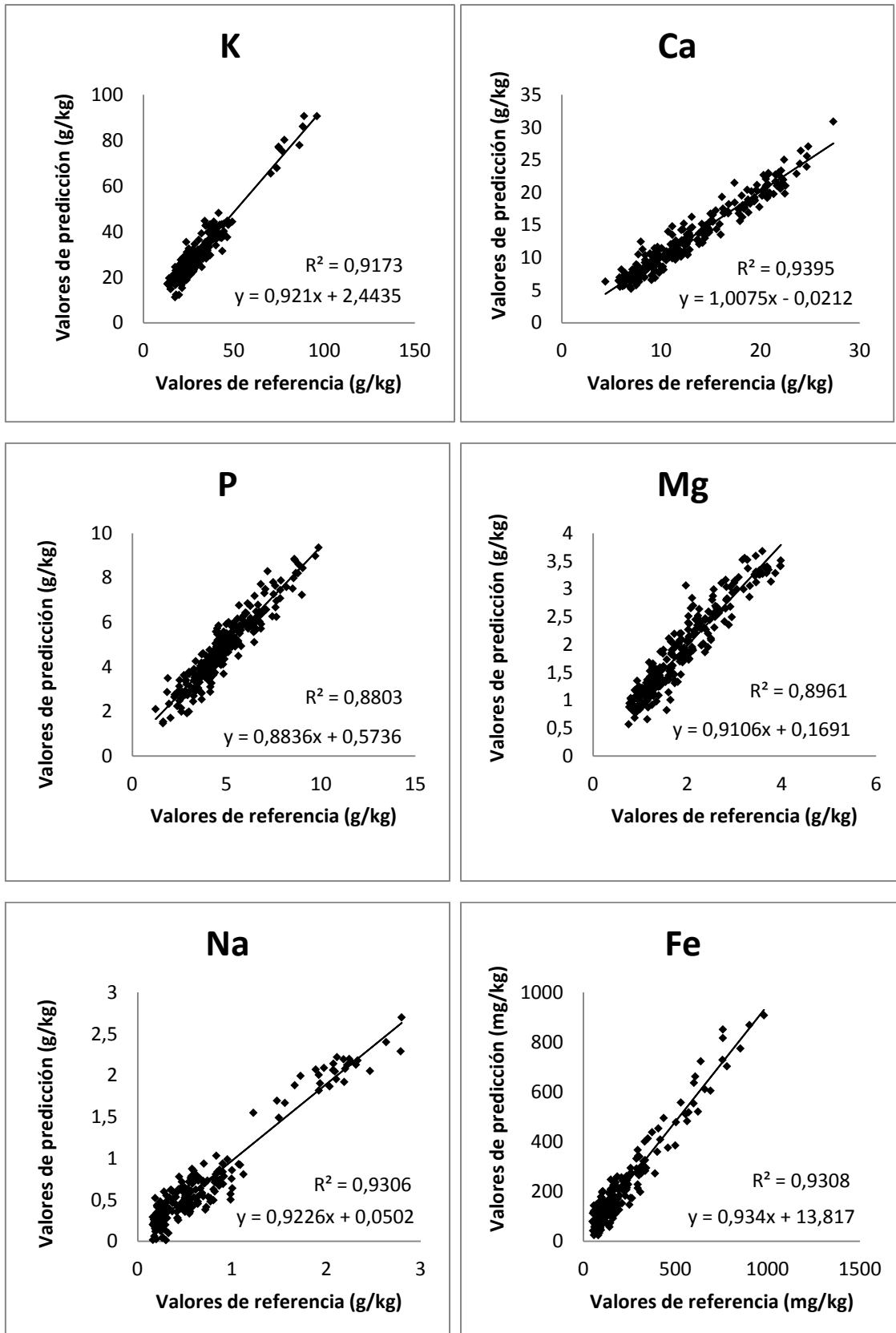


Figura 1. Representación gráfica de los valores de referencia frente a los valores de predicción en validación cruzada respecto al contenido en minerales de *Brassica rapa*.

Figure 1. Scatter plot of reference data vs. predicted values by NIRS of mineral content in *Brassica rapa*.

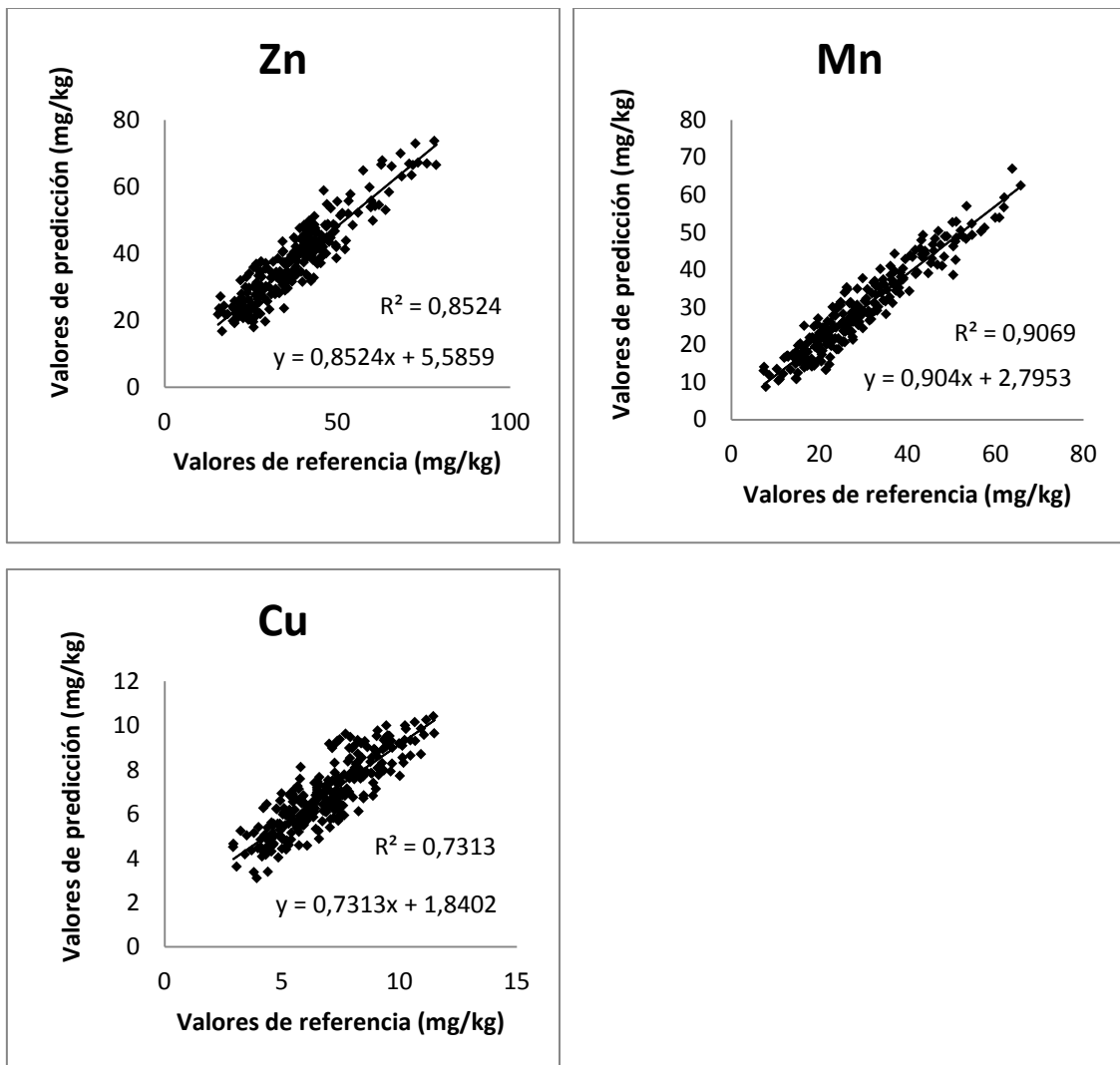


Figura 1 (continuación). Representación gráfica de los valores de referencia frente a los valores de predicción en validación cruzada respecto al contenido en minerales de *Brassica rapa*.

Figure 1 (cont.). Scatter plot of reference data vs. predicted values by NIRS of mineral content in *Brassica rapa*.

En general se obtuvieron elevados valores para los coeficientes de determinación de la predicción (r^2_{ve}) de las ecuaciones de la mayoría de los minerales: Ca (0,91), Fe (0,9), Na (0,87), K (0,86), Mg (0,85), Mn (0,81) y Zn (0,8), siendo los más bajos los del P (0,73) y del Cu (0,62) (Tabla 4). Los valores de RPD_{ve} más altos se obtuvieron para Fe (3,11), Ca (3,10), Na (2,71) y K (2,68), confirmando los resultados de RPD_{ve} obtenidos en la validación cruzada, así como su utilidad para predecir el contenido de estos minerales en muestras independientes a las utilizadas en la calibración. Comparados con la bibliografía (Plans, Simó, Casañas & Sabaté, 2004; Martínez, Font, Gómez, Blanco & Del Río, 2014) los valores de RPD_{ve} obtenidos en nuestro trabajo para los minerales

K (2,68), Mg (2,50), Na (2,71), Fe (3,11), Mn (2,18), P (1,83), Ca (3,10), Zn (1,76) y Cu (1,35) son los más altos descritos hasta ahora, del mismo orden respecto al Ca, e inferiores a los valores descritos en otras matrices vegetales respecto al Zn y Cu.

Tabla 4. Estadísticos de la validación externa (n=69) aplicados a las ecuaciones de calibración del contenido mineral de *Brassica rapa*.

Table 4. Statistics of external validation (n=69) applied to the calibration equations of mineral content in *Brassica rapa*.

Componente	Intervalo	Media	SD ^a	SEP ^b	r ² _{ve} ^c	RPD _{ve} ^d	RER ^e	CV ^f
K (g/kg)	14,96-83,2	31,08	12,23	4,90	0,86	2,68	13,93	15,77
Ca (g/kg)	5,69-30,14	13,21	5,42	1,66	0,91	3,10	14,73	12,57
P (g/kg)	1,74-9,59	4,80	1,60	0,86	0,73	1,83	9,13	17,92
Mg (g/kg)	0,78-4,05	1,93	0,82	0,32	0,85	2,50	10,22	16,58
Na (g/kg)	0,17-2,64	0,67	0,57	0,21	0,87	2,71	11,76	31,34
Fe (mg/kg)	55-917	217,56	193,01	60,48	0,90	3,11	14,25	27,80
Zn (mg/kg)	16,57-71,57	36,84	11,59	5,83	0,80	1,76	9,43	15,83
Mn (mg/kg)	9-67,27	29,88	13,01	5,72	0,81	2,18	10,19	19,14
Cu (mg/kg)	3,32-11,18	6,79	1,81	1,13	0,62	1,35	6,96	16,64

Nota:

^a Desviación estándar de los datos de referencia del colectivo de validación externa.

^b Error estándar de la predicción.

^c Coeficiente de determinación de la validación externa.

^d Relación entre la desviación estándar y el error estándar de la predicción.

^e Relación entre el intervalo de datos y el error estándar de la predicción.

^f Coeficiente de variación (%): Relación entre el SEP y valor medio

Note:

^a Standard deviation of the reference data of external validation.

^b Standard error of prediction.

^c Coefficient of determination in the external validation.

^d Ratio Performance Deviation: Ratio of the standard deviation to standard error of prediction.

^e Ratio of the range to standard error of prediction.

^f Coefficient of variation (%): Ratio of SEP to mean

Se obtuvieron valores de RER superiores a 10 en los siguientes minerales: Ca (RER=14,73), Fe (14,25), K (13,93), Na (RER=11,76), Mg (RER=10,22) y Mn (10,19), lo que es una prueba adicional de la elevada capacidad predictiva de los modelos de calibración desarrollados para estos minerales (Williams & Sobering, 1996; Williams 2001).

Para evaluar la capacidad de precisión de las ecuaciones en relación al error del método de referencia se calculó el SEL para cada mineral y se relacionó con el SEP (SEP /

SEL). En base a los valores de la relación SEP/SEL se puede decir que la precisión de las ecuaciones para los distintos minerales se puede clasificar como de excelente exactitud para K (SEP/SEL=1,65), Ca (SEP/SEL=1,48), Zn (SEP/SEL=1,38) y Cu (SEP/SEL=1,79); de buena exactitud para P (SEP/SEL=3,58), Mg (SEP/SEL=2,29), Fe (SEP/SEL=2,71) y Mn (SEP/SEL=2,36); y de baja exactitud para Na (SEP/SEL=5,25) (Font, Del Río, Fernández & De Haro, 2003). Los resultados obtenidos tanto en la validación cruzada como en la validación externa confirman la fiabilidad y capacidad de las ecuaciones de calibración desarrolladas para predecir de forma exacta y precisa el contenido en Ca y Fe en muestras de nabizas y grelos a partir de sus espectros de reflectancia en el infrarrojo cercano. Estas ecuaciones permiten utilizar la técnica NIRS para el análisis del contenido en Ca y Fe con fines de investigación, de control de calidad y cribado en *Brassica rapa*, lo que tiene especial importancia si se considera que los cultivos de esta especie son básicos en la dieta de las poblaciones del norte de España y Portugal, así como la importancia de estos minerales en la nutrición humana. Cabe señalar que las nabizas y los grelos tienen una alta concentración en calcio que es altamente biodisponible debido a estar asociado con bajos niveles de los ácidos oxálico y fítico (Lucarini et al. 1999).

En el caso de K, Na y Mg se obtuvieron valores de RPD_{ve} iguales o superiores a 2,5 y valores de RER superiores a 10, lo que las define como calibraciones aceptables para la predicción de estos minerales. El modelo desarrollado para el Mn obtuvo un valor de RPD_{ve} de 2,18 y de RER superior a 10, indicando que la ecuación de calibración solamente es utilizable para realizar predicciones cuantitativas aproximadas del contenido mineral. Los estadísticos obtenidos en la validación externa de las ecuaciones de P y Zn nos indican que solamente pueden ser utilizadas para asignar las muestras analizadas a grupos de alto, medio y bajo contenido para estos minerales. Finalmente, la ecuación obtenida para Cu no permite predecir de forma fiable el contenido de este mineral a partir de sus espectros NIRS, como ya había sido puesto en evidencia para este mismo mineral en trabajos previos de Cozzolino (2004) y de Martínez et al. (2014). Por lo tanto, sería necesario aumentar el colectivo de muestras de calibración con nuevas muestras que aumenten el intervalo de variabilidad respecto al contenido en este mineral, con vistas a seguir estudiando el potencial de la técnica NIRS para predecir este mineral.

Conclusiones

Se han desarrollado por primera vez ecuaciones de calibración que permiten la utilización de la espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS) para el análisis rápido, simultáneo y preciso del contenido en Ca, Fe, K, Na y Mg en muestras de nabizas y grelos, al mismo tiempo que se puede obtener también una estimación aproximada del contenido en Mn, P y Zn.

Estos resultados demuestran la utilidad de la técnica NIRS como una herramienta fundamental tanto en los programas de mejora genética de la calidad de *Brassica rapa* L. subsp. *rapa*, (facilitando y abaratando las tareas de cribado, caracterización y selección de genotipos), como en los trabajos de control de la calidad nutritiva de los productos obtenidos.

Referencias

- Association of Official Analytical Chemists Official Methods 991.25 (1991). Second supplement. *Official methods of analysis*. (15th). In Helrich, K. Eds. Arlington, Virginia, USA.
- Bagchi, T. B., Sharma, S., & Chattopadhyay, K. (2016). Development of NIRS models to predict protein and amylose content of brown rice and proximate compositions of rice bran, *Food Chemistry*, 191, 21-27.
- Barnes, R.J., Dhanoa, M.S. & Lister, S.J. (1989). Standard Normal Variate Transformation and De-trending of Near-infrared Diffuse Reflectance Spectra. *Applied Spectroscopy*, 43, 772-777.
- Chavez, P.F., Sacré, P.Y., De Bleye, C., Netchacovitch, L., Mantanus, J., Motte, H., Schubert, M., Hubert, P., & Ziemons, E. (2015). Active content determination of pharmaceutical tablets using near infrared spectroscopy as process analytical technology tool, *Talanta*, Page TALD1501660.
- Cozzolino, D., Fassio, A., & Fernández, E. (2003). Uso de la Espectroscopía de Reflectancia en el Infrarrojo Cercano para el análisis de calidad de ensilaje de maíz. *Agricultura Técnica.*, 63, (4), 387-393.
- Cozzolino, D. & Moron. A. (2004). Exploring the use of Near Infrared Reflectance Spectroscopy (NIRS) to predict trace minerals in legumes. *Animal Feed Science and Technology*, 111, 161-173. doi:10.1016/j.anifeedsci.2003.08.001
- De Haro, A., Del Río, M., Cartea E., & Ordás, A. (2006). Mejora de la calidad en especies de *Brassica*. . In G. Llácer y M.J. Díez, J.M. Carrillo y M. Badenes. *Mejora genética de la calidad*. (pp 415-447) España: Editorial Universidad de Valencia.
- Dimov, Z., Suprianto, E., Hermann, F., & Möllers, C. (2012). Genetic variation for seed hull and fibre content in a collection of European winter oilseed rape material (*Brassica napus* L.) and development of NIRS calibrations. *Plant Breeding* 131, 361-368.
- Dos Santos, A. M. P., Lima, J. S., Anunciação, D. S., Souza, A. S., Dos Santos, D. C. M. B., & Matos, G. D. (2013). Determination and Evaluation Employing Multivariate Analysis of the Mineral Composition of Broccoli (*Brassica oleracea* L. subsp. *Italica*). *Food Analytical Methods*, 6, 745-752.

- Farnham, M.W., Wilson, P.E., Stephenson, K.K., & Fahey, J.W. (2004). Genetic and environmental effects on glucosinolate content and chemoprotective potency of broccoli. *Plant Breeding* 123, 60-65. DOI:10.1046/j.0179-9541.2003.00912.x
- Feng, F., Wu, Q., & Zeng, L. (2015) Rapid analysis of diesel fuel properties by Near Infrared Reflectance Spectra, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 149, 271-278.
- Font, R., Del Río, M., Fernández, J.M. & De Haro, A. (2003). Acid Detergent Fiber Analysis in oilseed *Brassicaceae* by Near-infrared Spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* 51, 2917-2922.
- Font, R., Del Río, M., Cartea, E. & De Haro, A. (2005). Quantification of glucosinolates in leaves of leaf rape (*Brassica napus* ssp. *pabularia*) by near-infrared spectroscopy. *Phytochemistry*. 66(2), 175-85.
- Font, R., Del Río, M. & De Haro-Bailón, A. (2006). The use of near-infrared spectroscopy (NIRS) in the study of seed quality components in plant breeding programs. *Industrial Crops and Products*, 24, 307-313.
- Foster, A.J., Kakani, V.G., Ge, J., & Mosali, J. (2013). Rapid assessment of bioenergy feedstock quality by near infrared reflectance spectroscopy. *Agronomy Journal*, 105 (6), 1487-1497.
- García, S., Gálvez, L.N., Alonso, A., Agulló, E., Rubio, F., Ruiza J.J. & Moral, R. (2012). Quality assessment of tomato landraces and virus-resistant breeding lines: quick estimation by near infrared reflectance spectroscopy. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 92, 1178-1185.
- Gómez, C., & Prakash, S. (1999). Origin and domestication. In C. Gómez-Campo Eds., *Biology of Brassica coenospecies*. (pp 33-58). Amsterdam. Holanda:Elsevier Science B.V.
- González, I., Hernández, J. M., & González, J. M. (2007). Use of NIRS technology with a remote reflectance fibre-optic probe for predicting mineral composition (Ca, K, P, Fe, Mn, Na, Zn), protein and moisture in alfalfa. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 387, 2199-2205.
- Guo, Y., Ni, Y., & Kokot, S. (2016). Evaluation of chemical components and properties of the jujube fruit using near infrared spectroscopy and chemometrics. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 153, 79-86.

- Hruschka, W. R. (2001). Data Analysis Wavelength Selection Methods. In Williams, P.C., Norris, K.H. Eds. *Near infrared technology in the agricultural, food industries*. (pp 35-55). St. Paul, Minnesota, USA: American Association of Cereal Chemist.
- Isaac, R.A., & Johnson, W.C. (1990). Collaborative study of wet and dry ashing techniques for the elemental analysis of plant tissue by atomic absorption spectrophotometry. *Journal of AOAC International*. 58 (3), 436-40.
- Jahangir, M., Kim, H. K., Choi, Y. H., & Verpoorte, R. (2009). Health-Affecting Compounds in Brassicaceae. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 8 (2), 31-43.
- Kim, Y.J., Lee H.J., Shin, H.S. & Shin, Y. (2014). Near-infrared Reflectance Spectroscopy as a Rapid and Non-destructive Analysis Tool for Curcuminoids in Turmeric. *Phytochemical Analysis* 25, 445-452.
- Kopsell, D.E., Kopsell, D.A., Lefsrud, M.G., & Curran-Celentano, J. (2004). Variability in elemental accumulations among leafy *Brassica oleracea* cultivars and selections. *Journal of Plant Nutrition*. 27(10), 1813-1826.
- Lee, M.S., Hwang, Y.S., Lee, J., & Choung, M.G. (2014). The characterization of caffeine and nine individual catechins in the leaves of green tea (*Camellia sinensis* L.) by near-infrared reflectance spectroscopy, *Food Chemistry*, 158, 351-357.
- Liao, H., Wu, J., Chen, W., Guo, W., & Shi, C. (2012). Rapid diagnosis of nutrient elements in fingered citron leaf using near infrared reflectance spectroscopy. *Journal of Plant Nutrition*, 35 (11), 1725-1734.
- Lucarini, M., Canali, R., Cappelloni, M., Di Lullo, G., & Lombardi-Bocia, G. (1999). In vitro calcium availability from Brassica vegetables (*Brassica oleracea* L.) and as consumed in composite dishes. *Food Chemistry*. 64, 519-523.
- Martens, H., & Naes, T. (1989). *Multivariate calibration*. Chichester, UK: John Wiley and Sons.
- Martínez, D., Font, R., Gómez, P., Blanco, T., & Del Río, M. (2014). Determining the mineral composition in *Cucurbita pepo* fruit using near infrared reflectance spectroscopy. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 94(15), 3171-80.
- Menesatti, P., Antonucci, F., Pallottino, F., Rocuzzo, G., Allegra, M., & Stagno, F. (2010). Estimation of plant nutritional status by Vis-NIR spectrophotometric

- analysis on orange leaves [*Citrus sinensis* (L) osbeck cv. tarocco]. *Biosystems Engineering*. 105, 448-454.
- Murray, I. (1986). Near Infrared Analysis of Forages. In W. Haresign, and D.J.A. Cole Eds. *Recent advances in animal nutrition. Studies in the agricultural and food sciences*. (pp 141-156). UK: Butterworths, Reading.
- Norris, K.H., Barnes, R.F., Moore, J.E., & Shenk, J.S. (1976). Predicting forage quality by infrared reflectance spectroscopy. *Journal of Animal Science*. 43,889-897.
- Plans, M., Simó, J., Casañas, F & Sabaté, J. (2012). Near-Infrared Spectroscopy Analysis of Seed Coats of Common Beans (*Phaseolus vulgaris* L.): A Potential Tool for Breeding and Quality Evaluation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 706-712.
- Prakash, O. (1961). Food and drinks in ancient India. *Munshi Ram Manohar Lal*, pp 165-168. Delhi.
- Rosa, E.A.S. (1999). Chemical composition. In C. Gómez-Campo. *Biology of Brassica coenoespecies* (pp 315-357). Amsterdam: Elsevier Science B.V.
- Sánchez, M. T., Garrido-Varo, A., Guerrero, J.E., & Pérez-Marín, D. (2013). NIRS technology for fast authentication of green asparagus grown under organic and conventional production systems, *Postharvest Biology and Technology*, 85,116-123.
- Schmitt, S., Garrigues, S., & De la Guardia, M. (2014). Determination of the mineral composition of foods by infrared spectroscopy: a review of a green alternative. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*. 44(2), 186-97.
- Shenk, J. S., & Westerhaus, M. O. (1991). Population definition, sample selection, and calibration procedures for Near Infrared Reflectance Spectroscopy. *Crop Science*, 31, 469-474.
- Shenk, J. S., Workman Jr. J.J., & Westerhaus, M.O. (1992). Application of NIR spectroscopy to agricultural products. In Burns, D.A., Ciurczak, E.W. Eds., *Handbook of Near-Infrared Analysis*, (pp 383-431). NewYork : Dekker Inc.
- Shenk, J. S., & Westerhaus., M.O. (1993). Analysis of agriculture and food products by near infrared reflectance spectroscopy. [Monograph]. p116. Infracsoft International, Port Matilda, Pennsylvania, USA.
- Shenk, J. S., & Westerhaus, M. O. (1996). Calibration the ISI way. In: Near infrared spectroscopy: the future waves. In Davies A.M.C. & Williams P. *NIR Publications*, (pp 198-202). Chichester, UK.

- Traka, M., & Mithen, R. (2009). Glucosinolates, isothiocyanates and human health. *Phytochem Rev*, 8, 269-282.
- US Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Nutrient Data Laboratory. USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 27 (revised). Version Current: May 2015.
- Van Maarschalkerweerd, M., & Husted, S. (2015). Recent developments in fast spectroscopy for plant mineral analysis. *Frontiers in Plant Science*, 6, 169.
- Villatoro, M., Font, R., Saha, S., Obregón, S., Anter, J., Muñoz, A., De Haro, A., Alonso, A., & Del Río, M. (2012). In vivo biological activity of rocket extracts (*Eruca vesicaria* subsp. *sativa* (Miller) Thell) and sulforaphane. *Food and Chemical Toxicology*, 50(5), 1384-1392.
- Villatoro, M., Moreno, R., Muñoz, A., Cardeñosa, V., Amaro, M.A., Font, R., & Del Río, M. (2012). Characterization and prediction by near-infrared reflectance of mineral composition of rocket (*Eruca vesicaria* subsp. *sativa* and *Eruca vesicaria* subsp. *vesicaria*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92(7), 1331-1340.
- Ward, A., Nielsen, A.L., & Moller, H. (2011). Rapid Assessment of Mineral Concentration in Meadow Grasses by Near Infrared Reflectance Spectroscopy. *Sensor*, 11, 4830-4839.
- Williams, P.C., & Sobering, D.C. (1996). How do we do it: a brief summary of the methods we use in developing near infrared calibrations. In Davies, A.M.C., Williams, P.C. Eds., *Near Infrared Spectroscopy: The Future Waves*. (pp 185-188). *NIR Publications*. Chichester, UK.
- Williams, P.C. (2001). Implementation of Near-Infrared technology. In Williams, P.C., Norris, K.H. Eds. *Near infrared technology in the agricultural, food industries*. (pp 145-169). St. Paul, Minnesota, USA: American Association of Cereal Chemist.



Capítulo VI

Análisis del contenido total e individual de glucosinolatos en nabizas y grelos (*Brassica rapa* L. subsp. *rapa*) mediante reflectancia en el infrarrojo cercano.

Artículo en preparación

Obregón-Cano, S., Moreno-Rojas, R., Cartea, E. y De Haro-Bailón, A.

Capítulo VI

Análisis del contenido total e individual de glucosinolatos en nabizas y grelos (*Brassica rapa* L. subsp. *rapa*) mediante reflectancia en el infrarrojo cercano.

S. Obregón-Cano^a, R. Moreno-Rojas^b, M.E. Cartea-González^c y A. De Haro-Bailón^a

^a Departamento de Mejora Vegetal, Instituto de Agricultura Sostenible, (CSIC), Alameda del Obispo s/n, CP 14004. Córdoba, España.

^b Departamento de Bromatología y Tecnología de los Alimentos de la Universidad de Córdoba, Campus Universitario de Rabanales. Carretera Nacional IV Km. 396. C. P. 14014. Córdoba, España.

^c Departamento de Genética de Plantas, Misión Biológica de Galicia (CSIC), Apartado 28, 36080 Pontevedra, España.

Resumen

En este trabajo se estudió un método rápido y no destructivo para el análisis del contenido total (tGSL) e individual de glucosinolatos en muestras de nabizas y grelos (*Brassica rapa* subsp. *rapa*) mediante la técnica de espectroscopia de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS). Se registraron los espectros NIR de las muestras (n=351) y se emplearon pretratamientos espectrales (SNV+DT). Se aplicó el método de mínimos cuadrados parciales modificados y análisis de componentes principales, para desarrollar ecuaciones de calibración. Los modelos resultantes fueron satisfactorios con valores de coeficientes de calibración que van de 0,72 (GBN) a 0,98 (tGSL). Se evaluó la capacidad predictiva de las ecuaciones de calibración obtenidas mediante un lote de muestras (n=70) independientes del colectivo de calibración. Los coeficientes de determinación (r^2_{ve}) y errores de predicción (SEP) obtenidos en la validación externa para los distintos glucosinolatos fueron: GNA=0,94 (SEP=3,49); PRO=0,41 (SEP=1,08); GBN=0,55 (SEP=0,60); tGSL=0,96 (SEP=3,28). Las ecuaciones de calibración obtenidas resultaron ser precisas para el análisis rápido, no destructivo y fiable del contenido en GNA y tGSL directamente a partir de los espectros NIR. Las ecuaciones para PRO y GBN pueden ser utilizadas para identificar muestras con altos, medios y bajos contenidos.

Palabras clave: NIRS, glucosinolatos, nabizas, grelos, *Brassica rapa*.

Introducción

Los vegetales de hojas verdes se han convertido en componentes indispensables de una dieta equilibrada. Las plantas pertenecientes a distintas especies de *Brassica* se consumen en todo el mundo, siendo los principales consumidores China, India, Rusia, Corea y Japón (FAOSTAT, 2013). La importancia de estas verduras radica en su alto contenido en componentes antioxidantes generales (vitamina C, carotenoides y compuestos fenólicos) y otros compuestos específicos de la familia *Brassicaceae* (glucosinolatos) que promueven la salud (D'Antuono et al., 2009). *Brassica rapa* fue la primera especie de *Brassica* domesticada por el hombre hace miles de años, apareciendo ya citada en la literatura sánscrita con el nombre de Siddharta, lo que prueba la antigüedad de su cultivo (Prakash, 1961). Existen numerosas subespecies de *B. rapa*, originadas en dos centros de origen independientes, uno en Europa para los tipos oleaginosos y otro en Asia que dio lugar a las formas hortícolas (Gómez-Campo et al., 1999).

En el norte de España y Portugal los cultivos hortícolas de *Brassica rapa* tienen una gran tradición, distribución y consumo, tanto en fresco como envasado (De Haro et al., 2006). De la misma planta se cosechan los nabos, que son la raíz engrosada (hipocotilo), las nabizas, que son las hojas vegetativas, y los grelos que son los tallos junto con las hojas florales previos a la floración (Baladrón, 1991).

Actualmente, el consumo de alimentos de origen vegetal ricos en fitoquímicos es uno de los factores cruciales para el bienestar y la promoción de la salud mediante la prevención de diversas enfermedades como el cáncer, inflamaciones, enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas (enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson y cataratas) y la depresión (Khalaj et al., 2013). En particular, la protección potencial contra las enfermedades degenerativas, a cargo de los glucosinolatos y sus productos de degradación enzimática, se ha estudiado durante casi 30 años, y está exhaustivamente revisada (Verhoeven et al., 1996; Fahey et al., 1997; Mithen et al., 2000; Johnson, 2002; Traka et al., 2009). Considerando que los efectos quimioprotectores de las verduras del género *Brassica* han sido directamente relacionados con su contenido en glucosinolatos, la determinación de los perfiles de

glucosinolatos de un vegetal de *Brassica* sigue siendo un paso necesario en el estudio de su actividad quimioprotectora, antimutagénica y anticancerígena.

Los glucosinolatos son β -tioglucósido-N-hidroxisulfatos (ésteres de cis-N-hidroximinosulfato) ricos en azufre, son metabolitos secundarios aniónicos encontrados casi exclusivamente dentro del orden de plantas *Brassicales* (Clarke, 2010). Actualmente, son conocidos más de 130 estructuras de glucosinolatos individuales, difiriendo principalmente sólo en sus cadenas laterales, y se clasifican en alifáticos, aromáticos e indólicos basado en los aminoácidos de los que derivan (Rosa, 1999). La metionina y la cisteína son los donantes naturales y L-triptófano da lugar a los glucosinolatos indólicos (Zukalová et al., 2002). Los glucosinolatos son hidrolizados por una tioglucosidasa endógena, llamada mirosinasa, produciendo una amplia gama de productos de degradación (isotiocianatos, nitrilos, epitionitrilos, oxazolidina-2-tiona, y tiocianatos) con diversas actividades biológicas (Kliebenstein et al, 2001). Entre sus productos de degradación, los isotiocianatos han mostrado notable capacidad para actuar en el proceso de carcinogénesis afectando a las tres fases: la iniciación del tumor, promoción y fases de progresión, y también en la supresión de la pasos finales de la carcinogénesis, es decir, la angiogénesis y la metástasis (Traka et al, 2009).

El análisis de los glucosinolatos por métodos de referencia es complejo e implica alto coste y mano de obra especializada. El proceso requiere una doble extracción y una desulfatación y como etapa final el extracto de glucosinolatos se analiza por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (ISO 9167-1, 1992). Entre los métodos innovadores, la espectroscopia de infrarrojo cercano (NIR) es una técnica rápida, precisa, simple de operar, no destructiva y no contaminante (Buratti et al., 2011). Esta técnica se ha usado para predecir los diferentes grupos de compuestos en *Brassica sp.*: ácidos grasos, glucosinolatos y fibra (Font et al., 2006, 2005; Petisco et al., 2010; Wittkop et al., 2012; Chen et al., 2014). La espectroscopia NIR es considerada como la técnica más avanzada entre los métodos de evaluación de la calidad no destructivos con respecto a la instrumentación, aplicación, accesorios y software quimiométrico disponible.

Teniendo en cuenta el creciente interés en la especie *Brassica rapa* subsp. *rapa* y el estudio de sus efectos sobre la salud humana, en función del contenido en glucosinolatos, se considera necesario disponer de métodos analíticos modernos que

evalúen de forma rápida y fiable el contenido de glucosinolatos en sus partes comestibles, nabizas y grelos.

El objetivo principal de este trabajo ha sido el estudio de las posibilidades de la espectroscopia NIR para el análisis rápido y preciso del contenido total e individual de glucosinolatos en muestras de nabizas y de grelos.

Material y Métodos

Material vegetal

En este trabajo se utilizó un conjunto de 351 muestras de *Brassica rapa* L. subsp. *rapa* procedentes de 25 entradas diferentes. Dichas entradas procedían del Banco de Germoplasma de *Brassica* de la Misión Biológica de Galicia (CSIC, España). Este material se sembró durante las temporadas 2010-2011, 2011-2012 y 2012-2013 en Córdoba, en un suelo típico Xerofluvents (37°51 'N, 4°48'W, España), en un diseño de bloques al azar con 3 repeticiones y en las condiciones climáticas semiáridas en Andalucía.

Las nabizas y grelos se cosecharon en el momento óptimo de consumo. Tanto nabizas (4 a 5 hojas por planta) como grelos (3 a 4 tallos de las flores por planta) se lavaron a fondo con agua del grifo para eliminar la suciedad y el polvo de su superficie y, finalmente, se enjuagaron con agua desionizada. A continuación, se almacenaron a -80°C hasta su liofilización, que se hizo en un equipo Telstar® modelo Cryodos-50 (Telstar, Terrasa, España). Las muestras liofilizadas se molieron en un molino modelo A10 IKA-Labortechnik® durante 20 segundos y se almacenaron en un desecador hasta el momento de ser analizadas por el método de referencia o escaneadas en el equipo NIRS. El total de muestras fue 351 (207 de nabizas y 144 de grelos), de las cuales 122 se cosecharon en 2010-2011, 154 muestras procedían de la cosecha 2011-2012 y 75 muestras se cosecharon en la temporada 2012-2013.

Método de análisis de referencia de glucosinolatos

Los glucosinolatos se analizaron por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) según el protocolo ISO 9167-1 (1992). La extracción de glucosinolatos se realizó en dos fases. En la primera etapa, se pesaron 100 mg de material liofilizado y la extracción se llevó a cabo en un baño de agua a 75°C para desactivar la enzima mirosinasa, la muestra se calentó durante 15 min en una solución de metanol acuoso al

70% y se añadieron 100 μ l de glucotropolina a 10 mM como patrón interno. La segunda etapa de extracción se llevó a cabo después de un proceso de centrifugación, mediante una nueva adición de la solución de metanol acuoso al 70%. Una alícuota del extracto de glucosinolatos se hizo pasar por una columna de intercambio iónico de Sephadex (DEAE-A25, Sigma). La desulfatación se llevó a cabo mediante la adición de 75 μ l de solución de sulfatasa purificada (de *Helix pomatia*, suministrada por Sigma). Los glucosinolatos desulfatados se eluyeron con agua ultrapura y luego se analizaron en un equipo Waters de HPLC modelo 600, provisto de un detector de absorbancia ultravioleta-visible modelo 486 a una longitud de onda de 229 nm (Waters). La separación de los glucosinolatos se llevó a cabo mediante el uso de una columna Lichrospher 100 RP-18 con LiChroCART 125-4 de 5 micras de tamaño de partícula (Merck). Los disolventes de HPLC y gradiente se establecieron de acuerdo con el protocolo ISO (ISO 9167-1, 1992). La cantidad de cada glucosinolato individual presente en la muestra se calculó por medio del patrón interno y se expresó como micromoles por gramo de materia seca de material. Los resultados de los datos fueron analizados utilizando el programa informático de trabajo de Waters Millennium 32. El cromatograma de HPLC se comparó con el perfil de desulfo-glucosinolatos de materiales de referencia certificada, según lo recomendado por UE e ISO (CRMs 366, 190 y 367) (Wathelet et al., 1991). El contenido total de glucosinolatos se calculó como la suma de todos los glucosinolatos individuales presentes en la muestra.

Desarrollo de ecuaciones NIRS

Los espectros de la muestra se registraron con un espectrofotómetro de infrarrojo cercano modelo 6500 (Foss-NIRSystems®, Inc., Silver Spring, MD, EE.UU.), en el modo de reflectancia. Se obtuvo un espectro por cada muestra. Las muestras se colocaron en una cápsula de 3 cm de diámetro hecha de vidrio de cuarzo y aluminio anodizado para evitar interferencias en su absorción. Los espectros de reflectancia de cada muestra se escanearon en el rango de longitud de onda de 400 a 2500 nm, a intervalos de 2 nm. La recogida de datos espectrales y su análisis quimiométrico se llevó a cabo con el programa informático WinISI II v1.50 (Infrasoft Internacional, Port Matilda, PA, EE.UU.).

Los valores espectrales atípicos fueron detectados por un análisis de componentes principales (PCA) que se aplicó a todo el conjunto de la población basado en el cálculo de la distancia de Mahalanobis (H) (Shenk et al., 1991, 1996). Además de ser una

herramienta para la selección de muestras del conjunto de calibración, esta es una técnica muy útil en el análisis para la conversión de datos de los espectros originales (valores de absorbancia) en nuevas variables ortogonales (componentes principales), eliminando así la colinealidad (información redundante) (Martens et al., 1989). Se calcularon las distancias entre los espectros de las diferentes muestras con respecto a la media del espectro. El algoritmo CENTER incluido en el programa WinISI II (versión 1.50 Infracsoft International, Port Matilda, PA, EE.UU.) se utilizó para calcular las distancias H entre los espectros de las diferentes muestras con respecto a la media del espectro. De acuerdo con el trabajo de Shenk y Westerhaus (1991), las muestras con un valor H de más de 3 unidades se definieron como espectros atípicos y fueron eliminados para el desarrollo de las ecuaciones. Un total de 4 espectros fueron eliminados del conjunto de las muestras empleadas en el trabajo. El número final de muestras seleccionada fue de 347, el conjunto de calibración se compone de 277 muestras y se utilizó para el desarrollo de las diferentes ecuaciones de calibración; el conjunto de validación externa estuvo formado por 20% de las muestras totales ($n = 70$) y se utilizó para evaluar la capacidad de predicción de cada una de las ecuaciones desarrolladas. Las muestras del conjunto de validación externa se seleccionaron mediante la ordenación de las muestras en función de sus valores de H , se eligió 1 muestra de cada 5 de la lista (Shenk et al., 1991). De esta manera, las muestras seleccionadas representaron toda la variabilidad en el conjunto de la población (Hruschka, 2001). Para desarrollar las ecuaciones de calibración, se aplicó el método de regresión por mínimos cuadrados parciales modificados (MPLS). La utilidad de este método ha sido demostrada en otros trabajos para la evaluación del contenido de glucosinolatos, utilizando toda la gama del espectro (400 - 2500 nm) (Font et al., 2003, 2006).

Se aplicó el procedimiento de corrección de espectro SNV + DT, que proporciona el programa WinISI para la eliminación de dispersión debido a los efectos causados por las diferencias en el tamaño de partícula o la variación en longitud de camino entre la dispersión de las muestras y ajustar la línea base (Barnes et al., 1989). El tratamiento seleccionado para un parámetro en un conjunto de datos no es siempre la mejor opción para el mismo parámetro en cualquier otro conjunto de muestras (Núñez et al., 2016); esto confirma la importancia de optimizar el tratamiento para cada parámetro y conjunto de datos. En este sentido, los tratamientos matemáticos seleccionados y aplicados a los espectros en nuestro trabajo fueron (1, 4, 4, 1) y (2, 5, 5, 2), en el que: el primer número indica el orden de la derivada (primera o segunda derivada del logaritmo de $1 / R$); el

segundo número es la amplitud o distancia entre los segmentos a sustraer, el tercer número es la longitud del segmento a ser suavizado y el cuarto número indica un segundo suavizado (Shenk et al., 1992). Los estadísticos que definen las ecuaciones de calibración obtenidas son el coeficiente de determinación (R^2) que muestra el porcentaje de la variabilidad existente en las concentraciones de glucosinolatos explicado por la ecuación de regresión, y el error estándar de la calibración (SEC) que es el error estándar de los residuales para el colectivo de calibración. Hay que destacar que el error estándar de la calibración solamente nos indica el ajuste de los valores de referencia a la línea de regresión, por lo que no puede considerarse un estadístico adecuado para evaluar la validez de la ecuación de calibración obtenida (Shenk et al., 1996).

El espectro del patrón de gluconapina (3-Butenilglucosinolato, Phytoplan Diehm y Neuberger GmbH, Alemania) también fue registrado en el modo de reflectancia en el rango de longitud de onda de 400 a 2500 nm, a intervalos de 2 nm.

Validación de las ecuaciones

Para evaluar la capacidad de predicción de las ecuaciones de calibración se utilizaron dos modelos de validación, permitiendo una comparación (a través de diferentes criterios estadísticos) entre el valor verdadero (obtenido por el método de referencia) y el valor estimado (obtenido por NIRS).

Validación cruzada

En primer lugar, se realizó una validación cruzada basándose únicamente en los datos empleados en la etapa de calibración, con el fin de calcular el número óptimo de términos en la regresión. El algoritmo selecciona diferentes conjuntos de calibración y validación dentro de toda la población considerada, por lo que con cada selección es una simulación del algoritmo de regresión (Martens et al., 1989; Shenk et al., 1991). Por último, el programa de cálculo eligió la ecuación que hizo mínimo el error estándar de la validación cruzada (SECV). Las estadísticas resultantes de la validación cruzada fueron: el coeficiente de determinación de la validación cruzada (r^2_{vc}), el error estándar de la validación cruzada (SECV), que representa el error estándar de los residuales para el conjunto de validación cruzada; y el estadístico RPD (Fórmula 1) que es la relación entre la desviación estándar y el error estándar de la validación cruzada ($SD/SECV$). El RPD_{vc} es una estadística que permite la evaluación de la SECV en términos de la desviación estándar de los datos de referencia para la población estudiada (Williams, 2001).

$$RPD = SD\{[(\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2)(n - k - 1)^{-1}]^{0.5}\}^{-1} \quad (1)$$

Donde y_i = valor de referencia de laboratorio para la muestra; \hat{y}_i = valor medio NIR; n = número de muestras, k = número de longitudes de onda utilizadas en una ecuación; SD = desviación estándar de los datos químicos.

Validación externa

En segundo lugar, las ecuaciones de calibración seleccionadas fueron evaluadas con muestras que no intervinieron en la calibración (conjunto de validación, $n = 70$ en este trabajo). Las estadísticas de validación externa incluyen: el coeficiente de determinación de validación externa (r^2_{ve}), el error estándar de predicción (SEP), el RPD (que es la relación SD/SEP), y el estadístico RER (Fórmula 2), que es la relación entre el intervalo de valores de glucosinolatos del conjunto de validación y el error estándar de predicción.

$$RER = range\{[(\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2)(n - k - 1)^{-1}]^{0.5}\}^{-1} \quad (2)$$

Donde y_i = valor de referencia de laboratorio para la muestra; \hat{y}_i = valor medio NIR; n = número de muestras, k = número de longitudes de onda utilizadas en una ecuación; SD = desviación estándar de los datos químicos.

Los estadísticos RPD y RER permiten una comparación de la actuación del modelo a través de poblaciones con diferentes desviaciones estándar (Cozzolino et al., 2004). Las mejores ecuaciones de calibración para el análisis de glucosinolatos se seleccionaron teniendo en cuenta la combinación óptima de las siguientes estadísticas de validación externas: altos valores de coeficientes de determinación (r^2_{ve}) y altos valores de RPD_{ve} y RER. Esas ecuaciones en las que RPD es superior a 3 se considera que tiene una capacidad excelente de predicción, aquellas con RPD entre 2 y 3 permiten que se hagan predicciones aproximadas, y aquellas cuya RPD fue entre 1,5 y 2 sólo se podrían utilizar a efectos de clasificación en grupos con un contenido medio-alto-bajo. Del mismo modo, los valores de RER obtenidos con las diferentes ecuaciones de calibración con una buena capacidad de predicción deben ser mayores de 10 (Williams et al., 1996; Williams, 2001).

Otros estadísticos fueron el bias, o media de la diferencia entre los datos de referencia y los datos de reflectancia NIR, es una medida de la precisión global de la calibración, y la pendiente, que indica el grado en que los valores predichos de reflectancia NIR cambian en relación con los valores de referencia. Una pendiente de 1 es excelente, ya que muestran que la tasa de cambio en el conjunto de datos es idéntico (William, 2001). Se determinó el error estándar de laboratorio (SEL) para el análisis de los glucosinolatos y se comparó con la SEP para todas las ecuaciones. Para obtener el error total del método de referencia (SEL), se seleccionaron 10 muestras de nabizas y grelos y se analizaron por duplicado en diferentes momentos y por diferentes analistas. La relación estadística SEP/SEL relaciona el error de NIRS con el error del método de referencia.

Resultados

Análisis de referencia de glucosinolatos en las muestras.

Las concentraciones de los glucosinolatos: gluconapina (GNA), glucobrasicanapina (GBN), progoitrina (PRO) y glucosinolatos totales (tGSL) se determinaron en 351 muestras de *Brassica rapa* obtenidas en años consecutivos. La Tabla 1, muestra la estadística descriptiva, media, intervalo, desviación estándar (SD) y el coeficiente de variación (CV) para los glucosinolatos estudiados.

Tabla 1. Contenido en glucosinolatos ($\mu\text{mol g}^{-1} \text{ms}^a$) de las muestras de *Brassica rapa*, analizadas según el método de referencia.

Componentes	N ^b	Intervalo	Media	SD ^c	CV ^d
GNA ^e	351	0,42-72	22,61	14,01	61,96
PRO ^f	351	0,06-11,14	1,84	1,77	96,19
GBN ^g	351	0,01-7,32	1,43	1,11	77,62
tGSL ^h	351	0,45-76,28	25,58	15,04	58,79

^aMateria seca. ^bNúmero de muestras. ^cDesviación Estándar.

^dCoeficiente de variación. ^e Gluconapina. ^f Progoitrina.

^g Glucobrasicanapina. ^h Total de glucosinolatos.

La gluconapina mostró un amplio intervalo de valores (0,42-72 $\mu\text{mol g}^{-1}$ materia seca), mientras que progoitrina y glucobrasicanapina mostraron intervalos con menor variabilidad. Se observó un alto coeficiente de variación (CV) para los glucosinolatos

individuales y totales (> 50%), posiblemente debido a las diferencias entre las entradas de *Brassica rapa*.

La Figura 1 muestra la distribución del conjunto de muestras de *Brassica rapa* respecto al contenido total e individual de glucosinolatos.

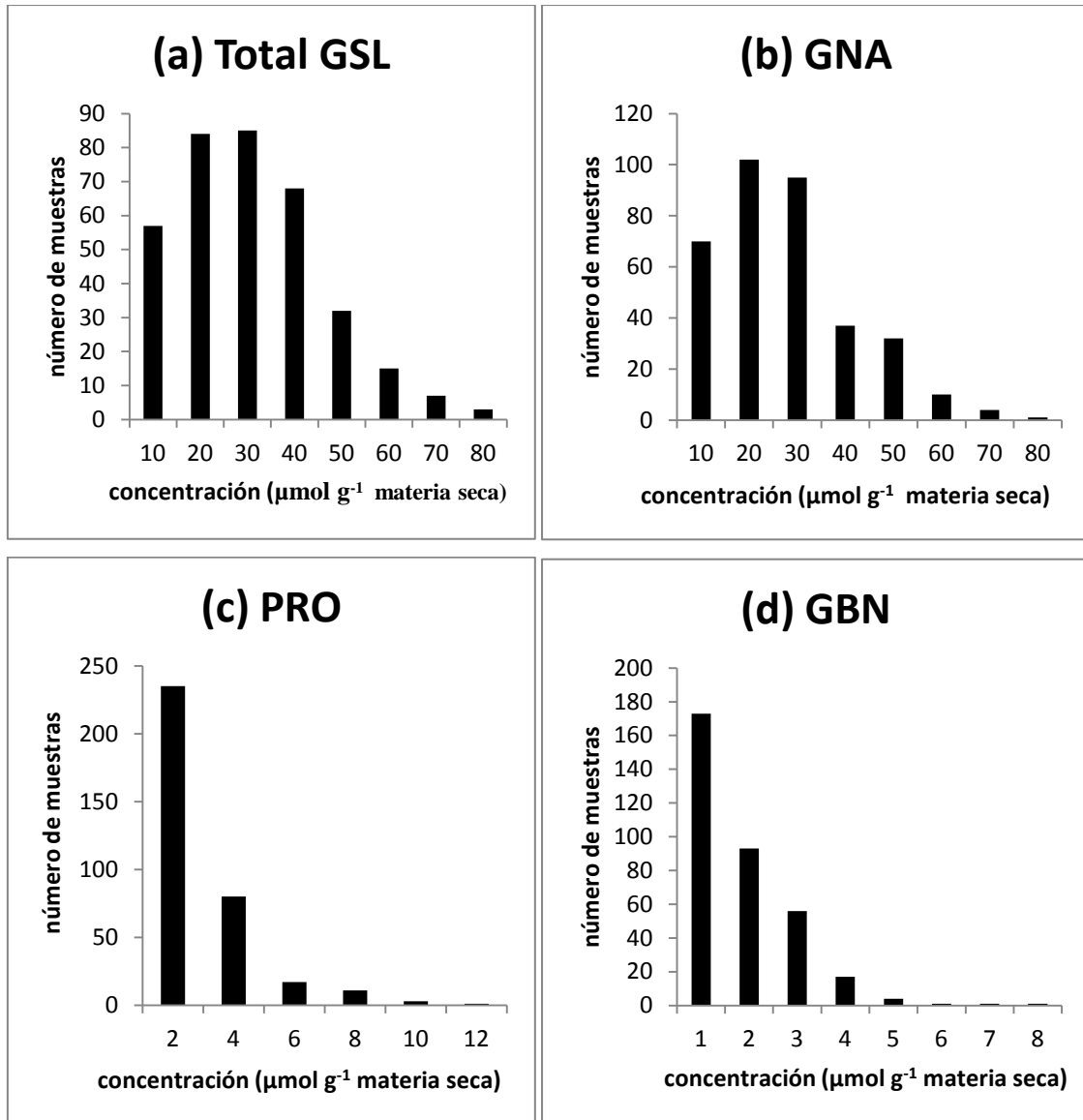
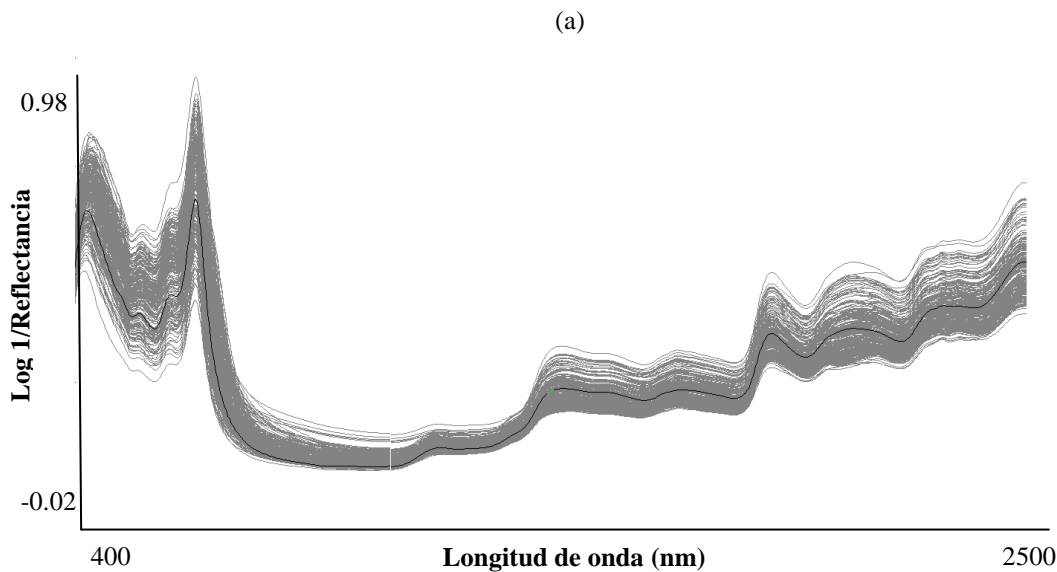


Figura 1. Distribución de las muestras de *B. rapa* respecto a la concentración de glucosinolatos: (a) Total de glucosinolatos, (b) gluconapina, (c) progoitrina y (d) glucobrasicanapina.

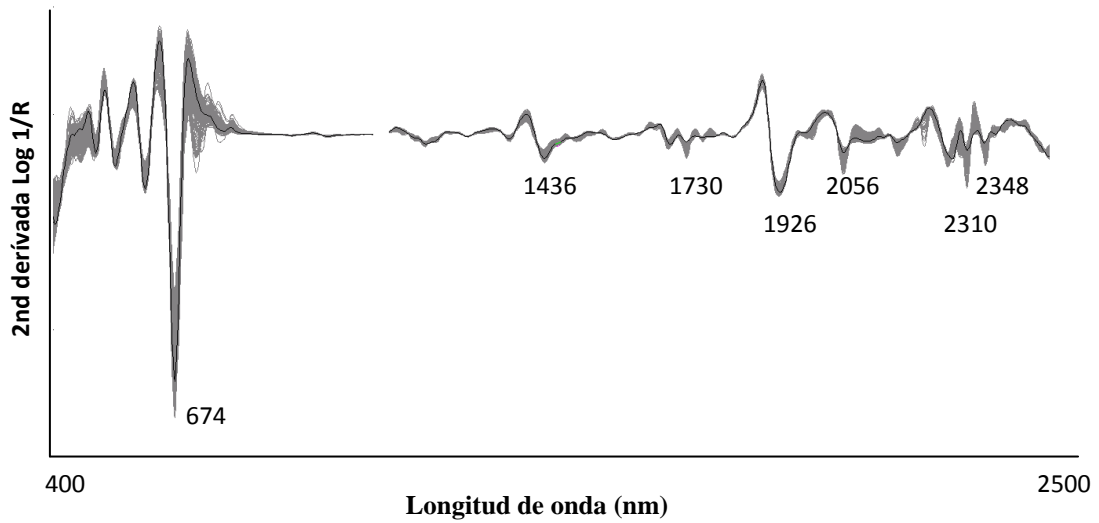
Calibración NIRS y validación cruzada de glucosinolatos.

Se realizó un análisis de componentes principales (PCA) para detectar y eliminar posibles muestras cuyos espectros diferían del conjunto (Shenk et al., 1991). En la Figura 2 (a) se muestran los espectros (log 1/R) de las muestras de *Brassica rapa* utilizadas en el conjunto de calibración. La Figura 2 (b) muestra la segunda derivada de

los espectros (2, 5, 5, 2; SNV-DT) en el rango de 400 a 2500 nm, que se obtuvo con el fin de identificar y relacionar diferentes bandas de absorción del espectro con grupos específicos que influyen en los términos MPLS. Los picos y valles en la figura 2 (b) señalan la curvatura máxima en el espectro de reflectancia ($\log 1/R$) (Figura 2a). El espectro mostró una banda en la región visible a 674 nm, correspondiente a las transiciones electrónicas en el rojo, que se ha asociado a la absorción de clorofila (Tkachuk et al., 1982). Figura 2 (c) muestra la segunda derivada del espectro medio del patrón de gluconapina. El estudio de este espectro es una buena manera de identificar algunos de los grupos que absorben a esa longitud de onda, relacionados directamente con la gluconapina, que está presente en el 99,9% de las muestras de *Brassica rapa* y que se utilizan principalmente en el modelado de las ecuaciones. Esto es especialmente interesante en los casos en los que la baja concentración en las muestras del analito(s) estudiado no explica por sí mismo las altas correlaciones encontradas (Font et al., 2005). La Figura 2 (b) y la Figura 2 (c) presentan considerables similitudes espectrales de 1400 a 2316 nm de longitud de onda. Cabe esperar que este rango sea útil para estudios cuantitativos de gluconapina.



(b)



(c)

GNA

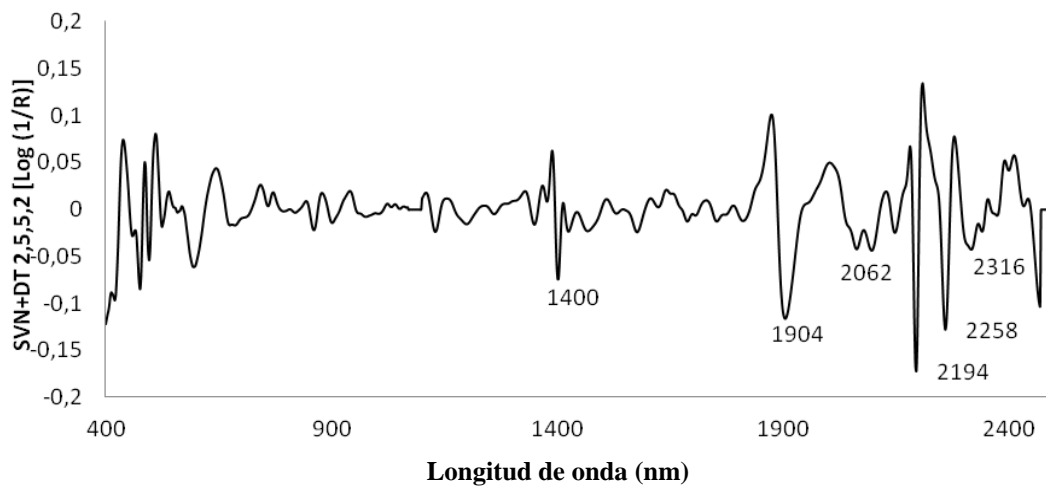


Figura 2. (a) Espectros ($\log 1/R$) de las muestras de *Brassica rapa* utilizadas en el conjunto de calibración ($n = 277$), en el intervalo de 400 a 2500 nm. (b) Segunda derivada de los espectros (2, 5, 5, 2; SNV + DT) de los datos en el intervalo de 400 a 2500 nm de *Brassica rapa*. (c) Segunda derivada de los espectros (2, 5, 5, 2; SNV + DT) de los datos en el intervalo de 400 a 2500 nm del patrón de gluconapina.

La Tabla 2 muestra los estadísticos descriptivos incluyendo intervalo, media y desviación estándar (SD) para los glucosinolatos de las muestras pertenecientes a los conjuntos de calibración y de validación. El intervalo del conjunto de muestras de validación se incluyó dentro del intervalo del conjunto de muestras de calibración, como

se recomienda para generar un modelo de calibración de capacidad predictiva fiable (Petisco et al., 2005).

Tabla 2. Contenido en glucosinolatos ($\mu\text{mol g}^{-1} \text{ms}^a$), de las muestras de los grupos de calibración y de validación de *Brassica rapa*.

Componentes	Grupo de Calibración (n=277)			Grupo de Validación (n=70)		
	Intervalo	Media	SD ^b	Intervalo	Media	SD ^b
GNA ^c	0,65-72	22,47	13,82	0,42-64,26	22,49	14,21
PRO ^d	0,06-11,14	1,90	1,85	0,11-5,51	1,67	1,40
GBN ^e	0,04-6,73	1,45	1,08	0,01-7,32	1,29	1,23
tGSL ^f	0,89-76,28	25,52	14,79	0,45-73,48	25,15	15,46

^a Materia seca. ^b Desviación Estándar de los datos. ^c Gluconapina. ^d Progoitrina.

^e Glucobrasicanapina. ^f Total de glucosinolatos.

Los estadísticos de la calibración y validación cruzada para las ecuaciones desarrolladas utilizando SNV + DT y el primer o segundo tratamiento derivado se muestran en la Tabla 3. Los tratamientos (1,4,4,1; SNV + DT) y (2,5,5,2; SNV + DT) se aplicaron a todo el espectro de las muestras del conjunto de calibración. Se obtuvo el error estándar de la calibración (SEC) más bajo y el mayor coeficiente de determinación en la calibración (R^2) con la transformación a la segunda derivada (2,5,5,2) de los datos para todas las ecuaciones desarrolladas. Los resultados en las diferentes estadísticas, utilizando la primera derivada de los espectros, fueron más deficientes, presentando valores de R^2 y SEC más bajos que los obtenidos en la segunda derivada.

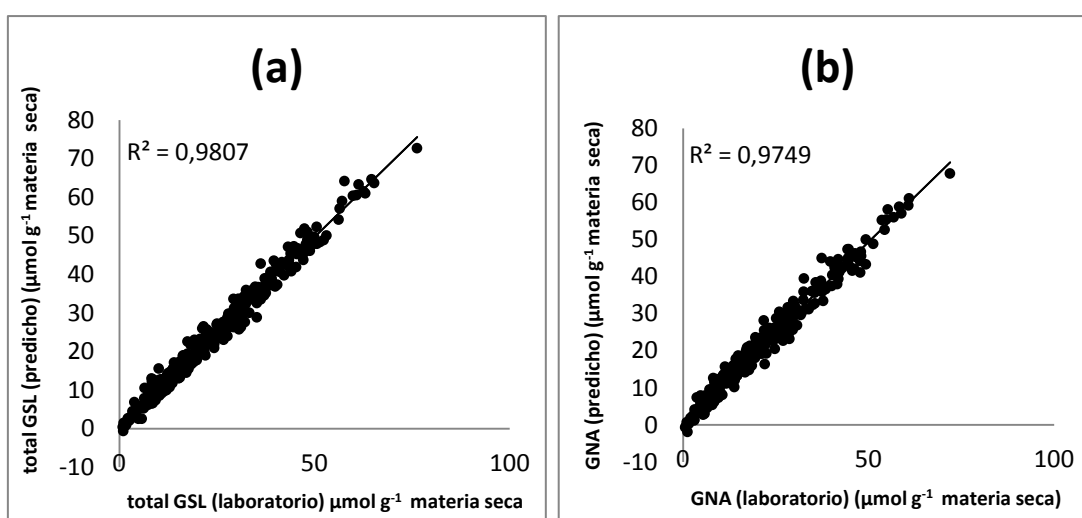
Las ecuaciones de calibración fueron evaluadas por la validación cruzada interna. Las ecuaciones obtenidas muestran valores r^2_{vc} en la validación cruzada que variaron de 0,60 para glucobrasicanapina a 0,96 en gluconapina, los cuales también mostraron los valores más bajos (1,57) y más altos (5,11) de RPD_{vc} , respectivamente (Tabla 3).

Tabla 3. Estadísticos de la calibración y validación cruzada en *Brassica rapa*.

Componentes ^a	Calibración						Validación Cruzada		
	MT ^b	Intervalo	Media	SD ^c	SEC ^d	R ^{2e}	RPD _{cv} ^f	r ² _{cv} ^g	SECV ^h
GNA ⁱ	1,4,4,1	0,65-60,97	22,05	13,49	2,85	0,95	3,80	0,93	3,55
PRO ^j	1,4,4,1	0,06-8,32	1,66	1,55	0,70	0,79	1,80	0,68	0,86
GBN ^k	1,4,4,1	0,04-4,08	1,35	0,92	0,55	0,64	1,39	0,49	0,66
tGSL ^l	1,4,4,1	0,89-76,28	25,36	14,87	2,92	0,96	4,25	0,94	3,50
GNA ⁱ	2,5,5,2	0,65-72	22,09	13,81	2,01	0,98	5,11	0,96	2,70
PRO ^j	2,5,5,2	0,06-7,55	1,67	1,50	0,71	0,78	1,67	0,64	0,90
GBN ^k	2,5,5,2	0,04-4,08	1,35	0,94	0,49	0,72	1,57	0,60	0,60
tGSL ^l	2,5,5,2	0,89-76,28	25,28	14,82	1,96	0,98	5,61	0,97	2,64

^a Glucosinolatos expresados como $\mu\text{moles por g. materia seca}$. ^b Tratamiento matemático. ^c Desviación estándar. ^d Error estándar de calibración. ^e Coeficiente de determinación en la calibración. ^f Relación entre la desviación estándar de los datos de referencia y el error estándar de la validación cruzada. ^g Coeficiente de determinación de la validación cruzada. ^h Error estándar de la validación cruzada. ⁱ Gluconapina. ^j Progoitrina. ^k Glucobrasicanapina. ^l Total de glucosinolatos.

La Figura 3 presenta las gráficas de predicción para las concentraciones de glucosinolatos de *Brassica rapa* de la validación cruzada de las ecuaciones de calibración desarrolladas frente a los datos de referencia. Estos resultados reflejan los diferentes componentes individuales que contribuyen más en los modelos de calibración NIRS. Se consideran calibraciones mejores y más precisas las que muestran valores de R^2 más altos.



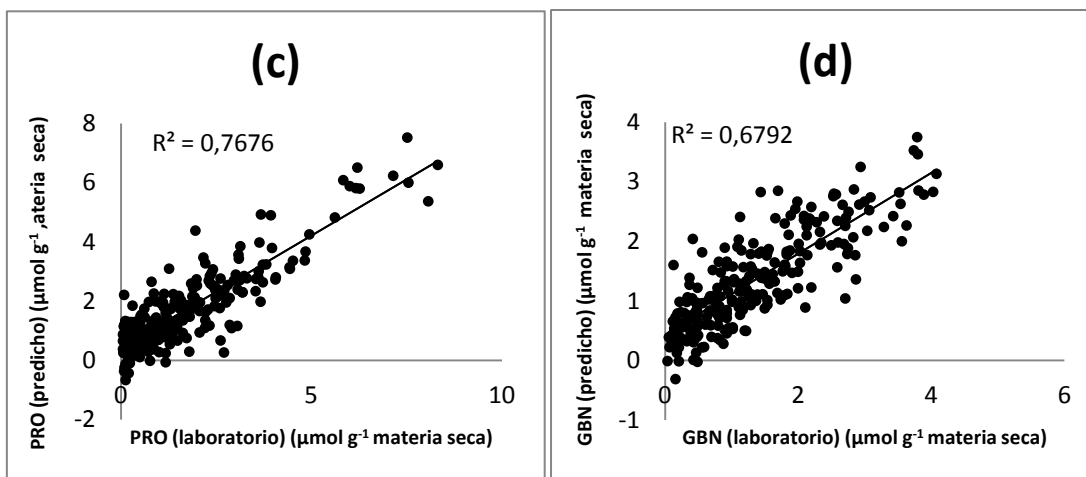


Figura 3. Representación gráfica de los valores de referencia frente a los valores de predicción en validación cruzada del total glucosinolatos (a), gluconapina (b), progoitrina (c) y glucobrasicanapina (d) (n=277) (μmol g⁻¹ ms).

Modelo de regresión por Mínimos Cuadrados Parciales Modificados (MPLS) del contenido en glucosinolatos en muestras de nabizas y grelos.

Las representaciones gráficas de los tres primeros términos (loadings) de la ecuación en segunda derivada (2,5,5,2) de gluconapina obtenida por MPLS (Figura 4), ilustran los coeficientes de regresión de cada longitud de onda e indican qué longitudes de onda influyen principalmente en la ecuación de calibración. En la segunda derivada, picos apuntando hacia abajo indican influencia positiva de grupos y enlaces en el desarrollo de las ecuaciones, mientras que los picos apuntando hacia arriba indican correlaciones negativas. Las identificaciones de compuestos y grupos químicos específicos para diferentes longitudes de onda, mediante el programa WINISI revelaron una asociación de términos MPLS para gluconapina con varios grupos funcionales. Las regiones espectrales alrededor de 1442, 1700, 2052, 2168 y 2300 nm muestran importantes contribuciones al modelo de MPLS. Estas podrían estar relacionados con los grupos CH-CH₂ (1442 nm); con grupos CH₃ y grupos SH (1700 nm); con grupos de proteína N-H (2052 nm); enlaces CH-CH (2168 nm) y a segundos sobretonos de grupos CH relacionados también con las proteínas (2300 nm). Otras contribuciones menores en el desarrollo de este factor fueron las longitudes de onda relacionadas con grupos OH relativos al agua y picos relacionados con segundos sobretonos de grupos C = O (1920 nm).

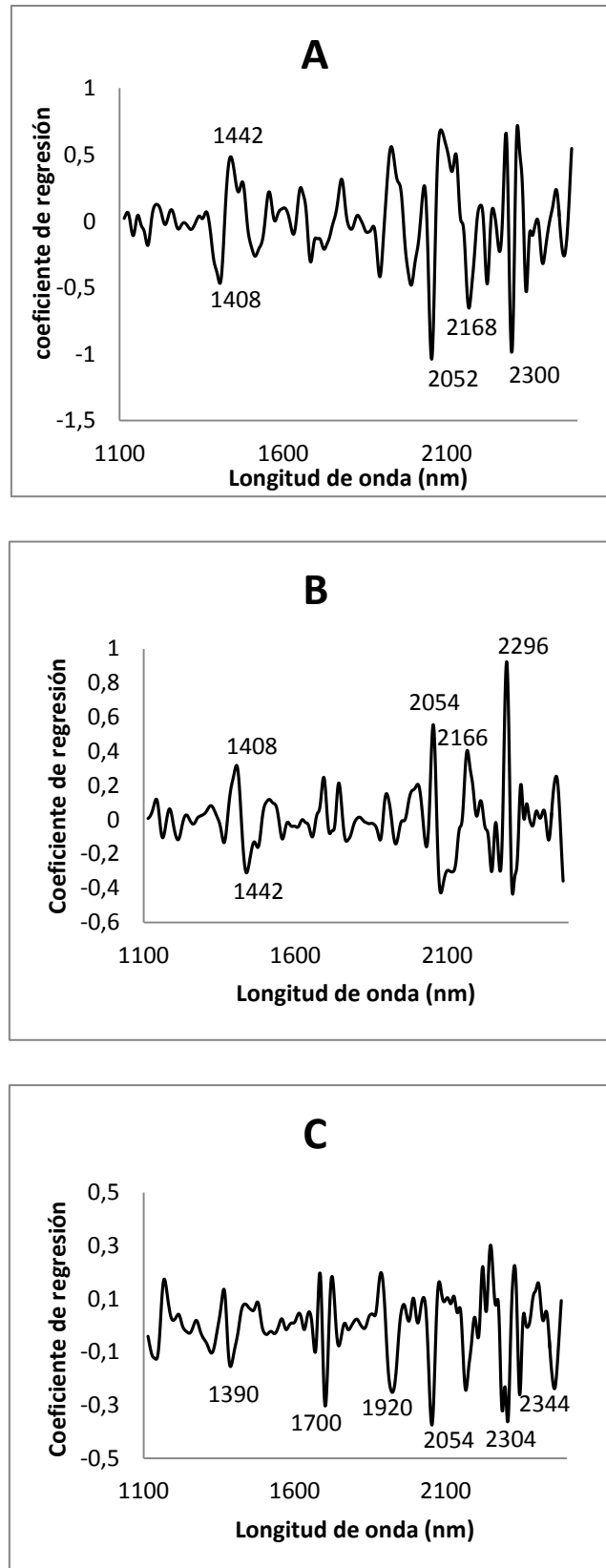


Figura 4. Gráficos de los tres primeros términos (loadings) de la ecuación obtenida por MPLS para gluconapina de *Brassica rapa* en segunda derivada (2, 5, 5, 2). Figuras A, B y C representa el término 1, 2 y 3, respectivamente.

Validaciones externas de ecuaciones de calibración

Las ecuaciones de calibración se evaluaron mediante validación externa utilizando datos del conjunto de validación, compuesto por datos externos independientes (Tabla 2). Las estadísticas de validación para los glucosinolatos medidos en *Brassica rapa* se muestran en la Tabla 4.

Para estos modelos matemáticos, r^2_{ve} en la primera derivada presentó valores más bajos que los obtenidos para la segunda derivada con todas las ecuaciones. Las mejores predicciones se obtuvieron para gluconapina (SEP: 3,49; RPD_{ve}: 4,26) y glucosinolatos totales (SEP: 3,28; RPD_{ve}: 4,93), mientras que para los otros glucosinolatos, progoitrina y glucobrasicanapina, se obtuvieron peor combinación de los estadísticos, presentando menor r^2_{ve} , RPD_{ve} y RER. Se encontraron diferencias pequeñas en los bias y las pendientes de las ecuaciones de primera y segunda derivada, valores cercanos a 0,00 y 1,00, respectivamente.

Tabla 4. Estadística de la validación externa de las ecuaciones de los diferentes componentes de *Brassica rapa* (n=70).

Componente ^a	MT ^b	Intervalo ^c	Media ^d	SD ^e	SEP ^f	r_{ve}^{2g}	P ^h	Bias ⁱ	RPD ^j	RER ^k
GNA ^l	1,4,4,1	0,42-64,26	21,91	13,63	3,76	0,92	0,98	-0,01	3,57	16,98
PRO ^m	1,4,4,1	0,11-5,51	1,51	1,31	1,05	0,38	0,77	-0,08	1,00	5,14
GBN ⁿ	1,4,4,1	0,01-2,99	1,10	0,85	0,63	0,51	0,73	-0,05	1,33	4,73
tGSL ^ñ	1,4,4,1	0,45-73,48	24,64	14,94	4,01	0,93	0,97	-0,27	3,71	18,21
GNA	2,5,5,2	0,42-64,26	22,49	14,21	3,49	0,94	0,93	0,14	4,26	18,29
PRO	2,5,5,2	0,11-5,51	1,60	1,38	1,08	0,41	0,81	-0,09	1,00	5,00
GBN	2,5,5,2	0,01-2,99	1,10	0,85	0,60	0,55	0,78	-0,10	1,33	4,97
tGSL	2,5,5,2	0,45-73,48	25,26	15,55	3,28	0,96	0,94	-0,35	4,93	22,27

^a Glucosinolatos expresados como μ moles por g. materia seca. ^b Tratamiento matemático. ^c Intervalo de valores de referencia del grupo de validación externa. ^d Media de los valores de referencia del grupo de validación externa. ^e Desviación estándar de valores de referencia del grupo de validación externa. ^f Error estándar de predicción. ^g Coeficiente de determinación en la validación externa. ^h Pendiente. ⁱ La diferencia entre el valor real medio y el valor medio estimado para las muestras del conjunto de validación. ^j Relación de la desviación estándar y SEP. ^k Relación del intervalo y SEP. ^l Gluconapina. ^m Progoitrina. ⁿ Glucobrasicanapina. ^ñ Total de glucosinolatos.

Discusión

El contenido individual y total de glucosinolatos en las muestras de nabizas y grelos de *Brassica rapa* mostró un amplio intervalo de valores debido a la recolección de muestras a lo largo de tres temporadas y recogidas en diferentes estados fenológicos

(nabizas y grelos) que contribuyó a aumentar la variabilidad química en el conjunto. Los glucosinolatos hallados en *Brassica rapa* analizadas en HPLC fueron GNA, PRO y GBN, principalmente. El glucosinolato predominante en todas las muestras fue GNA, y estos resultados son acordes a los encontrados en la literatura, donde se cita una alta concentración de este componente en esta especie de *Brassica* (Cartea et al., 2012; Francisco et al., 2009, Padilla et al., 2007). Las bajas concentraciones encontradas en PRO y GBN en las muestras analizadas ya indicaban que la correlación con la información espectral podría ser baja. Se aplicaron la primera y segunda derivada para el desarrollo de las ecuaciones y se evaluaron las estadísticas para la selección de las ecuaciones más robustas y eficientes para predecir el contenido en glucosinolatos. Se verificó la robustez del método mediante la aplicación de una validación externa mediante 70 muestras independientes del conjunto de calibración. El rendimiento de las ecuaciones de calibración se evaluó usando r^2_{ve} y RPD_{ve} y el estadístico RER, que se calculó para verificar la exactitud de la calibración. Siguiendo las consideraciones reportadas por Williams (2001) acerca de la estimación de la exactitud de una ecuación de calibración a partir de validación externa, la r^2_{ve} que se obtuvo para glucosinolatos totales (0,96) y también para GNA (0,94) fueron indicativas de ecuaciones con una excelente información cuantitativa y los valores de RPD (4,93 y 4,26, respectivamente) fueron superiores a 3, lo que indicó que las calibraciones desarrolladas por MPLS podrían utilizarse para el cribado y se excelentes modelos de predicción de estos glucosinolatos en el material liofilizado de *Brassica rapa* (Williams, 2001). Sin embargo, PRO y GBN mostraron valores de r^2_{ve} (0,41 y 0,55, respectivamente) que los hace útiles para una buena clasificación de las muestras en grupos de alto y bajo contenido.

Se han hecho algunos estudios previos sobre calibraciones NIRS de glucosinolatos en otras especies de *Brassica* debido al interés comercial que el género suscita. En las hojas de *Brassica napus*, se han obtenido valores de r^2_{ve} de 0,73 para GNA, de 0,78 para PRO, de 0,81 para GBN y de 0,88 para glucosinolatos totales en validaciones cruzadas (Font et al., 2005) y otros autores han conseguido valores de r^2_{ve} de 0,74 para glucosinolatos totales (Míka et al., 2003). En las semillas intactas de *B. napus*, el valor r^2_{ve} obtenido para glucosinolatos totales fue de 0,83 para la validación externa (Petisco et al., 2010). En las hojas de *Brassica oleracea* se han publicado valores de r^2_{ve} de 0,70 en GNA y 0,83 en glucosinolatos totales en la validación cruzada (Font et al., 2005) y valores de r^2_{ve} de 0,73 en glucosinolatos totales en la validación externa (Hernández et

al., 2012). En planta liofilizada de *Brassica albograbra*, los valores de r^2_{vc} publicados fueron de 0,69 en PRO, de 0,87 en GNA y de 0,92 en glucosinolatos totales, y valores de r^2_{ve} de 0,34 en PRO, de 0,82 en GNA y de 0,91 en glucosinolatos totales (Chen et al., 2014). En las semillas intactas de *Brassica juncea*, los valores de r^2_{ve} publicados en GNA fue de 0,95 y 0,82 en glucosinolatos totales (Font et al., 2004 y 2006). En las semillas intactas de *Brassica carinata* los valores r^2_{ve} facilitados fueron de 0,93 en glucosinolatos totales (Font et al., 2006) y 0,88 (Petisco et al., 2010).

En el presente trabajo se han desarrollado por primera vez ecuaciones de calibración para glucosinolatos en nabizas y grelos y los valores r^2_{vc} y r^2_{ve} obtenidos fueron los más altos hasta ahora publicados para GNA (0,96 y 0,94, respectivamente) y en glucosinolatos totales (0,97 y 0,96, respectivamente) fueron similares a los publicados por otros autores hasta ahora.

Los espectros contienen toda la información de composición química de la muestra y las interacciones entre los constituyentes que son responsables de que la muestra posea sus propiedades únicas físicas y funcionalidad (William, 2001). Todos los componentes (proteína, almidón, glucosinolatos, etc.) están presentes en las muestras de *Brassica rapa*, esto hace difícil concluir el nivel de participación de estos en la calibración de GNA. Con el estudio de las longitudes de onda observadas en los espectros del patrón de gluconapina (Figura 2b y 2c), y el estudio de las principales longitudes de onda utilizadas en los tres primeros términos de la ecuación de calibración para GNA (Figura 4), se observaron que longitudes de onda participaron directamente en la ecuación de GNA. En los espectros del patrón de GNA (Figura 2b y 2c), las principales bandas de absorción se muestran a 674 nm en la región del visible relacionadas con las absorciones de pigmentos vegetales, en las regiones NIRS se mostraron bandas de absorción a las longitudes de onda 1436 y 1730 nm relacionadas con los grupos CH y CH₂; a 1920 nm se atribuyó a vibraciones de grupos OH de agua; a 2052 nm fue relacionada con N-H de grupos amidas; y a 2310 y 2348 nm relacionadas con vibraciones de grupos CH y combinación de bandas de grupos metileno (Murray et al., 1987). Algunas de estas longitudes de onda participaron considerablemente en los tres primeros términos MPLS de la ecuación de GNA en *Brassica rapa* (Figura 4), y fueron similares a los citados en la literatura en trabajos para otras especies de *Brassica* (Hernández et al., 2012; Font et al., 2004, 2005 y 2006), aunque con diferencias en algunas absorciones específicas al tratarse de otras especies con diferente composición.

Conclusiones

Los resultados aportados en este trabajo muestran que, a partir de las ecuaciones de calibración desarrolladas, la espectroscopia de infrarrojo cercano es capaz de predecir el contenido de gluconapina y glucosinolatos totales en muestras de *Brassica rapa*, con suficiente precisión para fines de selección y predicción. La inclusión de los diferentes estados fenológicos (nabizas y grelos) recogidos durante tres años de las muestras de *Brassica rapa* incrementaron la robustez de las ecuaciones de gluconapina y glucosinolatos totales en el modelo de calibración ya que se consiguió un mayor tamaño muestral con valores de concentración en todo el intervalo. Las ecuaciones para glucobrasicanapina y progoitrina se pueden utilizar para una correcta clasificación de los grupos de muestras en función de su concentración en "altos" y "bajos". Asimismo, estos modelos de calibración pueden ser optimizados usando conjuntos de muestras de cosechas posteriores, con el fin de mejorar la robustez y precisión de los modelos. Con estas herramientas de predicción del contenido de glucosinolatos en *Brassica rapa* subsp. *rapa* se puede avanzar en la gestión de la calidad del producto, y en la mejora de otros criterios de aceptación.

Agradecimientos

Agradecimiento al Ministerio de Economía y Competitividad del gobierno español por la financiación del proyecto *Genética y mejora de los cultivos de brásicas hortícolas*, Ref. AGL2006-04055 y al proyecto *Genética y Mejora de Brasicas hortícolas: papel de los metabolitos secundarios*, Ref. AGL2012-35539.

Referencias

- Baladrón, J.J. (1991). Taxonomía, distribución y estudio agronómico de los cultivos del género *Brassica* en Galicia. Tesis doctoral. Universidad de Santiago de Compostela. España.
- Barnes, R.J., Dhanoa, M.S., Lister, S.J. (1989). Standard normal variate transformation and de-trending of near-infrared diffuse reflectance spectra. *Appl Spectrosc.* 43, 772-777.
- Buratti, S., Ballabio, D., Giovanelli, G., Dominguez, C.M.Z., Moles, A., Benedetti, S. et al. (2011). Monitoring of alcoholic fermentation using near infrared and mid infrared spectroscopies combined with electronic nose and electronic tongue. *Anal Chim Acta.* 697(1-2), 67-74.
- Cartea, M.E., De Haro, A., Obregón, S., Soengas, P. and Velasco, P. (2012). Glucosinolate variation in leaves of *Brassica rapa* crops. *Plant Foods Hum Nutr.* 67, 283-288.
- Chen, J., Li, L., Wang, S., Tao, X., Wang, Y., Sun, A., He, H. (2014). Assessment of glucosinolates in Chinese kale by near-infrared spectroscopy. *Int J Food Prop.* 17, 1668-1679.
- Clarke, D. B. (2010). Glucosinolates, structures and analysis in food. *Anal Methods.* 2(4), 310-325.
- Cozzolino, D., Moron, A. (2004). Exploring the use of near infrared reflectance spectroscopy (NIRS) to predict trace minerals in legumes. *Anim. Feed Sci Tech.* 111, 161-173.
- D'Antuono, L.F., Elementi, S. and Neri, R. (2009). Exploring new potential health-promoting vegetables: glucosinolates and sensory attributes of rocket salads and related *Diplotaxis* and *Eruca* species. *J Sci Food Agr.* 89(4), 713-722.
- De Haro, A., Del Río, M., Cartea, E., Ordás, A. (2006). Mejora de la calidad en especies de *Brassica*. In *Mejora genética de la calidad*. G. Llácer y M.J. Díez, J.M. Carrillo y M. Badenes, Eds., Editorial Universidad de Valencia: Valencia, España, pp 415-447.
- Fahey, J.W., Zhang, Y. and Talalay, P. (1997). Broccoli sprouts: an exceptionally rich source of inducers of enzymes that protect against chemical carcinogens. *Proc Natl Acad Sci USA.* 94, 10367-10372.

- Font, R., Del Río, M. and De Haro-Bailón, A. (2006). The use of near-infrared spectroscopy (NIRS) in the study of seed quality components in plant breeding programs. *Ind Crop Prod.* 24, 307-313.
- Font, R., Del Río, M., Cartea, E. and De Haro, A. (2005). Quantification of glucosinolates in leaves of leaf rape (*Brassica napus* ssp. *pabularia*) by near-infrared spectroscopy. *Phytochemistry.* 66(2), 175-85.
- Font, R., Del Río, M., Fernández, J.M., De Haro-Bailón, A. (2003). Acid Detergent Fiber Analysis in Oilseed *Brassicas* by Near-Infrared Spectroscopy. *J Agric Food Chem.* 51, 2917-2922.
- Font, R., Del Río, M., Fernández, J.M., De Haro-Bailón, A. (2004). Use of near-infrared spectroscopy for screening the individual and total glucosinolate contents in Indian mustard seed (*Brassica juncea* L. Czern. & Coss.). *J Agric Food Chem.* 52, 3563-3569.
- Font, R., Del Río-Celestino, M., Rosa, E., Aires A., and De Haro-Bailón A. (2005). Glucosinolate assessment in *Brassica oleracea* leaves by near-infrared spectroscopy. *J Agr Sci.* 143(01), 65-73.
- Food and Agriculture Organization of The United Nations (FAOSTAT). <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/S>
- Francisco, M., Moreno, D.A., Cartea, M.E., Ferreres, F., García-Viguera, C., Velasco, P. (2009). Simultaneous identification of glucosinolates and phenolic compounds in a representative collection of vegetable *Brassica rapa*. *J Chromatogr A.* 1216(38), 6611-6619.
- Gómez-Campo, C. and Prakash, S. (1999). Origin and domestication. In *Biology of Brassica coenospecies*. Gómez-Campo, C. Eds., Elsevier Science B.V. Amsterdam, Holanda, pp 32-52.
- Hernández-Hierro, J.M., Valverde, J., Villacreces, S., Reilly, K., Gaffney, M., González-Miret, M.L., Heredia, F.J., Downey, J. (2012). Feasibility Study on the Use of Visible–Near-Infrared Spectroscopy for the Screening of Individual and Total Glucosinolate Contents in Broccoli. *J Agric Food Chem.* 60, 7352-7358.
- Hruschka, W.R. (2001). Data Analysis Wavelength Selection Methods. In *Near infrared technology in the agricultural, food industries*. Williams, P.C., Norris, K.H. Eds., American Association of Cereal Chemist, St. Paul, Minnesota, USA, pp 35-55.
- ISO norm (1992). Rapessed- Determination of glucosinolates content - Part 1: method using high-performance liquid chromatography. ISO 9167-1, 1-9.

- Johnson, I.T. (2002). Glucosinolates in the human diet: bioavailability and implications for health. *Phytochem Rev.* 1,183-188.
- Khalaj, L., Nejad, S.C., Mohammadi, M., Zadeh, S.S., Pour, M.H., Ashabi, G., et al. (2013). Assessing competence of broccoli consumption on inflammatory and antioxidant pathways in restraint-induced models: Estimation in rat hippocampus and prefrontal cortex. *BioMed Res Int.* 1-13.
- Kliebenstein, D.J., Kroymann, J., Brown, P., Figuth, A., Pedersen, D., Gershenzon, J., Mitchell-Olds, T. (2001). Genetic control of natural variation in *Arabidopsis* glucosinolate accumulation. *Plant Physiol.* 126, 811-825.
- Martens, H., Naes, T. (1989). In *Multivariate calibration*. John Wiley and Sons Eds., Chichester, UK.
- Míka, V., Tillmann, P., Korprna, R., Nerusil, P., Kucera, V. (2003). Fast prediction of quality parameters in whole seeds of oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Plant soil environ.* 49(4), 141-145.
- Mithen, R.F., Dekker, M., Verkerk, R., Rabot, S. and Johnson, I.T. (2000). The nutritional significance, biosynthesis and bioavailability of glucosinolates in human foods. *J Sci Food Agric.* 80, 967-984.
- Murray, I. and Williams, P.C. (1987). Chemical principles of near-infrared technology. In *Near infrared technology in the agricultural, food industries*. Williams, P.C., Norris, K.H., Eds., American Association of Cereal Chemist, St. Paul, Minnesota, USA, pp 17-34.
- Núñez-Sánchez, N., Martínez-Marín, A.L., Polvillo O., Fernández-Cabanás V.M., Carrizosa J., Urrutia B., Serradilla J.M. (2016). Near Infrared Spectroscopy (NIRS) for the determination of the milk fat fatty acid profile of goats. *Food Chem.* 190, 244-252.
- Padilla, G., Cartea, M.E., Velasco, P., De Haro, A. and Ordás, A. (2007). Variation of glucosinolates in vegetable crops of *Brassica rapa*. *Phytochemistry.* 68(4), 536-545.
- Petisco, C., García-Criado, B., Vázquez de Aldana, B.R., De Haro, A., García-Ciudad, A. (2010). Measurement of quality parameters in intact seeds of *Brassica* species using visible and near-infrared spectroscopy. *Ind Crop Prod.* 32, 139-146.
- Petisco, C., García-Criado, B., Vázquez de Aldana, B.R., Zabalgoeazcoa, I., Mediavilla, S., García-Ciudad A. (2005). Use of near-infrared reflectance

- spectroscopy in predicting nitrogen, phosphorus and calcium contents in heterogeneous woody plant species. *Anal Bioanal Chem.* 382, 458-465.
- Prakash, O. (1961). Food and drinks in ancient India. *Munshi Ram Manohar Lal.* Delhi, pp 165-168.
- Rosa, E.A.S. (1999). Chemical composition. In Biology of *Brassica* coenospecies Gómez-Campo, C. Eds., Elsevier Science B.V., Amsterdam, pp 315-357.
- Shenk, J.S., Westerhaus, M.O. (1991). Population definition, sample selection, and calibration procedures for near infrared reflectance spectroscopy. *Crop Sci.*, 31, 469-474.
- Shenk, J.S., Westerhaus, M.O. (1996). Calibration the ISI way. In Near infrared spectroscopy: the future waves. Davies A.M.C., Williams P. Eds., NIR Publications,
- Shenk, J.S., Workman, J.J., Westerhaus, M.O. (1992). Application of NIR spectroscopy to agricultural products. In Handbook of Near-Infrared Analysis. Burns, D.A., Ciurczak, E.W. Eds., Dekker Inc., New York, NY, 383-431.
- Tkachuk. R., Kuzina F.D. (1982). Chlorophyll analysis of whole rapeseed kernels by near infrared reflectance. *Can J Plant Sci.* 62, 875-884.
- Traka, M. and Mithen, R. (2009). Glucosinolates, isothiocyanates and human health. *Phytochem Rev.* 8, 269-282.
- Verhoeven, D.T., Goldbohm, R.A., Van Poppel, G., Verhagen, H. and Van den Brandt, P.A. (1996). Epidemiological studies on *Brassica* vegetables and cancer risk. *Cancer. Epidemiol Biomarkers Prev.* 5, 733-748.
- Wathelet, J.P., Wagstaffe, P., Boenke, A. (1991). The certification of the total glucosinolate and sulphur contents of three rapeseeds (colza), CRMs 190, 366 and 367. Commission of the European Communities, report EUR 13339 EN, 1-75.
- Williams, P.C. (2001). Implementation of Near-Infrared technology. In Near infrared technology in the agricultural, food industries. Williams, P.C., Norris, K.H. Eds, American Association of Cereal Chemist: St. Paul, Minnesota, USA, pp 145-169.
- Williams, P.C., Sobering, D.C. (1996). How do we do it: a brief summary of the methods we use in developing near infrared calibrations. In Near Infrared Spectroscopy: The Future Waves. Davies, A.M.C., Williams, P.C., Eds., NIR Publications: Chichester, U.K., pp 185-188.

Wittkop, B., Snowdon, R., Friedt, W. (2012). New NIRS Calibrations for Fiber Fractions Reveal Broad Genetic Variation in *Brassica napus* Seed Quality. *J Agric Food Chem.* 60, 2248-2256.

Zukalová, H. and Vašák, J. (2002). The role and effects of glucosinolates of *Brassica* species - A review. *Rostlinna Vyroba.* 48(4), 175-180.



Capítulo VII

**Uso de la
Espectroscopía de
Infrarrojo Cercano
para el análisis del
contenido de fibra
ácido detergente en
nabizas y grelos
(*Brassica rapa* L.
subsp. *rapa*)**

Artículo en preparación

Obregón-Cano, S., Moreno-Rojas, R. Jurado-Millán, A. y De Haro-Bailón, A.

Capítulo VII

Uso de la espectroscopía de infrarrojo cercano para el análisis del contenido de fibra ácido detergente en nabizas y grelos (*Brassica rapa* L. subsp. *rapa*).

S. Obregón-Cano^a, R. Moreno-Rojas^b, A.M. Jurado-Millán^a, E. Cartea^c y A. De Haro-Bailón^a.

^a Departamento de Mejora Genética, Instituto de Agricultura Sostenible (CSIC), Alameda del Obispo s/n, C.P. 14004. Córdoba, España.

^b Departamento de Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Universidad de Córdoba, Campus Universitario Rabanales. Carretera Nacional IV Km. 396. C.P. 14014. Córdoba, España.

^c Departamento de Genética de Plantas. Misión Biológica de Galicia, (CSIC), Apartado 28, 36080 Pontevedra, España.

Resumen

Se ha evaluado el potencial de la espectroscopia de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS para el análisis del contenido de fibra ácido detergente (FAD) en dos partes de *Brassica rapa*, nabizas y grelos, muy apreciadas en el norte de España y Portugal. Se analizó espectralmente un conjunto de 134 muestras en un equipo NIRS y se aplicó el método de regresión por mínimos cuadrados parciales modificado (MPLS). Se desarrollaron tres ecuaciones de calibración: en la ecuación sin tratamiento de datos (0,0,1,1) se obtuvo un $R^2 = 0,91$, en la ecuación con tratamiento en primera derivada (1,4,4,1) un valor de 0,95 y en la ecuación con segunda derivada (2,5,5, 2) un valor de 0,96. La precisión de la estimación se basó en parámetros como la RPD (relación entre la desviación estándar y el error estándar de la validación) y el RER (relación entre el intervalo de valores de FAD y el error estándar de predicción) de la validación externa, se obtuvieron valores de 2,75 y 9,00 para el tratamiento sin derivar, 3,41 y 11,79 con la primera derivada, 3,10 y 11,03 con la segunda derivada. El espectro del residuo ácido detergente mostró las longitudes de onda y las bandas del espectro que pueden estar más asociadas con el contenido de FAD en la muestra. Los resultados demostraron el gran

potencial de NIRS para el análisis predictivo del contenido de FAD en nabizas y grelos y su uso como una herramienta rápida y económica en programas de mejora de *Brassica rapa* L. subsp. *rapa*.

Palabras Clave: *Brassica rapa*, nabizas, grelos, fibra ácido detergente, NIRS.

Introducción

Las plantas del género *Brassica* constituyen uno de los grupos de plantas económicamente más importantes del mundo. Son fuentes importantes de raíces, tallos, hojas, brotes e inflorescencias, así como de aceites, condimentos y forraje para uso alimentario o industrial (Gómez-Campo, 1980). Dependiendo de la parte de la planta utilizada, sus cultivos se clasifican en oleaginosos, forrajeros, hortícolas y condimentarios. El creciente interés científico de este grupo botánico ha aumentado paralelamente a su importancia económica y sus logros en investigación. El consumo de vegetales del género *Brassica* se ha relacionado con la salud humana en la reducción del riesgo de padecer cierto tipo de enfermedades crónicas, como problemas cardiovasculares y diferentes tipos de cáncer (Cartea et al., 2008; Traka et al., 2009). Dentro del género *Brassica*, cuatro especies, *B. oleracea*, *B. rapa*, *B. napus* y *B. juncea*, contienen la mayoría de los cultivos con uso hortícola. El cultivo de *Brassica rapa* L. subsp. *rapa*, conocida comúnmente como nabo, es uno de los más antiguos utilizados para el consumo humano. Fue la primera especie de *Brassica* domesticada por el hombre hace miles de años, apareciendo ya citada en la literatura sánscrita con el nombre de *Siddharta*, lo que prueba la antigüedad de su cultivo (Prakash, 1961). En el norte de España y Portugal, las nabizas y los grelos son un cultivo en alza, ocupando un lugar destacado en la agricultura tradicional gallega y portuguesa. Las nabizas son las hojas jóvenes de la planta recogidas en el periodo vegetativo, mientras que los grelos son los tallos florales recogidos justo antes de la apertura a flor. En el caso de los grelos, la diversificación de este producto está cobrando especial importancia, siendo cada día mayor el número de empresas de envasado y congelado que aparecen en torno a él, no solo en Galicia sino también en otras partes de España. Un factor importante a tener en cuenta en la composición nutricional de las nabizas y grelos es la fibra, además de la presencia de otros componentes, como algunas vitaminas y minerales que complementan parcialmente las demandas cotidianas de la dieta. El contenido de fibra en los vegetales es esencial para la digestibilidad del alimento; es reconocido que la

ingesta de fibra proporciona muchos beneficios a la salud humana, contribuyendo a la prevención de cáncer de colon y a reducir el riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares, infarto cerebral, hipertensión, diabetes, obesidad y ciertos desórdenes gastrointestinales (Anderson et al., 2009). Tradicionalmente los carbohidratos estructurales de los alimentos se han estimado mediante el análisis del contenido en fibra bruta. La fibra bruta se puede definir como el residuo resultante tras someter al alimento a un proceso de hidrólisis doble: ácida (con ácido sulfúrico) y alcalina (con hidróxido potásico), mediante el protocolo desarrollado por el método Weende (AOAC, 1995). Un inconveniente de esta doble hidrólisis es que solubiliza parte de la hemicelulosa y de la lignina de la pared celular, por lo que el resultado que se obtiene del contenido en fibra bruta es menor que el contenido real en carbohidratos estructurales. Este problema se evita mediante el uso de soluciones detergentes para el análisis de fibra, de acuerdo con el método propuesto por Goering y Van Soest (1970). La fibra neutro detergente (FND) estima el contenido en celulosa, hemicelulosa, lignina, cutina y minerales insolubles de la pared celular, y se determina como el residuo que queda tras la extracción con la solución neutro-detergente (formada por sulfato lauril sódico y EDTA). La fibra ácido detergente (FAD) es un estimador del contenido en celulosa, lignina, cutina y minerales insolubles de la pared celular y se determina como el residuo que queda tras la digestión de la muestra con una solución ácido-detergente (formada por ácido sulfúrico diluido y bromuro de cetil-trimetil-amonio). La diferencia entre FND y FAD es la fracción de hemicelulosa. Con el método FAD se hidroliza la hemicelulosa, de ahí que la determinación de FAD esté más asociada a la degradabilidad y digestibilidad, mientras que el contenido de FND sólo está relacionado con la ingestión o con una fracción muy utilizable aún por el organismo (Van Soest et al., 1967). Varios autores han documentado la correlación negativa existente entre el contenido de FND y de FAD con la digestibilidad de los productos vegetales (Oh et al., 1966; Hovin et al., 1976; Archer et al., 1977). En el mismo sentido, también se ha demostrado la alta correlación negativa existente entre el contenido en FAD y la digestibilidad in vitro, pudiendo ser considerado por lo tanto el contenido en FAD de un vegetal como un buen indicador de la digestibilidad y calidad del mismo (Hill et al., 1977; Soh et al., 1984; Van Soest et al., 1985).

Los métodos de análisis del contenido en fibra y sus componentes antes descritos son caros, lentos, agresivos con el medio ambiente y necesitan mano de obra especializada para su aplicación. Desde los últimos 40 años, la tecnología basada en la espectroscopía

por reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS) se ha desarrollado como una herramienta rápida, consistente y económica frente a los análisis de componentes en laboratorio que consumen mucho tiempo, son costosos y conllevan el manejo de reactivos peligrosos (Scotter, 1990; Bochereau et al., 1992; Font et al., 2005, 2006; Cozzolino et al., 2004; Sinelli et al., 2008; Davey et al., 2009). Hoy día, la tecnología NIRS se aplica rutinariamente en los programas de mejora genética de muchas especies vegetales para determinar el contenido en fibra, humedad, aceite, proteína, minerales, glucosinolatos y composición de ácidos grasos de sus partes consumibles (Helgerud et al., 2015; Hell et al., 2016; Guo et al., 2016; Núñez et al., 2016). Las primeras calibraciones para el contenido de fibra cruda en semilla en el género *Brassica* fueron desarrolladas por Panford et al. (1988) y Michalski et al. (1992). Más recientemente calibraciones para el contenido de FAD en semillas de diferentes especies de *Brassica* han sido desarrolladas por Font et al. (2003), Font et al. (2005), Dimov et al. (2012) y Wittkop et al. (2012). Recientemente se ha utilizado la técnica NIRS para la rápida determinación de la calidad de la materia prima, a partir del estudio de la fibra como componente de la biomasa (Foster et al., 2013), para determinar la digestibilidad de la caña de azúcar (Daniel et al., 2014) o para el estudio del contenido de fibra en alimentos para rumiantes (Krizsan et al., 2015).

El objetivo de este trabajo ha sido el desarrollo y validación de ecuaciones de calibración NIRS para la determinación de fibra ácido detergente (FAD) en partes aéreas comestibles de *Brassica rapa* (nabizas y grelos), con vistas a su uso como herramienta para el análisis rápido y no destructivo en el cribado de colecciones de germoplasma y en la selección de los genotipos de mayor calidad respecto a este componente.

Material y Métodos

Material Vegetal

Brassica rapa se cultivó en la finca experimental del Instituto de Agricultura Sostenible de Córdoba (37°51' N, 4°48'W, España) en un diseño de bloques al azar con 3 repeticiones. El clima es típico mediterráneo con una precipitación media de 650 mm, y el suelo es profundo, franco-arenoso, clasificado como Typic Xerofluvent.

Las entradas de *Brassica rapa* L. subsp. *rapa* procedieron del Banco de Germoplasma de *Brassica* de la Misión Biológica de Galicia (Pontevedra), en donde habían sido evaluadas por sus características agronómicas y su aptitud para producción de nabizas y

grelos. En la temporada 2013-2014 se cultivaron 19 entradas y en la temporada 2014-2015 fueron 6 entradas. Durante cada temporada agrícola, y en el momento óptimo para consumo, se tomaron muestras de nabizas (4 a 5 hojas por planta) y de grelos (3 a 4 tallos florales por planta) de las plantas seleccionadas para cada una de las entradas estudiadas. En total se cosecharon 134 muestras, 78 muestras en la temporada 2013-14 (34 nabizas y 44 grelos) y 56 muestras en la temporada 2014-2015 (29 nabizas y 27 grelos). Todo el material vegetal se lavó a fondo con agua del grifo para eliminar la suciedad y el polvo de la superficie y se finalizó con un lavado en agua desionizada. A continuación se almacenaron a -80 °C hasta el momento de su liofilización, que se realizó en un equipo Telstar® modelo Cryodos-50 (Telstar, Terrasa, España). Las muestras liofilizadas se molieron en un molino IKA-Labortechnik® modelo A10, durante 20 segundos y se almacenaron en desecador hasta el momento de ser analizadas por el método de referencia o escaneadas en el equipo NIRS.

Análisis del contenido de fibra ácido detergente

El contenido de FAD se determinó de acuerdo con los procedimientos descritos por Goering y Van Soest (1970) en un aparato de Dosi-Fiber (Selecta®, España). Se pesó 0,5 g de muestra liofilizada y molida en crisoles de vidrio filtrantes (porosidad 2). Se sometió a digestión durante una hora en 100 ml de bromuro de cetiltrimetilamonio caliente en medio ácido (ácido sulfúrico). Después, la digestión se filtró para obtener el residuo considerado como la fibra ácido detergente de la muestra. A continuación el residuo se lavó con agua caliente y acetona y se secó en estufa a 110°C una hora y media. Posteriormente se almacenó en desecador, 30 min, para atemperar los crisoles y se procedió a su pesada. El residuo ácido detergente (RAD) que quedó tras la digestión se recuperó de los crisoles y se almacenó para obtener su espectro NIRS y poder compararlo con el de las muestras no digeridas.

El contenido en fibra ácido detergente de la muestra se calculó de acuerdo con la fórmula 1:

$$(1) \quad \%FAD = \frac{P3 - P1}{P2 - P1} * 100$$

Donde P1 es el peso crisol, P2 es el peso del crisol con la muestra y P3 es el peso del crisol con el residuo ácido detergente después de la digestión. Cada muestra se analizó por duplicado.

Desarrollo de ecuaciones NIRS

Se utilizó un espectrofotómetro de infrarrojo cercano modelo 6500 (Foss-NIRSystems®, Inc., Silver Spring, MD, EE.UU.) para llevar a cabo los registros de los espectros de las muestras en modo de reflectancia. Se registró un espectro por cada muestra. Las muestras se colocaron en una cápsula redonda de 3 cm de diámetro, compuesta de vidrio de cuarzo y aluminio anodizado para evitar interferencias en la absorción. De cada muestra se obtuvieron los espectros de reflectancia en el rango de longitudes de onda de 400 a 2500 nm, a intervalos de 2 nm. La recogida de los datos espectrales y el análisis quimiométrico de los mismos se llevó a cabo mediante el programa WinISI II v1,50 (Infrasoft International, Port Matilda, PA, USA).

La detección de anómalos espectrales se realizó mediante el análisis de componentes principales (PCA) aplicado a todo el conjunto de la población basado en el cálculo de la distancia de Mahalanobis (H) (Shenk et al., 1991, 1996). Éste análisis además de ser una herramienta para la selección de muestras del colectivo de calibración, es una técnica de gran utilidad en el análisis para transformar los datos espectrales originales (valores de absorbancia) en nuevas variables (componentes principales) ortogonales, eliminando con ello la colinealidad (información redundante) (Martens et al., 1989). Se calcularon las distancias entre los espectros de las distintas muestras respecto al espectro medio. Se utilizó el algoritmo CENTER incluido en el programa WinISI II (versión 1.50 Infrasoft International, Port Matilda, PA, USA) para el cálculo de las distancias H entre los espectros de las distintas muestras respecto al espectro medio. De acuerdo con Shenk y Westerhaus (1991), las muestras con un valor del estadístico H superior a 3 unidades se definieron como espectros atípicos y se eliminaron para el desarrollo de las ecuaciones. Se encontraron un total de 4 espectros que fueron eliminados del conjunto de muestras utilizado en el trabajo. El número final de muestras seleccionadas fue de 130, el conjunto de calibración se compuso de 104 muestras y se usó para el desarrollo de las diferentes ecuaciones de calibración, y el grupo de validación externa se formó con el 20% del total de las muestras (n=26) y se usó para evaluar la capacidad predictiva de cada una de las ecuaciones desarrolladas. La selección de las muestras del grupo de validación externa se realizó a partir del listado de muestras ordenadas en base a sus valores de H, eligiendo 1 de cada 5 muestras del listado ordenado (Shenk et al., 1991). De esta manera, las muestras de validación externa seleccionadas representan todo el intervalo de variabilidad del conjunto de la población (Hruschka, 2001). Para el

desarrollo de las ecuaciones de calibración se aplicó el método de regresión por mínimos cuadrados parciales modificados (MPLS), del que se ha mostrado su utilidad para la evaluación del contenido en fibra, utilizando todo el rango espectral (400-2500 nm) (Font et al., 2003, 2006).

Se aplicó el procedimiento de corrección de espectros SNV+DT que proporciona el programa WinISI para eliminar la dispersión debida a los efectos causados por las diferencias en tamaño de partícula o la variación de longitud de camino entre la dispersión de las muestras y ajustar la línea base (Barnes et al., 1989). El tratamiento seleccionado para un parámetro en un conjunto de datos no siempre es la mejor opción para el mismo parámetro en cualquier otro conjunto de muestras (Núñez et al., 2016), esto confirma la importancia de optimizar el tratamiento para cada parámetro y conjunto de datos. En este sentido, los tratamientos matemáticos seleccionados aplicados a los espectros en el trabajo fueron (0,0,1,1), (1, 4, 4, 1) y (2, 5, 5, 2), donde el primer número indica el orden de derivada (primera o segunda derivada del logaritmo de 1/R), el segundo número es la amplitud o distancia entre los segmentos a sustraer, el tercer número es la longitud del segmento a ser suavizado y el cuarto número indica un segundo suavizado (Shenk et al., 1992). Los estadísticos que definen las ecuaciones de calibración obtenidas son el Coeficiente de Determinación (R^2) que indica el porcentaje de la variabilidad existente en las concentraciones de FAD explicado por la ecuación de regresión, y el Error Estándar de la Calibración (SEC) que es el error estándar de los residuales para el colectivo de calibración. Hay que destacar que el error estándar de la calibración solamente nos indica el ajuste de los valores de referencia a la línea de regresión, por lo que no puede considerarse un estadístico adecuado para evaluar la validez de la ecuación de calibración obtenida (Shenk et al., 1996).

Validación de las ecuaciones

Para evaluar la capacidad predictiva de las ecuaciones de calibración se utilizaron dos modelos de validación que permiten establecer una comparación (mediante diferentes criterios estadísticos) entre el valor verdadero (valor obtenido por método de referencia) y el valor estimado (valor obtenido por NIRS).

Validación cruzada

En primer lugar, se realizó una validación cruzada basada únicamente en los datos empleados en la etapa de calibración, para calcular el número óptimo de términos de la regresión. El algoritmo selecciona diferentes colectivos de calibración y validación

dentro del total de la población considerada, realizando con cada selección una simulación del algoritmo de regresión (Martens et al., 1989; Shenk et al., 1991). Finalmente el programa de cálculo seleccionó la ecuación que hace mínimo el Error Estándar de Validación Cruzada (SECV). Los estadísticos resultantes de la validación cruzada fueron el Coeficiente de Determinación de la Validación Cruzada (r^2_{vc}), el Error Estándar de la Validación Cruzada (SECV), que representa el error estándar de los residuales para el colectivo de validación cruzada, y el estadístico (RPD) (Fórmula 2) que es la relación entre la desviación estándar y el error estándar de la validación cruzada (SD/SECV). El RPD_{vc} es un estadístico que permite la evaluación del SECV en función de la desviación estándar de los datos de referencia para la población en estudio (Williams, 2001).

$$(2) \quad RPD = SD \left\{ \left[\left(\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2 \right) (n - k - 1)^{-1} \right]^{0.5} \right\}^{-1}$$

Donde y_i = valor de referencia de laboratorio para la muestra; \hat{y}_i = NIR valor medio; n = número de muestras, k = número de longitudes de onda utilizadas en una ecuación; SD = desviación estándar de los datos químicos.

Validación externa

En segundo lugar se realizó una evaluación de las ecuaciones de calibración seleccionadas con muestras que no intervinieron en la calibración (colectivo de validación, $n=26$ en este trabajo). Las estadísticas de la validación externa incluyen el Coeficiente de Determinación de la Validación (r^2_{ve}), el Error Estándar de Predicción (SEP), el RPD_{ve} (que es la relación SD/SEP) y el RER (Fórmula 3) que es la relación entre el intervalo de los datos de FAD del conjunto de validación y el error estándar de la predicción.

$$(3) \quad RER = \text{rango} \left\{ \left[\left(\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2 \right) (n - k - 1)^{-1} \right]^{0.5} \right\}^{-1}$$

Donde y_i = valor de referencia de laboratorio para la muestra; \hat{y}_i = NIR valor medio; n = número de muestras, k = número de longitudes de onda utilizadas en una ecuación; SD = desviación estándar de los datos químicos.

Los estadísticos RPD y RER permiten la comparación del rendimiento del modelo a través de poblaciones con diferentes desviaciones estándar (Cozzolino et al., 2004). Las

mejores ecuaciones de calibración para el análisis de la fibra ácido detergente se seleccionaron considerando la combinación óptima de los siguientes estadísticos de la validación externa: altos valores de los coeficientes de determinación (r^2_{ve}) y altos valores de RPD_{ve} y de RER. Aquellas ecuaciones cuyo RPD es superior a 3 se consideran con excelente capacidad de predicción, las que tienen RPD entre 2 y 3 permiten realizar predicciones aproximadas, y aquellas cuyo RPD está entre 1,5 y 2 sólo pueden utilizarse con fines de clasificación en grupos de alto-medio-bajo contenido. Igualmente, los valores de RER obtenidos con las distintas ecuaciones de calibración con buena capacidad predictiva deben ser mayores de 10 (Williams et al., 1996; Williams, 2001).

El error estándar de laboratorio (SEL) para el análisis de fibra ácido detergente se determinó y se comparó con el SEP para todas las ecuaciones. Para obtener el error total del método de referencia (SEL), se seleccionaron 10 muestras de nabizas y grelos que se analizaron por duplicado en diferentes momentos y por diferentes analistas. La relación SEP/SEL permite relacionar el error de NIRS con el error del método de referencia.

Resultados y Discusión

Análisis de referencia de FAD en muestras de nabizas y grelos

Se analizaron 134 muestras de *Brassica rapa* (63 nabizas y 71 grelos) por el método de Goering y Van Soest (1970). En la Tabla 1 se muestra el intervalo de los datos, media y desviación estándar de las 134 muestras analizadas entre nabizas y grelos. El contenido medio de FAD en nabizas fue de 11,53 % y en grelos de 15,98%. Mediante la prueba t, las medias se evaluaron y mostraron diferencias significativas entre ellas ($P < 0,001$). Las diferencias en el contenido en FAD se explican porque las nabizas están formadas por hojas jóvenes y los grelos por tallos florales con mayor contenido en fibra. El crecimiento de las plantas aumenta la protección y firmeza de los tejidos, que en su mayoría consisten en lignina e hidratos de carbono estructurales, tales como celulosa y hemicelulosas. Por lo tanto, en la madurez de las plantas hay un aumento de los hidratos de carbono estructurales que aumentan las cantidades de fibra (Arzani et al., 2004)

Tabla 1. Contenido en fibra de las muestras de nabizas y grelos de *Brassica rapa*, analizadas directamente.

Fibra ácido detergente (%)				
	N	Intervalo	Media	SD ^a
Nabizas	63	8,55-15,27	11,53	1,54
Grelos	71	10,41-21,91	15,98	2,54

^a Desviación estándar

Estos resultados confirman que *Brassica rapa* es una buena fuente de fibra con concentraciones altas en algunas muestras (21,91 %) y concentraciones más bajas en otras (8,55 %). En la Figura 1 se muestran la distribución de frecuencia del contenido en fibra de nabizas y grelos de las muestras estudiadas.

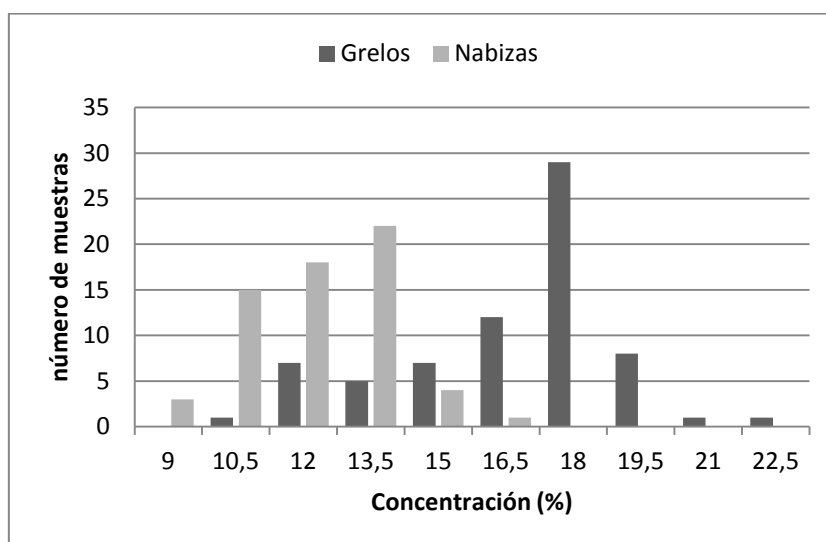


Figura 1. Distribución gráfica del número de muestras de nabizas y grelos respecto a su contenido en FAD

La variabilidad para el contenido de FAD de las muestras analizadas en este trabajo es similar a la publicada en otros trabajos, donde se presentan valores de FAD en hojas de *Brassica rapa* de 23,50% (Türk et al., 2009); en fibra cruda de 12,9 % y en FAD de 23,5 % (Francisco et al., 2011). En trabajos sobre el nabo (hipocotilo engrosado de *Brassica rapa* que se utiliza ampliamente en la alimentación humana), encontramos contenidos medios de FAD de 14,68 % (Azam et al., 2013), de 28,28 % (Saeed et al., 2012) y de 11,20 % (Türk et al., 2009). En harina de semilla de colza los valores del contenido en FAD se encuentran comprendidos entre 9,5 y 15,2 % (Daszykowski et al.,

2008); y en semillas de otras especies de *Brassica* los valores están comprendidos entre 5,33% (*B. carinata*) y 16,31% (*B. juncea*) (Font et al., 2003).

Los datos estadísticos que describen los conjuntos de calibración y validación se muestran en la Tabla 2. El intervalo de valores del conjunto de muestras de la validación estuvieron incluidos dentro del intervalo de valores del conjunto de muestras de la calibración, requerido para generar un modelo de calibración de capacidad predictiva fiable (Petisco et al., 2005).

Tabla 2. Contenido en FAD de las muestras de nabizas y grelos pertenecientes al grupo de calibración y de validación de *Brassica rapa*, analizadas según el método de referencia vía húmeda

Fibra ácido detergente (%)			
	Intervalo	Media	SD ^a
Grupo Calibración (n= 104)	8,75-20,02	13,87	2,98
Grupo Validación (n=26)	8,55-18,81	13,67	3,01

^a Desviación estándar

Calibración y Validación

El análisis de componentes principales fue llevado a cabo para localizar posibles anómalos espectrales del conjunto de calibración (Shenk et al., 1991). En la Figura 2(a) se muestra el espectro medio de las muestras de *Brassica rapa* en el intervalo de 400 a 2500 nm, en la Figura 2(b) mostramos la primera derivada del espectro (1,4,4,1; SNV-DT) y en la Figura 2(c) la segunda derivada del espectro (2,5,5,2; SNV-DT), ambas derivadas con aplicación de un tratamiento de corrección de espectros.

Con el fin de identificar longitudes de onda y asociar bandas de los espectros de nabizas y grelos con la FAD contenida en la muestra, se recogió el espectro NIRS del residuo ácido detergente (RAD), resultante de la digestión de la muestra. El espectro de RAD, Figura 3, se comparó con el espectro de las muestras de nabizas y grelos, Figura 2, con vistas a identificar las regiones del espectro NIRS que pudieran estar más relacionadas con el contenido de FAD de la muestra

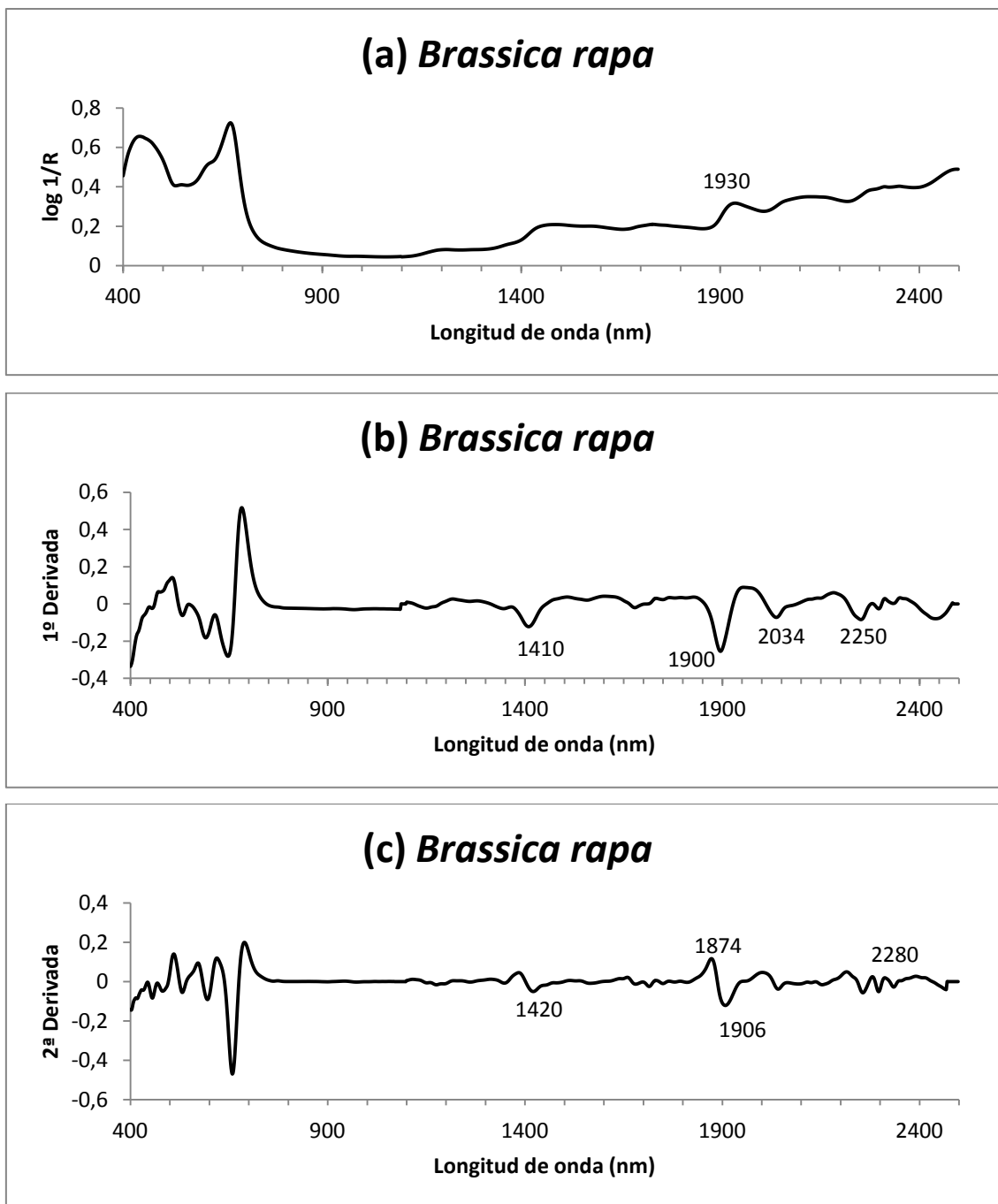


Figura 2. (a) Espectro medio de muestras de de *Brassica rapa*; (b) Primera derivada (SNV-DT) del espectro medio de *Brassica rapa*; (c) Segunda derivada (SNV-DT) del espectro medio de *Brassica rapa*.

En los espectros de *Brassica rapa* y RAD, encontramos similitudes de absorción en determinadas longitudes de onda. Destacamos las longitudes de onda a 1420 nm relacionada con grupos aromáticos, a 1906 nm relacionada con grupos OH, C=O y CO₂H, y 2278 nm relacionada con grupos CH y CH₂ asociados a polisacáridos estructurales de las plantas, y a 2468 nm relacionada con grupos CH, CH₂ y C-N-C

asociado a proteínas (programa WinISI II v1,50; Osborne, 1986). Esas longitudes de onda participarían más en el desarrollo de calibraciones robustas para el contenido de FAD.

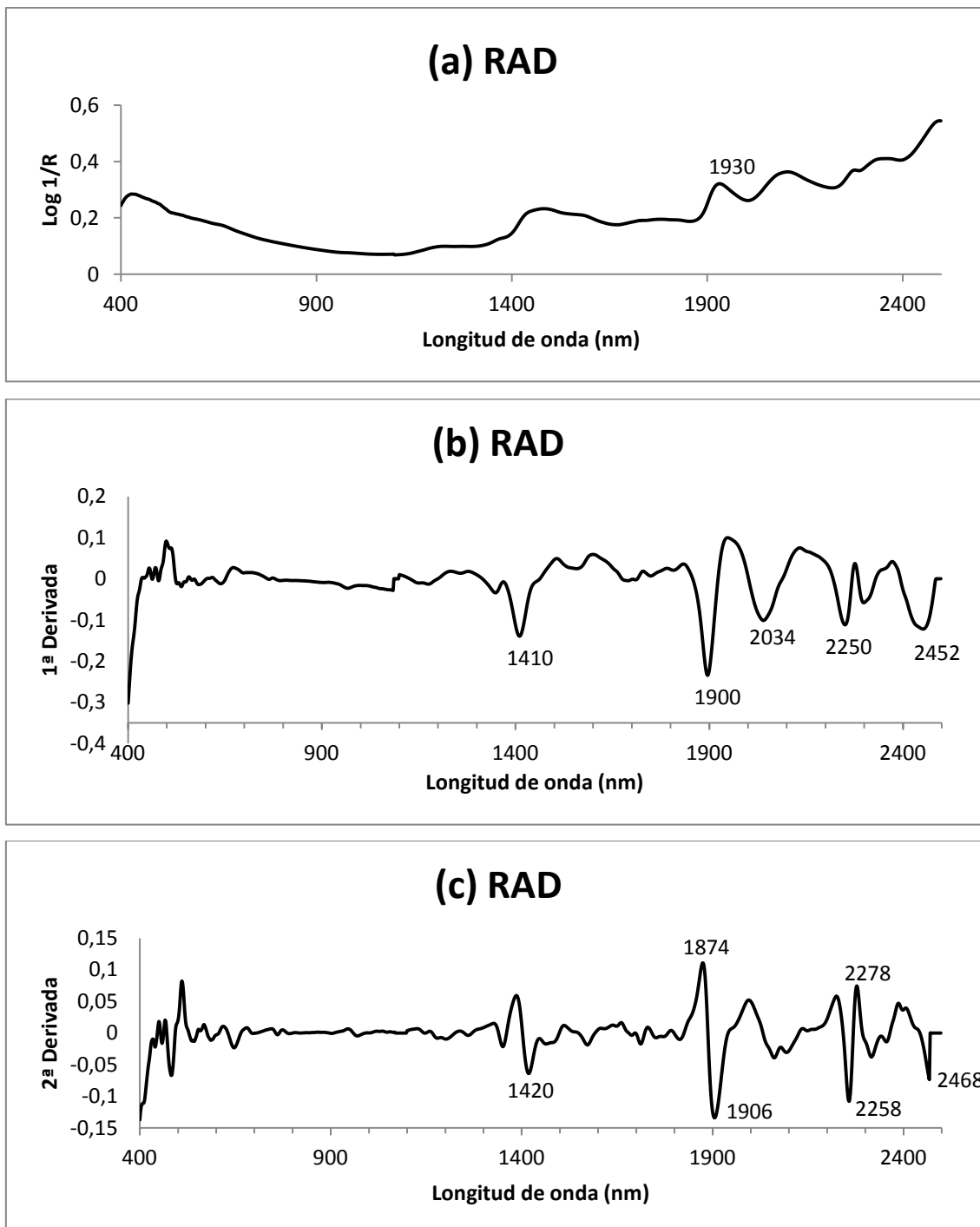


Figura 3. (a) Espectro medio del residuo ácido detergente (RAD); (b) Primera derivada (SNV-DT) del espectro medio de RAD; (c) Segunda derivada (SNV-DT) del espectro medio de RAD.

Los resultados de las ecuaciones de calibración obtenidas por regresión MPLS con los tratamientos matemáticos aplicados se muestran en la Tabla 3. En la evaluación de los tratamientos aplicados en el desarrollo de las ecuaciones de calibración obtuvimos una clara diferencia entre los valores estadísticos obtenidos en la ecuación sin tratamiento (0,0,1,1) ($R^2=0,91$) y las ecuaciones con tratamientos de derivadas, con un valor de R^2 de 0,95 en primera derivada (1,4,4,1; SNV+DT) y un valor de R^2 de 0,96 en segunda derivada (2, 5, 5, 2; SNV + DT), ambos valores muy semejantes entre sí (Tabla 3).

Tabla 3. Estadísticos de calibración y de validación cruzada para contenido en FAD en muestras de *Brassica rapa*.

TM ^a	Intervalo	n	Calibración				Validación cruzada		
			Media	SD ^b	SEC ^c	R ^{2d}	SECV ^e	RPD _{vc} ^f	r ² _{vc} ^g
0,0,1,1	8,75-20,02	101	13,81	2,95	0,86	0,91	1,07	2,77	0,87
1,4,4,1	8,75-20,02	104	13,80	2,96	0,65	0,95	0,88	3,36	0,91
2,5,5,2	8,75-20,02	103	13,82	2,95	0,56	0,96	0,89	3,33	0,91

^a Tratamiento matemático de los espectros.

^b Desviación estándar.

^c Error estándar de la calibración.

^d Coeficiente de determinación de la calibración.

^e Error estándar de la validación cruzada.

^f Relación entre la desviación estándar y el error estándar de la validación cruzada.

^g Coeficiente de determinación de la validación cruzada.

Validación cruzada

Según los estadísticos obtenidos en la validación cruzada, las ecuaciones de calibración final para el contenido en FAD fueron seleccionadas en base a maximizar el r^2_{vc} y a minimizar el SECV. Los valores de RPD_{vc} de la validación cruzada para FAD obtenidos fueron 3,36 (para el tratamiento 1,4,4,1) y 3,33 (para el tratamiento 2,5,5,2). En ambas ecuaciones los valores de RPD_{vc} fueron superiores a 3, valores indicativos de que las ecuaciones de calibración pueden utilizarse con fines de diagnóstico e investigación (Williams et al., 1996).

Los dos tratamientos de derivatización (1,4,4,1 y 2,5,5,2) realizados para optimizar el modelo proporcionaron unos resultados óptimos en los valores estadísticos, siendo los dos modelos válidos para la calibración. Algunos autores han evaluado en sus estudios diferentes tratamientos matemáticos para el desarrollo de modelos de calibración con otros parámetros y matrices, obteniendo varios modelos válidos para la calibración de un mismo parámetro. En el estudio del perfil de ácidos grasos en leche se desarrollaron

ecuaciones de calibración con la primera derivada y con la segunda derivada, (1,5,5,1) y (2,5,5,1), y ambos tratamientos fueron perfectamente válidos para ser utilizados en la caracterización del contenido graso en leche (Núñez et al. 2016). Otros autores estudiaron la evaluación de la proteína y amilosa en el arroz integral y salvado, donde se probaron cinco tratamientos, incluidas primera y segundas derivadas, resultando dos tratamientos (1,6,6,1 y 1,4,4,1) como igualmente válidos para el desarrollo de ecuaciones de calibración de amilosa (Bagchi et al. 2016).

En la Figura 4 se representan los valores de laboratorio frente a los de predicción de NIRS del conjunto de validación cruzada para el contenido de FAD.

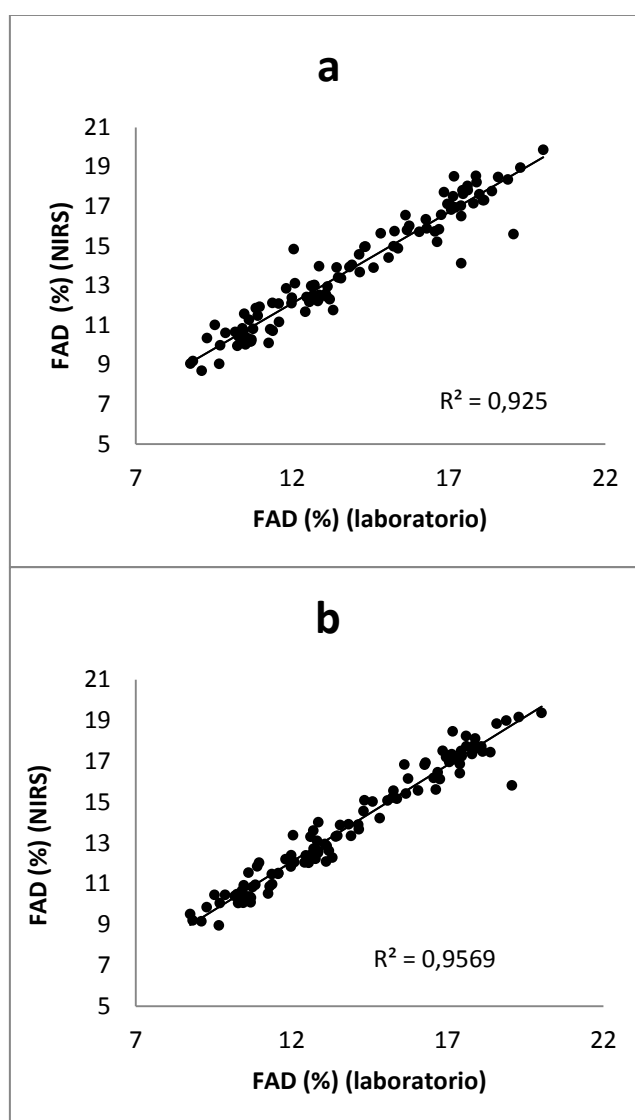


Figura 4. Representación gráfica de los valores de referencia frente a los valores de predicción en validación cruzada respecto al contenido de FAD aplicando la ecuación 1,4,4,1 (a) y 2,5,5,2 (b) .

Validación externa

Una vez obtenidas las ecuaciones y realizada la validación cruzada, se procedió a una segunda evaluación de las ecuaciones mediante el empleo de muestras no incluidas en la calibración (colectivo de validación externa) para la predicción del contenido de FAD. En la Tabla 4, presentamos los estadísticos de la validación externa obtenidos para las ecuaciones de FAD desarrolladas con los tres tratamientos matemáticos.

Tabla 4. Estadísticos de la validación externa (n=26) aplicada a las ecuaciones de calibración del contenido de fibra de *Brassica rapa*

TM ^a	Intervalo	n	Media	SD ^b	SEP ^c	r ² _{ve} ^d	RPD _{ve} ^e	RER ^f
0,0,1,1	8,55-18,81	26	13,67	3,13	1,14	0,87	2,75	9,00
1,4,4,1	8,55-18,81	25	13,55	2,96	0,87	0,91	3,41	11,79
2,5,5,2	8,55-18,81	25	13,55	2,89	0,93	0,91	3,10	11,03

^a Tratamiento Matemático.

^b Desviación estándar de los datos de referencia del colectivo de validación externa.

^c Error estándar de la predicción.

^d Coeficiente de determinación de la validación externa.

^e Relación entre la desviación estándar y el error estándar de la predicción.

^f Relación entre el intervalo de datos y el error estándar de la predicción.

En el tratamiento 0,0,1,1, se obtuvo un valor de $r^2_{ve}=0,87$, dando lugar a valores de RPD_{ve} y RER inferiores a los tratamientos con derivadas. En los tratamientos (1,4,4,1) y (2,5,5,2) se obtuvo el mismo alto valor en los coeficientes de determinación de la predicción ($r^2_{ve}=0,91$). Los valores de RPD_{ve} fueron muy semejantes entre ellos, un valor de 3,41 en la primera derivada y de 3,10 en la segunda derivada, ambos muy similares a los resultados de RPD_{ve} obtenidos en la validación cruzada (valores mayores que 3) y que confirman la excelente capacidad para predecir el contenido de FAD en muestras independientes a las utilizadas en la calibración (Williams et al., 1996; Williams, 2001). Finalmente se calculó el estadístico RER y se obtuvieron valores superiores a 10 en ambos casos: 11,79 (1,4,4,1) y 11,03 (2,5,5,2). Lo que es una prueba adicional de la elevada capacidad predictiva de los modelos de calibración desarrollados para FAD (Williams et al., 1996; Williams, 2001).

No hay ecuaciones de calibración del contenido de FAD en nabizas y grelos descritas en la bibliografía hasta el momento, sin embargo sí encontramos ecuaciones desarrolladas para el contenido de FAD en hojas en especies leñosas, donde se mostraron valores más altos que los descritos (RPD_{ve} =5,3) debido posiblemente a la heterogeneidad en las muestras que seleccionaron para el desarrollo de la calibración, donde se incluían

diferentes especies leñosas recogidas en diferentes fechas (Petisco et al., 2006). Calibraciones de FAD en plantas de maíz mostraron valores de RPD_{ve} de 2,9 (Campo et al., 2013) y otros trabajos desarrollados en hojas de gramíneas y trébol rojo presentaron valores de $RPD= 3,4$ en FND, semejantes a los presentados en este trabajo con FAD (Nordheim et al., 2007).

En cuanto a calibraciones dentro del género *Brassica*, los valores obtenidos en las ecuaciones de calibración desarrolladas en nuestro trabajo son los más altos descritos hasta ahora para el contenido de FAD, comparados con las ecuaciones desarrolladas para el contenido de FAD en semilla, reportadas en la bibliografía. Se han descrito calibraciones en semilla intacta de *Brassica napus* con valores de RPD_{ve} de 2,13 y 2,20 (en un volumen de 10 ml de semilla) y valores de 1,91 y 2.34 (en un volumen de 1 ml de semilla) (Font et al., 2005; Wittkop et al., 2012); coinciden con otros autores que presentan también valores de 1,92 en semilla de la misma especie (Dimov et al., 2012). En cuanto a resultados de validación externa, los obtenidos en nuestro trabajo también son más altos que los recogidos en bibliografía de semilla de *Brassica napus*, con RPD_{ve} de 2.22 y de RER de 10.03 (Dimov et al., 2012).

Para evaluar la precisión de las ecuaciones se calculó el error del método de referencia (SEL) y se relacionó con SEP. La relación SEP/SEL mostrada en la FAD fue de 4,56 en el tratamiento 0,0,1,1, que indica una pobre precisión y se obtuvieron valores de 3,48 y 3,72 para los tratamientos de 1,4,4,1 y 2,5,5,2 respectivamente, que indican una buena precisión, estos valores están en concordancia con los obtenidos por otros autores en otras especies de *Brassica* (Font et al., 2003).

Modelo de regresión por Mínimos Cuadrados Parciales Modificados (MPLS) del contenido en FAD en muestras de nabizas y grelos.

Los paneles a, b, y c de la Figura 5 representan gráficamente los términos MPLS 1, 2 y 3 (loading), respectivamente. Estos gráficos muestran los coeficientes de regresión de cada longitud de onda de FAD para cada término. Las longitudes de onda representadas aquí son las que tienen una participación más alta en el desarrollo de cada término, son las de una mayor variación y mejor correlación con FAD en el conjunto de calibración. En la segunda derivada, picos apuntando hacia abajo indican la influencia positiva de los grupos funcionales en el desarrollo de las ecuaciones, mientras que los picos hacia arriba señalan correlaciones negativas. Los términos 1 y 3 del modelo de *B. rapa* mostraron correlaciones con FAD más altas, las principales correlaciones positivas

fueron a 1404, 2308, y 2348 nm, asociadas con la absorbancia de los grupos CH y CO de los lípidos (Figura 5a) (Osborne, 1986; Font et al., 2003; Wittkop et al. 2012). El término 1 también fue influenciado por grupos N-H a 1996 nm. El término 2 fue el más altamente correlacionado con grupos amidas en la región de proteínas a 2052 y 2300 nm. El término 3 fue influenciado por el agua, como indica la banda a 1932 nm. Las longitudes de onda de absorbancia específica de los grupos funcionales del aceite son conocidos por ser los principales contribuyentes a las calibraciones NIRS para el FAD en especies de *Brassica* y de fibra en productos de cereales altos en grasa (Wittkop et al., 2012).

Sobre la base de las similitudes entre la segunda derivada del espectro RAD (Figura 3c) y el tercer término MPLS para *Brassica rapa* (Figura 5), parece que grupos funcionales de la RAD participan directamente en el modelado de este término, en concreto, en 1874 y 2278 nm en relación con grupos CH y CH₂ asociados con los polisacáridos estructurales de las plantas.

Los resultados obtenidos tanto en la validación cruzada como en la validación externa confirman la fiabilidad y capacidad de las ecuaciones de calibración desarrolladas con tratamientos (1,4,4,1) y (2,5,5,2) respecto a su capacidad de predicción del contenido en FAD en muestras de nabizas y grelos.

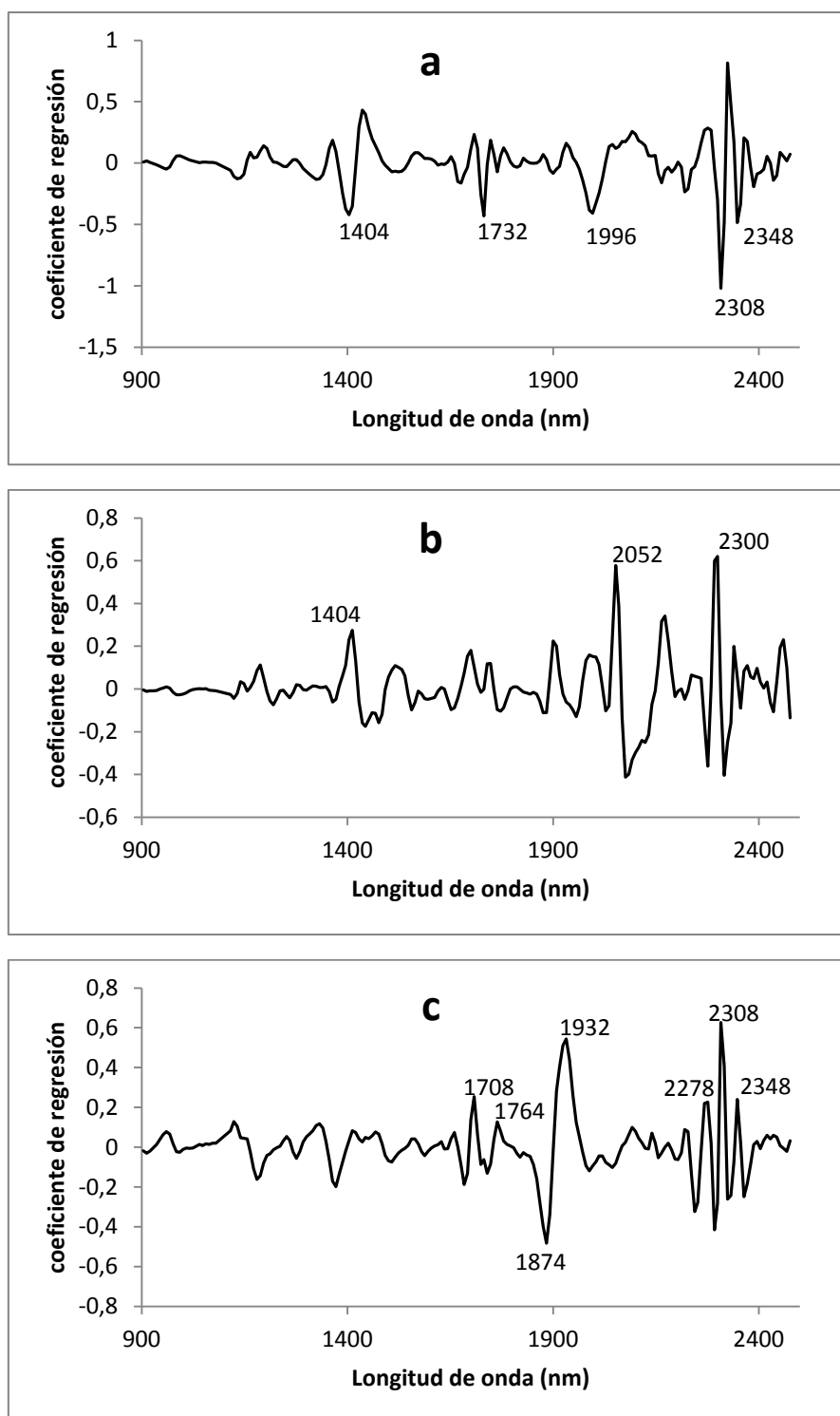


Figura 5. Gráficos de los tres primeros términos (loadings) de la ecuación obtenida por MPLS para la FAD en *Brassica rapa* en segunda derivada (2,5,5,2). Los paneles A, B y C representan los términos MPLS 1, 2 y 3, respectivamente.

Conclusiones

En el presente trabajo se han obtenido por primera vez dos ecuaciones de calibración con dos tratamientos matemáticos (1,4,4,1) y (2,5,5,2), ambos igualmente válidos, que

permiten la utilización de la espectroscopia de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS) para el análisis rápido y preciso del contenido en fibra ácido detergente (FAD) en muestras de nabizas y grelos. Estos resultados permiten utilizar la tecnología NIRS para el análisis del contenido en FAD con fines de investigación, como una herramienta fundamental en los programas de mejora de la calidad de la especie (facilitando y abaratando las tareas de cribado, caracterización y selección de genotipos) y en el control de la calidad nutritiva de los productos obtenidos listos para su consumo.

Agradecimientos

Agradecimiento al Ministerio de Economía y Competitividad del gobierno español por la financiación del proyecto *Genética y mejora de los cultivos de brásicas hortícolas*, Ref. AGL2006-04055 y al proyecto *Genética y Mejora de Brasicas hortícolas: papel de los metabolitos secundarios*, Ref. AGL2012-35539

Referencias

- Anderson, J.W., Baird, P., Davis, Jr R.H., Ferreri, S., Knudtson, M., Koraym. A., Waters, V., Williams, C.L. (2009). Health benefits of dietary fiber. *Nutrition Reviews*. 67(4), 188-205.
- Archer, K.A., Decker, A. M. (1977). Relationship between Fibrous Components and In vitro Dry Matter Digestibility of Autumn-saved Grasses. *Agron J*. 69, 610-612.
- Arzani, H., Zohdi, M., Fish, E., Zahedi Amiri G.H., Nikkhah, A and Wester, D. (2004). Phenological Effects on Forage Quality of Five Grass Species. *Rangeland Ecology & Management*. 57(6), 624-629.
- Association of Official Analytical Chemists Official Methods (AOAC) 978.10 (1995). Fiber (Crude) in animal feed- Fritted glass crucible method. In *Official methods of analysis*, (16th). Helrich, K. Eds. Arlington, Virginia (USA). 1, 20-21.
- Azam, A., Khan, I., Mahmood, A., Hameed, A. (2013). Yield, chemical composition and nutritional quality responses of carrot, radish and turnip to elevated atmospheric carbon dioxide. *J Sci Food Agric*. 93, 3237-3244.
- Bagchi, T.B., Sharma, S., Chattopadhyay, K. (2016). Development of NIRS models to predict protein and amylose content of brown rice and proximate compositions of rice bran, *Food Chem*. 191, 21-27.
- Barnes, R.J., Dhanoa, M.S., Lister, S.J. (1989). Standard normal variate transformation and de-trending of near-infrared diffuse reflectance spectra. *Appl Spectrosc*. 43, 772-777.
- Bochereau, L., Bourguine, P., Palagos, B. (1992). A method for prediction by combining data analysis and neural networks: Application to prediction of apple quality using near infra-red spectra. *J Agr Eng Res*. 51, 207-216
- Campo, L., Monteagudo, A.B., Salleres, B., Castro, P., Moreno-Gonzalez, J. (2013). NIRS determination of non-structural carbohydrates, water soluble carbohydrates and other nutritive quality traits in whole plant maize with wide range variability. *Span J Agric Res*. 11, 463-471.
- Cartea, M.E., Velasco, P. (2008). Glucosinolates in *Brassica* foods: bioavailability in food and significance for human health. *Phytochem Rev*. 7, 213-229.
- Cozzolino, D., Moron, A. (2004). Exploring the use of near infrared reflectance spectroscopy (NIRS) to predict trace minerals in legumes. *Anim Feed Sci Tech*. 111, 161-173.

- Daniel, J.L.P., Capelesso, A., Cabezas-García, E.H., Zopollatto, M., Santos, M.C., Huhtanen, P., Nussio, L.G. (2014). Fiber digestion potential in sugarcane across the harvesting window. *Grass Forage Sci.* 69, 176-181.
- Daszykowski, M., Wrobel, M.S., Czarnik-Matusiewicz, H., Walczak, B. (2008). Near-infrared reflectance spectroscopy and multivariate calibration techniques applied to modelling the crude protein, fiber and fat content in rapeseed meal. *Analyst.* 133, 1523-1531.
- Davey, M.W., Saeys, W., Hof, E., Ramon, H., Swennen, R.L., Keulemans, J. (2009). Application of visible and nearinfrared reflectance spectroscopy (Vis/NIRS) to determine carotenoid contents in banana (*Musa* spp.) fruit pulp. *J Agric Food Chem.* 57, 1742-1751.
- Dimov, Z., Suprianto, E., Hermann, F. and Möllers, C. (2012). Genetic variation for seed hull and fiber content in a collection of European winter oilseed rape material (*Brassica napus* L.) and development of NIRS calibrations. *Plant Breeding.* 131, 361-368.
- Font, R., Del Río, M. and De Haro-Bailón, A. (2006). The use of near-infrared spectroscopy (NIRS) in the study of seed quality components in plant breeding programs. *Ind Crop Prod.* 24, 307-313.
- Font, R., Del Río, M., Fernández, J.M., De Haro-Bailón, A. (2003). Acid Detergent Fiber Analysis in Oilseed *Brassic*as by Near-Infrared Spectroscopy. *J Agric Food Chem.* 51, 2917-2922.
- Font, R., Wittkop, B., Badani, A.G., Del Río-Celestino, M., Friedt, W., Lühs, W., De Haro-Bailón, A. (2005). The measurements of acid detergent fiber in rapeseed by visible and near-infrared spectroscopy. *Plant Breeding.* 124, 410-412.
- Foster, A.J., Kakani, V.G., Ge, J., and Mosali, J. (2013). Rapid assessment of bioenergy feedstock quality by near infrared reflectance spectroscopy. *Agron J.* 105 (6), 1487-1497.
- Francisco, M., Velasco, P., Lema, M., Cartea, M.E. (2011). Genotypic and Environmental Effects on Agronomic and Nutritional Value of *Brassica rapa*. *Agron J.* 103, 735-742.
- Goering, H.K. and Van Soest, P.J. (1970). Forage fiber analysis; apparatus, reagents, procedures, and some applications. USDA-ARS Agric. Handbook No. 379. U.S. Gov. Print. Office: Washington DC.

- Gómez-Campo, C. (1980). Morphology and morpho-taxonomy of the tribe *Brassiceae*. In *Brassica Crops and Wild Allies: Biology and Breeding*. Tsunoda, S., Hinata, K., Gómez-Campo, C. Eds., Scientific Societies Press, Tokyo, pp 3-31.
- Guo, Y., Ni, Y., and Kokot, S. (2016). Evaluation of chemical components and properties of the jujube fruit using near infrared spectroscopy and chemometrics. *Spectrochim Acta A*.153, 79-86.
- Helgerud, T., Wold, J.P., Pedersen, M.B., Liland, K.H., Ballance, S., Knutsen, S.H., Rukke, E.O., Afseth, N.K. (2015). Towards on-line prediction of dry matter content in whole unpeeled potatoes using near-infrared spectroscopy, *Talanta*.143, 138-144.
- Hell, J., Prückler, M., Danner, L., Henniges, U., Apprich, S., Rosenau, T., Kneifel, W., Böhmendorfer, S. (2016). A comparison between near-infrared (NIR) and mid-infrared (ATR-FTIR) spectroscopy for the multivariate determination of compositional properties in wheat bran samples. *Food Control*. 60, 365-369.
- Hill, R.R., Barnes, R.F. (1977). Genetic Variability for Chemical Composition of Alfalfa. II. Yield and Traits Associated with Digestibility. *Crop Science*. 17, 948-952.
- Hovin, A.W., Marten, G.C. and Stucker, R.E. (1976). Cell wall constituents of reed canarygrass: Genetic variability and relationship to digestibility and yield. *Crop Sci*. 16, 575-578.
- Hruschka, W.R. (2001). Data Analysis Wavelength Selection Methods. In *Near infrared technology in the agricultural, food industries*. Williams, P.C., Norris, K.H. Eds., American Association of Cereal Chemist, St. Paul, Minnesota, USA, pp 35-55.
- Krizsan, S.J., Rinne, M., Nyholm, L., Huhtanen, P. (2015). New recommendations for the ruminal in situ determination of indigestible neutral detergent fiber. *Anim Feed Sci Tech*. 205, 31-41.
- Martens, H., Naes, T. (1989). In *Multivariate calibration*. John Wiley and Sons Eds., Chichester, UK.
- Michalski, K., Ochodzki, P., Cicha, B. (1992). Determination of fiber, sulphur amino acids and lysine in oilseed rape by NIT. In *Making Light Work: Advances in Near Infrared Spectroscopy*. I. Murray, and I. A. Cowe Eds., VCH Weinheim, New York. 333-335.
- Nordheim, H., Volden, H., Fystro, G., Lunnan, T. (2007). Prediction of in situ degradation characteristics of neutral detergent fiber (aNDF) in temperate

- grasses and red clover using near-infrared reflectance spectroscopy (NIRS), *Anim Feed Sci Tech.* 139, 92-108.
- Núñez-Sánchez, N., Martínez-Marín, A.L., Polvillo O., Fernández-Cabanás V.M., Carrizosa J., Urrutia B., Serradilla J.M. (2016). Near Infrared Spectroscopy (NIRS) for the determination of the milk fat fatty acid profile of goats. *Food Chem.* 190, 244-252.
- Oh, H.K., Baumgardt, B.R., Scholl, J.M. (1966). Evaluation of forages in the laboratory. V. Comparison of chemical analysis, solubility tests, and in vitro fermentation. *J Dairy Sci.* 49, 850-855.
- Osborne, B.G. (1986). In *Near Infrared Spectroscopy in Food Analysis*. Longman Scientific and Technical, New York.
- Panford, A., Williams, P.C., Man, J.M. (1988). Analysis of oilseeds for protein, oil, fiber and moisture by near-infrared reflectance spectroscopy. *J Am Oil Chem Soc.* 65, 1627-1634.
- Petisco, C., García-Criado, B., Mediavilla, S., Vázquez de Aldana, B.R., Zabalgoeazcoa, I., García-Ciudad, A. (2006). Near-infrared reflectance spectroscopy as a fast and non-destructive tool to predict foliar organic constituents of several woody species. *Anal Bioanal Chem.* 386, 1823-1833.
- Petisco, C., García-Criado, B., Vázquez de Aldana, B.R., Zabalgoeazcoa, I., Mediavilla, S., García-Ciudad A. (2005). Use of near-infrared reflectance spectroscopy in predicting nitrogen, phosphorus and calcium contents in heterogeneous woody plant species. *Anal Bioanal Chem.* 382, 458-465.
- Prakash, O. (1961). Food and drinks in ancient India. *Munshi Ram Manohar Lal*. Delhi, pp 165-168.
- Saeed, M.K., Anjum, S., Ahmad, I., Nisa, A., Ali, S., Zia, A., Ali, S. (2012). Nutritional facts and free radical scavenging activity of turnip (*Brassica rapa*) from Pakistan. *World Appl Sci J.* 19, 370-375.
- Scotter, C. (1990). Use of near infrared spectroscopy in the food industry with particular reference to its applications to on/in-line food processes. *Food Control.* 1, 142-149.
- Shenk, J.S., Westerhaus, M.O. (1991). Population definition, sample selection, and calibration procedures for near infrared reflectance spectroscopy. *Crop Sci.*, 31, 469-474.

- Shenk, J.S., Westerhaus, M.O. (1996). Calibration the ISI way. In Near infrared spectroscopy: the future waves. Davies A.M.C., Williams P. Eds., NIR Publications, Chichester, UK., 198-202.
- Shenk, J.S., Workman, J.J, Westerhaus, M.O. (1992). Application of NIR spectroscopy to agricultural products. In Handbook of Near-Infrared Analysis. Burns, D.A., Ciurczak, E.W. Eds., Dekker Inc., NewYork, NY, 383-431.
- Sinelli, N., Spinardi, A., Di Egidio, V., Mignani, I., Casiraghi, E. (2008). Evaluation of quality and nutraceutical content of blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.) by near and mid-infrared spectroscopy, *Postharv. Biol. Tech.* 50, 31-36.
- Soh, A. C., Frakes, R.V., Chilcote, D.O., Sleper, D.A. (1984). Genetic Variation in Acid Detergent Fiber, Neutral Detergent Fiber, Hemicellulose, Crude Protein, and Their Relationship with In Vitro Dry Matter Digestibility in Tall Fescue. *Crop Sci.* 24, 721-727.
- Traka, M. and Mithen, R. (2009). Glucosinolates, isothiocyanates and human health. *Phytochem Rev.* 8, 269-282.
- Türk, M., Albayrak, S., Balabanli, C., Yüksel, O. (2009). Effects of fertilization on root and leaf yields and quality of forage turnip (*Brassica rapa* L.). *J Food Agri Environ.* 7(34), 339-342.
- Van Soest, P.J., Robertson, J.B. (1985). In *Analysis of forages and fibrous foods*. Cornell University Publication: Ithaca, New York, pp 165.
- Van Soest, P.J., Wine, R.H. (1967). Use of Detergents in the Analysis of Fibrous Feed. IV. The Determination of Plant Cell Wall Constituents. *J Assoc Off Anal Chem.* 50, 55.
- Williams, P.C. (2001). Implementation of Near-Infrared technology. In Near infrared technology in the agricultural, food industries. Williams, P.C., Norris, K.H. Eds, American Association of Cereal Chemist: St. Paul, Minnesota, USA, pp 145-169.
- Williams, P.C., Sobering, D.C. (1996). How do we do it: a brief summary of the methods we use in developing near infrared calibrations. In Near Infrared Spectroscopy: The Future Waves. Davies, A.M.C., Williams, P.C., Eds., NIR Publications: Chichester, U.K., pp 185-188.
- Wittkop, B., Snowdon, R., Friedt, W. (2012). New NIRS Calibrations for Fiber Fractions Reveal Broad Genetic Variation in *Brassica napus* Seed Quality. *J Agric Food Chem.* 60, 2248-2256.



CAPÍTULO VIII

Efectos quimiopreventivos en *Brassica rapa*

Artículo en preparación

Obregón-Cano, S. y De Haro-Bailón, A.

Capítulo VIII

Efectos quimiopreventivos en *Brassica rapa*

Obregón-Cano, S.^a y De Haro-Bailón, A.^a

^a Departamento de Mejora Genética, Instituto de Agricultura Sostenible (CSIC), Alameda del Obispo s/n, C.P. 14004. Córdoba, España

Resumen

La quimiopreención es considerada como uno de los enfoques más prometedores y realistas en la prevención del cáncer humano. En los últimos años, numerosas investigaciones estudian los efectos de los glucosinolatos y productos de degradación en múltiples etapas del desarrollo del cáncer y demuestran que estos compuestos son candidatos muy prometedores en la quimiopreención del cáncer. Tres muestras de partes comestibles de *Brassica rapa* (nabizas) fueron seleccionadas en cuanto a su contenido de glucosinolatos (alto, medio y bajo) para la evaluación de la citotoxicidad. La actividad citotóxica de los tratamientos se midió como la inhibición de crecimiento o disminución de la viabilidad de la línea celular de leucemia promielocítica HL-60 humana. Todas las plantas de *B. rapa* ensayadas demostraron efectos tóxicos sobre la proliferación y la viabilidad de las células HL-60. La gluconapina (GNA), el glucosinolato mayoritario, fue el componente simple activo utilizado en el estudio. La GNA intacta no provocó el efecto inhibitorio en el cultivo celular, sin embargo, los productos de degradación de la hidrólisis de GNA demostraron tener efectos quimiopreventivos y ser compuestos bastante prometedores en la lucha contra el cáncer.

Palabras clave: HL-60, *Brassica rapa*, citotoxicidad, glucosinolatos, compuestos bioactivos.

Introducción

Debido a sus beneficios nutricionales, las frutas y verduras tienen un papel importante en una dieta humana sana, y su consumo regular está recomendado por las autoridades competentes en materia de salud y nutrición, tanto a nivel nacional como internacional. Estudios epidemiológicos y clínicos han demostrado que las verduras de la familia de las crucíferas pueden reducir el riesgo de desarrollar cáncer, concretamente, un mayor

consumo de éstas verduras pueden reducir el riesgo de padecer cáncer de pulmón, colorrectal, de mama y de próstata (Willett, 2000; Feskanich et al., 2000; Voorrips et al., 2000; Zhao et al., 2001; Gupta et al., 2014). En este sentido, los consumidores no sólo aprecian estas verduras por su valor nutricional, sino también por su contenido en compuestos que producen beneficios para la salud humana.

Entre los precursores de compuestos bioactivos más relevantes del género *Brassica* están los glucosinolatos, carotenoides, tocoferoles y flavonoides (Kim et al., 2010). Cuando el tejido de plantas del género *Brassica* se ve perturbado por el corte o la masticación, un grupo específico de enzimas, de la familia de las mirosinasas, entra en contacto con los glucosinolatos, se produce la hidrólisis y se originan productos de degradación de los glucosinolatos tales como isotiocianatos, nitrilos y epitionitrilos. Sin embargo, las verduras de *Brassica* se hierven previamente a su consumo, proceso que inactiva la acción de estas enzimas. En este caso, la microflora intestinal humana es capaz de metabolizar los glucosinolatos y dar lugar a compuestos bioactivos ampliamente caracterizados como los isotiocianatos y nitrilos (Fahey et al., 2012; Luang et al., 2014; Saha et al., 2012).

Se ha encontrado un efecto quimiopreventivo de especies de *Brassica* en ciertos tipos de tumores, por el cese del crecimiento del cultivo tumoral debido principalmente a esos isotiocianatos (Hwang et al., 2006; Juge et al., 2007; Singh et al., 2009; Keum et al., 2009; Traka et al., 2010; Jie et al., 2014; Øverby et al., 2015; Lozano-Baena et al., 2015). Se han propuesto diferentes mecanismos para explicar esta actividad anticarcinogénica de los glucosinolatos, estableciendo todos una relación entre los productos resultado de su hidrólisis con el aumento de la actividad de enzimas responsables de la detoxificación xenobiótica (Fases I y II), así como con la estimulación de la apoptosis de células tumorales humanas (Mithen, 2001). Por ejemplo, se ha comprobado que el sulforafano y otros isotiocianatos, presentes en las hojas de rúcula y en otras especies crucíferas, son capaces de inducir la detención del ciclo celular y la muerte en líneas celulares humanas de cáncer como el de próstata (Hayes et al., 2008; Singh et al., 2004), el de vejiga (UM-UC-3) (Abbaoui et al., 2012.) y en células de leucemia (HL-60) (Xu et al., 2000). Otros estudios han demostrado los efectos anti-cancerígenos del extracto del wasabi (un condimento japonés popular y ampliamente consumido, obtenido de la brasicácea *Wasabia japonica*) en células Hep3B de cáncer de hígado (Wu et al., 2015). Recientemente, estudios *in vivo* e *in vitro*

han demostrado el efecto protector en el ADN y quimiopreventivo de las partes verdes consumibles (hojas y peciolo) de la especie *B. carinata*, siendo los productos derivados de la hidrólisis de la sinigrina (el glucosinolato mayoritario presente en esta especie), los responsables del efecto beneficioso para la salud (Lozano-Baena et al., 2015). Estas investigaciones se han centrado en la actividad anti-carcinogénica de los glucosinolatos e isotiocianatos como los compuestos responsables tras su ingesta, y presentan resultados variables dependiendo de la especie de crucífera de la que se trate y del contenido de glucosinolatos que la caracteriza.

Brassica rapa L., comúnmente conocida como nabo, es uno de los cultivos más antiguos domesticados por el hombre hace miles de años (Gómez-Campo, 1980). Tiene un gran valor económico por sus muy diversas subespecies cultivadas que se comercializan por sus hojas verdes, tallos, raíces y producción de aceite en Corea, China, Japón, India, Canadá y Europa. En el noroeste de España y Portugal, *B. rapa* incluye dos productos principales de vegetales que se comercializan: las nabizas (hojas jóvenes) y los grelos (tallos florales previos a la floración), que son comúnmente consumidos como verdura hervida en sopas y guisos. Estas verduras se caracterizan por un peculiar sabor amargo y picante, relacionado con su contenido en glucosinolatos y sus productos de hidrólisis (Cartea et al., 2012).

La gluconapina (GNA) es el glucosinolato mayoritario presente tanto en nabizas como en grelos de *B. rapa*. Recientemente se ha demostrado el poder quimiopreventivo de los isotiocianatos derivados de la GNA, obtenido por síntesis, capaz de producir la muerte celular inducida en la línea MCL-5 principalmente a través de la necrosis de células tumorales (Kadir et al., 2015). Sin embargo, en la especie *B. rapa* no hay estudios previos que demuestren su actividad *in vitro* en base a la presencia o ausencia de los productos de hidrólisis (isotiocianatos) y de sus glucosinolatos precursores. Por ello, el objetivo de este trabajo ha sido el estudio de la capacidad antiproliferativa (en células cancerosas de leucemia) de nabizas en función de la concentración en glucosinolatos presente en estas verduras y de los productos de hidrólisis derivados de estos glucosinolatos. En el presente estudio se ha elegido la línea celular humana HL-60 como modelo *in vitro* para los ensayos de citotoxicidad con el fin de determinar la actividad tumoricida de *B. rapa*.

Material y Métodos

Material vegetal

Se seleccionaron 3 muestras de nabizas de *Brassica rapa*, en función del contenido de su glucosinolato mayoritario, gluconapina (GNA):

- *B. rapa* con Alto contenido en GNA (BRGNA-A)
- *B. rapa* con Medio contenido en GNA (BRGNA-M)
- *B. rapa* con Bajo contenido en GNA (BRGNA-B).

Las muestras fueron seleccionadas del conjunto obtenido en el cultivo de *Brassica rapa* en Córdoba durante las temporadas 2009-2010, 2010-2011 y 2011-2012 (ver Capítulo III). Los resultados de la evaluación de todo el material vegetal respecto al contenido de glucosinolatos se encuentran recogidos en el Anexo I.

Ensayos in vitro

La línea celular HL-60 (células promielocíticas humanas) utilizada en este trabajo, fue suministrada por la Dra. Ángeles Alonso del Departamento de Genética de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Córdoba.

El medio de cultivo utilizado para el mantenimiento de las células fue el RPMI-1640 sin L-Glutamina (Cat. n°: BE12-167F, Cambrex Bio Science Verviers) suplementado con L-Glutamina (G7513, Sigma), Suero Fetal Bovino (Cat. n° S01805, Linus) y una mezcla comercial de antibióticos (Penicilina/Estreptomicina/Anfotericina, A5955, Antimycotic solution 100x stabilised, Sigma).

Las células fueron mantenidas en un incubador de CO₂, en botellas estériles de 40 ml y 25 cm² de superficie con 10 ml de medio líquido RPMI-1640 a 37 °C y una atmósfera del 5% de CO₂ en oscuridad. Los cultivos en fase de crecimiento exponencial fueron refrescados cada 48 h, iniciando un nuevo cultivo con una concentración de 250.000 células/ml en 10 ml de medio fresco RPMI previamente calentado a 37 °C.

La actividad citotóxica de los tratamientos se midió como la inhibición de crecimiento o disminución de la viabilidad de la línea celular de leucemia promielocítica HL-60 humana.

Para los ensayos se partió de un cultivo con 250.000 células/ml y se dejó crecer en suspensión 48 h hasta que alcanzó aproximadamente el millón de células/ml. El

tratamiento se realizó en placas estériles no adherentes. En cada pocillo se colocaron concentraciones crecientes de cada muestra reservando un pocillo para el control negativo en el que sólo se incluyó medio RPMI con las células. El volumen final de cada pocillo fue de 200 μ l, iniciando estos cultivos de tratamiento con 100.000 células/ml del cultivo crecido durante 48 h, y completando el resto de volumen con la solución del compuesto correspondiente o bien del medio RPMI del control negativo.

Los ensayos se clasificaron en:

1. Análisis del efecto citotóxico de nabizas: Se preparó una solución madre de la muestra liofilizada de cada una de las tres muestras de *B. rapa* en medio RPMI (previamente calentado a 37°C). Una vez bien disuelto, se esterilizó por filtrado (Millipore “non-pyrogenic”, “sterile-R” de 0.20 μ m) pasándolo a un bote estéril nuevo.

A partir de esta solución madre se realizaron las demás diluciones. Las concentraciones seleccionadas para los ensayos fueron: (0,125, 0,25, 0,5, 1 y 2 mg/ml).

2. Análisis del efecto citotóxico del glucosinolato mayoritario de la planta (GNA), es el posible responsable de la actividad anticarcinogénica de la *B. rapa* y se prepararon concentraciones decrecientes con GNA comercial (PhytoPlan®). A partir de la mayor concentración de este glucosinolato encontrada en muestras de nabizas se realizó una serie decreciente en concentración de GNA, equiparables también a concentraciones menores encontradas en otras muestras de *B. rapa*.

GNA (54,12 μ moles/planta de BRGNA-A): 0,00005412 moles
(correspondencia: 1mol GNA=429,5 g)

Las concentraciones seleccionadas de GNA fueron: (0,046, 0,023, 0,011, 0,005 y 0,0028 mg/ml)

3. Análisis del efecto citotóxico de los productos derivados de la hidrólisis de la GNA: Se analizó el producto de la hidrólisis enzimática de la GNA para estudiar su efecto sobre el cultivo. Para ello, se añadió a la solución madre de GNA, la enzima mirosinasa (CASnumber 9025-38-1, Sigma) (2 mg/ ml) se homogeneizó por agitación y se incubó durante 30 minutos a 30 °C según el método

modificado de Zhu y Loft (2003), para activar la enzima y producir la hidrólisis de GNA. Se preparó una solución de control de enzima (sin GNA) que contiene sólo medio RPMI con mirosinasa y se utilizó en las mismas condiciones con el fin de verificar que la enzima no afecta a las células.

Las concentraciones seleccionadas de GNA+mirosinasa fueron: (0,046, 0,023, 0,011, 0,005 y 0,0028 mg/ml).

Ensayo de viabilidad celular

La viabilidad celular se determinó mediante la prueba de exclusión del colorante azul de tripán (Sigma-Aldrich). Los ensayos se incubaron durante 3 días. Se contaron las células mediante la adición de una alícuota de 10 µl de cultivo a 10 µl de la solución de colorante azul de tripán cada 24h en un microscopio invertido (AE30/31, Motic España S.L.U., Barcelona, España) utilizando una cámara de Neubauer. Las células no viables se tiñeron de púrpura-violeta, mientras que las células viables permanecieron sin teñir.

Los datos obtenidos en el recuento celular se clasificaron en tres grupos: n° de células viables, no viables y totales durante los tres días del experimento. Los resultados se presentaron en **Curvas de Crecimiento Exponencial**, que representan la media de las tres repeticiones contabilizadas cada 24 horas, durante 3 días.

Para la obtención de las **Curvas de Inhibición de Crecimiento Tumoral** se realizó el cálculo de la Viabilidad Relativa del cultivo: las células vivas contabilizadas a las 72 h del tratamiento referidas a las células vivas contabilizadas en el control. Se calculó el error típico de la media de las tres repeticiones de cada experimento para cada concentración y se obtuvo la curva a las distintas concentraciones ensayadas de cada compuesto.

Resultados y Discusión

Contenido en glucosinolatos de nabizas.

El contenido en glucosinolatos de las tres nabizas seleccionadas se presenta en la Tabla 1.

Tabla 1. Contenido de glucosinolatos en muestras de nabizas.

Identificación	Glucosinolatos ($\mu\text{moles/g}$ materia seca)							
	total	PRO ^a	GNA ^b	GBN ^c	GBS ^d	GST ^e	NGBS ^f	otros
BRGNA-A	60,88	0,72	54,12	2,21	0,92	1,82	0,28	0,71
BRGNA-M	25,45	3,06	19,35	0,72	0,31	1,12	0,16	0,68
BRGNA-B	8,58	0,90	6,07	0,43	0,19	0,46	0,19	0,35

^a Progoitrina, ^b Gluconapina, ^c Glucobrasicanapina, ^d Glucobrasicina, ^e Gluconasturtina, ^f Neoglucobrasicina.

El contenido de glucosinolatos totales en *B. rapa* se debe mayoritariamente al contenido en GNA, sin embargo, también se detectaron otros glucosinolatos típicos de la especie como son progoitrina, glucobrasicanapina, glucobrasicina, gluconasturtina y neoglucobrasicina, a muy baja concentración.

Ensayos in vitro

Cada experimento fue estudiado en función de un control de referencia, partiendo de una concentración inicial de 100.000 células / ml. Los cultivos control crecieron, como se esperaba, de manera exponencial hasta un máximo de 1,2 a 2 millones de células por mililitro. Para cada compuesto analizado se observó un efecto determinado, presentando una curva de crecimiento exponencial de las células viables característica para cada compuesto. En las Figuras 1, 2, 3, 4 y 5 se representan las curvas de crecimiento celular de cada sustancia ensayada.

En la Figura 1 se muestran los resultados de *Brassica rapa* con alta concentración de GNA (54,12 $\mu\text{moles/g}$ de materia seca) observándose un claro efecto dosis/respuesta: a mayor concentración ensayada, menor densidad celular, llegando a inhibir completamente el crecimiento a las mayores concentraciones ensayadas (2 y 1 mg/ml). Además, la siguiente concentración ensayada (0,5 mg/ml) fue capaz de inhibir el crecimiento dejando a menos de la mitad el número de células viables con respecto al control. Esta actividad anticarcinogénica de la planta puede deberse a su alta concentración en GNA. Por ello, con el fin de evaluar el efecto de diferentes concentraciones del glucosinolato en verduras de *B. rapa*, fueron evaluadas otras muestras con concentraciones de GNA más bajas.

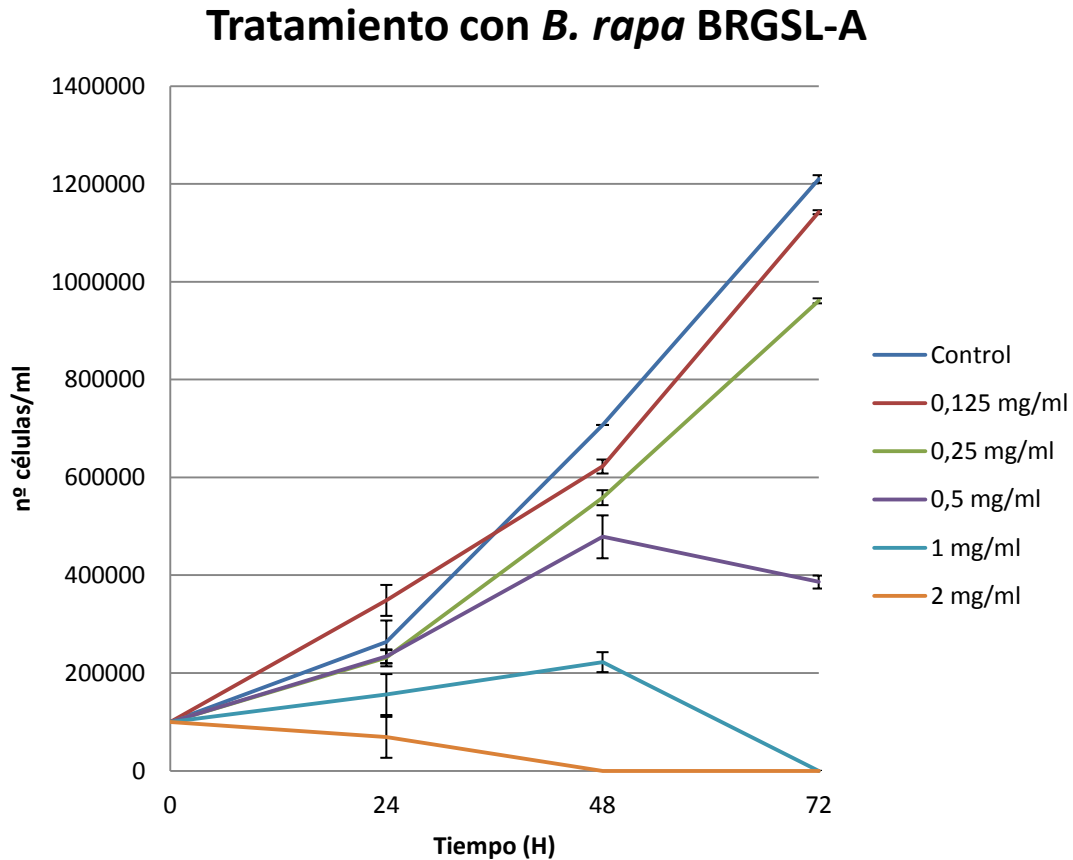


Figura 1. Curva de crecimiento en células viables del tratamiento con *B. rapa* con alta concentración en GNA. Las barras de error representan el error típico de los tres experimentos independientes.

En la Figura 2 se muestran las curvas de crecimiento celular resultantes tras el tratamiento con *B. rapa* de concentración media de GNA (19,35 μ moles/g de materia seca). El comportamiento en el crecimiento celular es muy similar a BRGNA-A; en las concentraciones 2, 1 y 0,5 mg/ml se observa el efecto inhibitorio en el crecimiento celular y los resultados no difieren de la Figura 1, donde la concentración de GNA de la *B. rapa* ensayada es más alta.

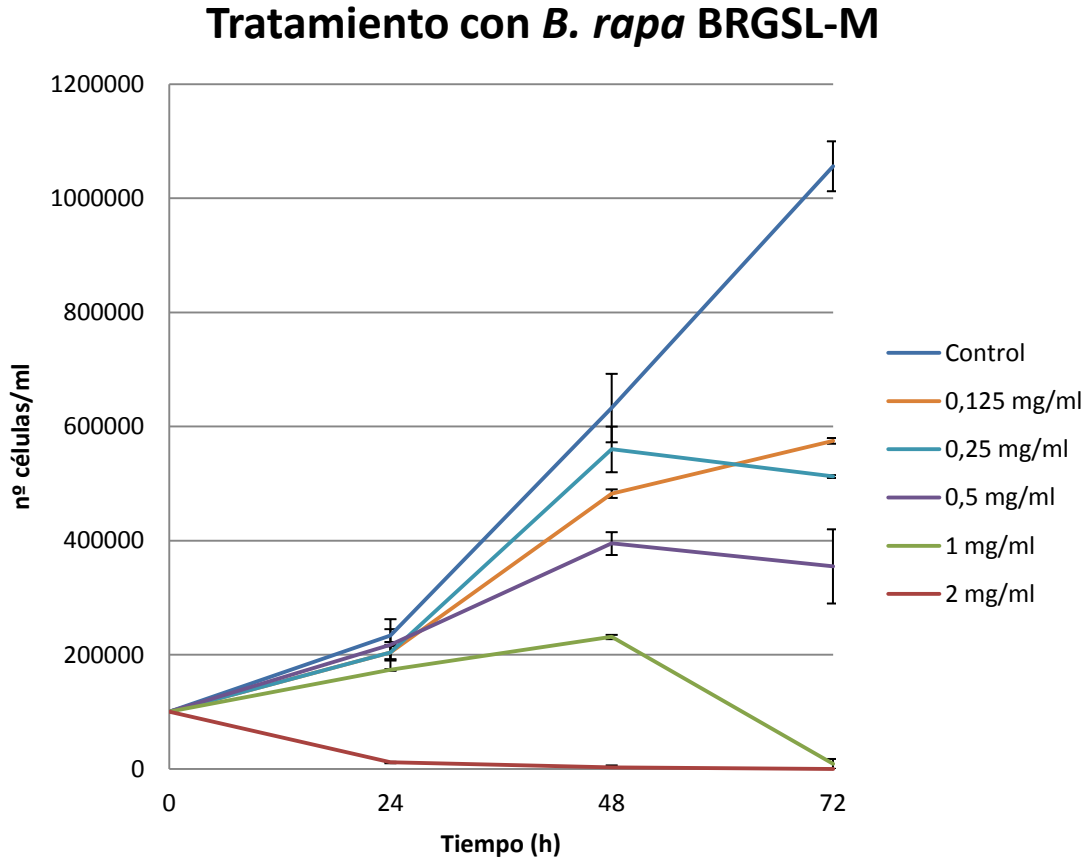


Figura 2. Curva de crecimiento en células viables del tratamiento con *B. rapa* con media concentración en GNA. Las barras de error representan el error típico de los tres experimentos independientes.

En la Figura 3 el tratamiento fue con *B. rapa* baja en GNA (6,07 μ moles/g de materia seca), se pudo comprobar un efecto inhibitorio del crecimiento menor que en *B. rapa* de mayores concentraciones de GNA. En la dosis de 1 mg/ml se inhibió el crecimiento pero sin llegar a la totalidad, con un crecimiento de menos del 25% respecto del control, sin embargo la dosis de 2 mg/ml mantuvo el efecto de inhibición total del crecimiento celular, igual que las otras nabizas.

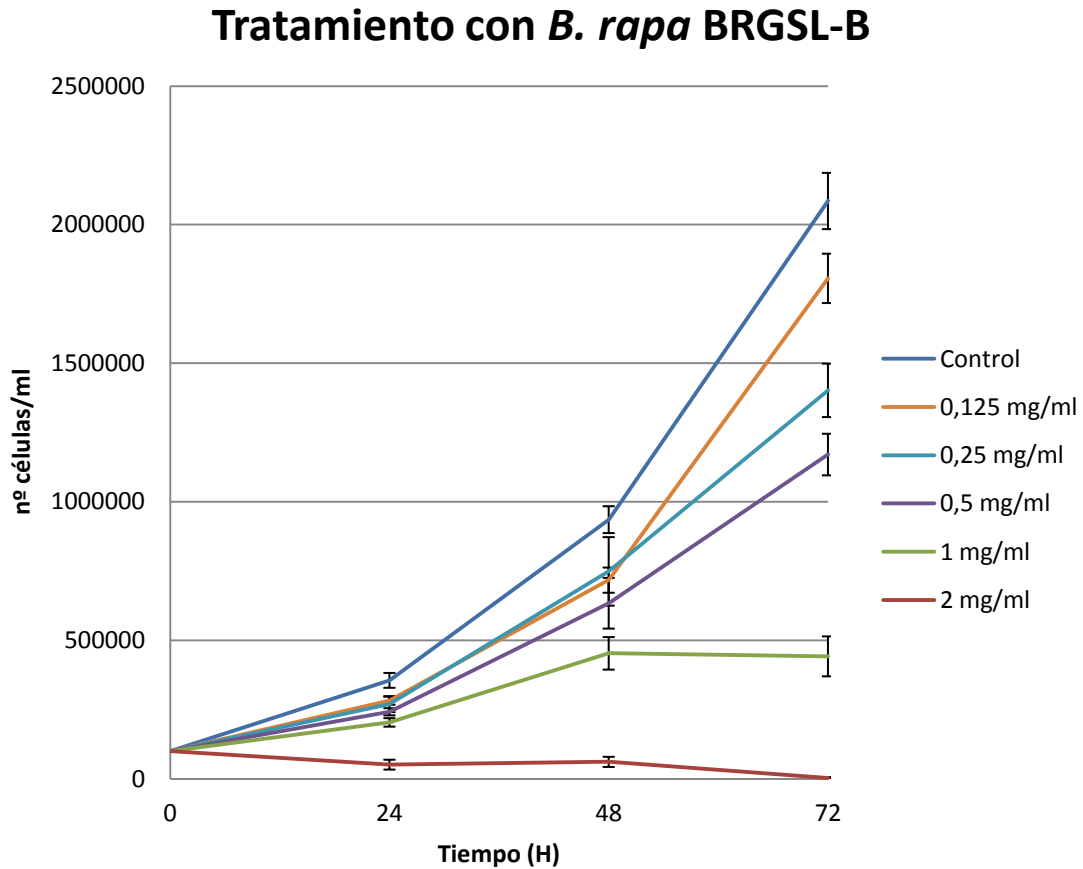


Figura 3. Curva de crecimiento en células viables del tratamiento con *B. rapa* baja concentración en GNA. Las barras de error representan el error típico de los tres experimentos independientes.

La observación preliminar de los ensayos puso de manifiesto la actividad anticarcinogénica de *B. rapa* en relación con la concentración de glucosinolatos. Así, la sustancia bioactiva presente en las nabizas capaz de inducir la inhibición del crecimiento tumoral podría ser la GNA. En este sentido se llevó a cabo el ensayo de HL-60 tratadas con GNA comercial, como posible principio activo responsable de la actividad anticarcinogénica de *B. rapa*.

Tratamiento con GNA

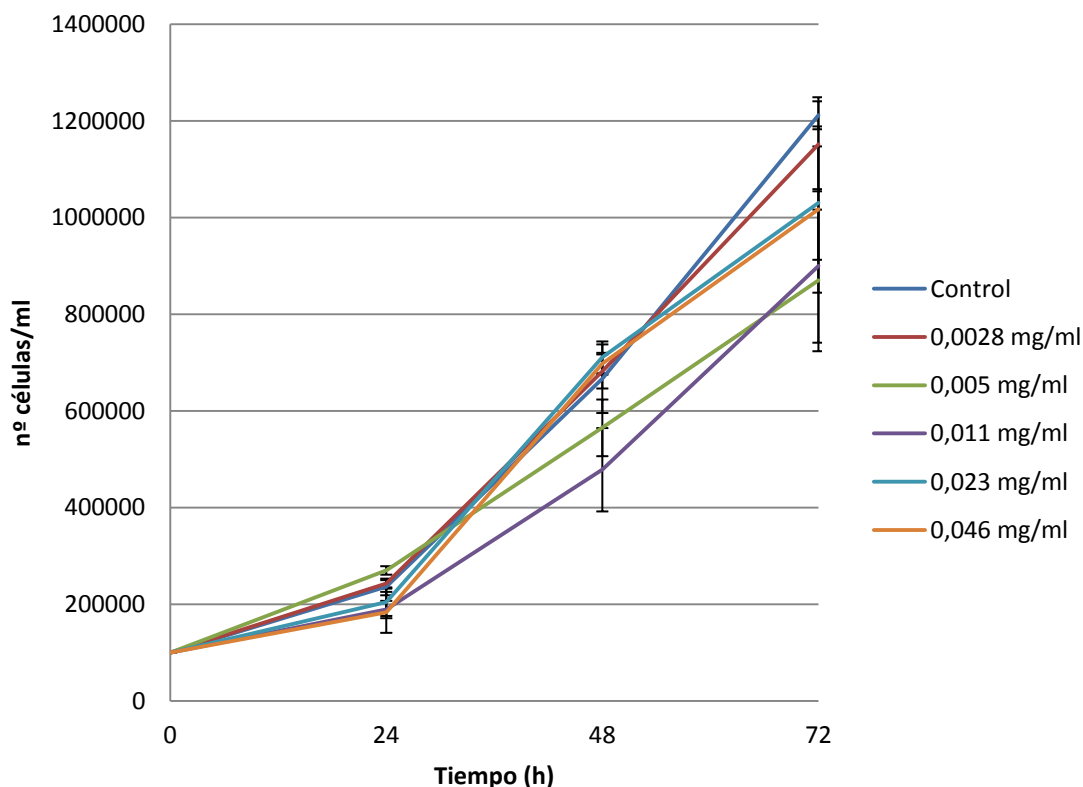


Figura 4. Curva de crecimiento en células viables del tratamiento con GNA. Las barras de error representan el error típico de los tres experimentos independientes.

En la Figura 4 se observa el efecto del tratamiento con GNA comercial. Las dosis ensayadas, equivalentes a las que presentan las muestras de nabizas ensayadas, no producen ningún efecto en el crecimiento del cultivo celular. Mediante este ensayo se pudo comprobar que la GNA no tiene efecto sobre el crecimiento de la línea celular HL-60, por lo que no es el directo responsable del efecto citotóxico observado en los ensayos anteriores con *Brassica rapa*. Estos resultados, en cuanto a la falta de actividad de los glucosinolatos sobre el crecimiento del cultivo de HL-60, también se han demostrado en estudios con otros glucosinolatos como la sinigrina (Lozano-Baena et al., 2015). En ellos, se relacionó el poder anticancerígeno de los glucosinolatos con los productos resultantes de su hidrólisis por la acción de la enzima mirosinasa, no por la actividad del glucosinolato en sí mismo que simplemente actuaría como precursor. En este sentido, en condiciones naturales, los glucosinolatos y mirosinasas se almacenan en compartimentos separados en los tejidos vegetales. Diferentes procesos, como la manipulación o la digestión del alimento, pueden poner en contacto a glucosinolatos y

enzimas y producirse la hidrólisis de glucosinolatos, formándose subproductos biológicamente activos (isotiocianatos, principalmente). Para intentar reproducir el proceso de digestión e hidrólisis de los glucosinolatos y poner en contacto esos compuestos bioactivos con las células tumorales, se llevó a cabo el ensayo de células HL-60 tratadas con los productos de la hidrólisis de GNA por dicha enzima. En la figura 5 se muestran los resultados del tratamiento con diferentes concentraciones de la solución de hidrólisis de la GNA tras ser tratada con mirosinasa.

Crecimiento Celular GNA+Mirosinasa

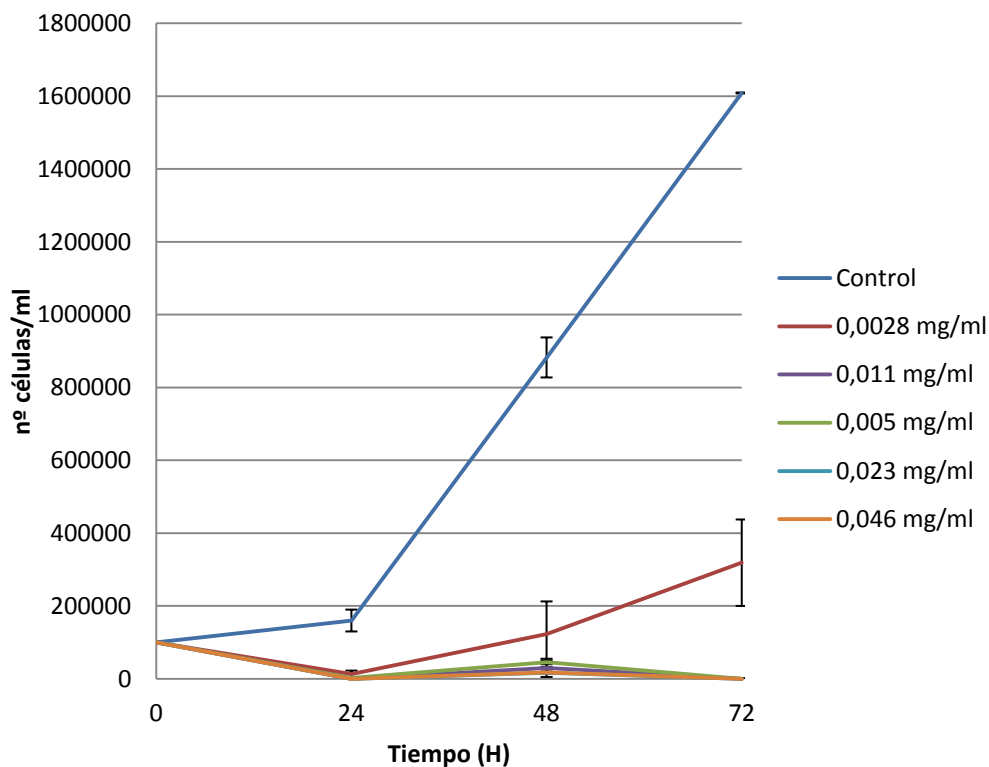


Figura 5. Curva de crecimiento en células viables del tratamiento con GNA + Mirosinasa. Las barras de error representan el error típico de los tres experimentos independientes.

En este ensayo, la acción de la enzima induce la actividad antiproliferativa de la GNA en el cultivo celular. La hidrólisis de GNA por la mirosinasa origina los productos de degradación responsables de la actividad inhibitoria del crecimiento tumoral, incluso con un efecto mayor al observado en el tratamiento de *B. rapa* alta en GNA. A la dosis más baja de concentración se obtuvo una disminución del crecimiento celular de más del 50% respecto al control. Además, se comprobó con el control que las enzimas no afectan al crecimiento celular. Así mismo se demostró que las células HL-60 carecen de

la capacidad de hidrolizar la GNA, como mostraba el ensayo anterior (Figura 4), ya que al no haber productos de hidrólisis, el crecimiento celular fue normal y semejante al del control en todo el intervalo de concentraciones ensayado.

Un factor fundamental en el ensayo fue la temperatura. La mirosinasa es una enzima dependiente de la temperatura, su óptimo de acción es a 30 °C y la incubación previa al ensayo, del complejo GNA+Mirosinasa, a 30 °C fue fundamental para garantizar la total hidrólisis de la GNA y poner de manifiesto la acción de sus productos de degradación sobre el cultivo (Ludikhuyze et al., 2000).

Otro hecho importante que se deduce de los ensayos con *B. rapa* (Figura 1, 2 y 3) es que las plantas liofilizadas no tienen alterada la mirosinasa endógena y los glucosinolatos presentes en el liofilizado fueron hidrolizados a sus productos bioactivos. Esto nos conduce indirectamente a una nueva conclusión, no menos importante que las propiedades saludables de estas verduras, y es que la liofilización es un tipo de procesamiento de alimentos que conserva las propiedades beneficiosas que tienen estas verduras. Por ello, puede ser recomendado como método de procesamiento de estos alimentos y diversificar las formas de conservación/comercialización del producto.

Resultados de las curvas de inhibición del crecimiento celular de las sustancias ensayadas

Las Curvas de Crecimiento Tumoral se obtuvieron representando el porcentaje de supervivencia del cultivo a cada concentración ensayada a las 72 horas en base a la media de tres ensayos independientes. Este porcentaje se calculó considerando un 100% de supervivencia respecto del crecimiento del control. También se determinó el error típico (representado en las barras de error) de los tres experimentos independientes que se realizan para cada una de las sustancias ensayadas (media \pm error estándar). El resultado de la representación gráfica fue una curva dosis respuesta donde se calculó la concentración inhibitoria 50 (CI₅₀), que es la que inhibe a la mitad el crecimiento celular.

Los resultados mostrados en las Figuras 6, 7 y 8, representan la tasa relativa creciente de las células HL-60 con BRGNA-A, BRGNA-M y BRGNA-B respectivamente (expresado como la supervivencia celular). La CI₅₀ en las tres curvas representadas fue de 0,36, 0,293 y 0,585 mg/ml para BRGNA-A, BRGNA-M y BRGNA-B,

respectivamente. *B. rapa* mostró una curva dosis-respuesta con una alta actividad tumoricida en las tres entradas ensayadas.

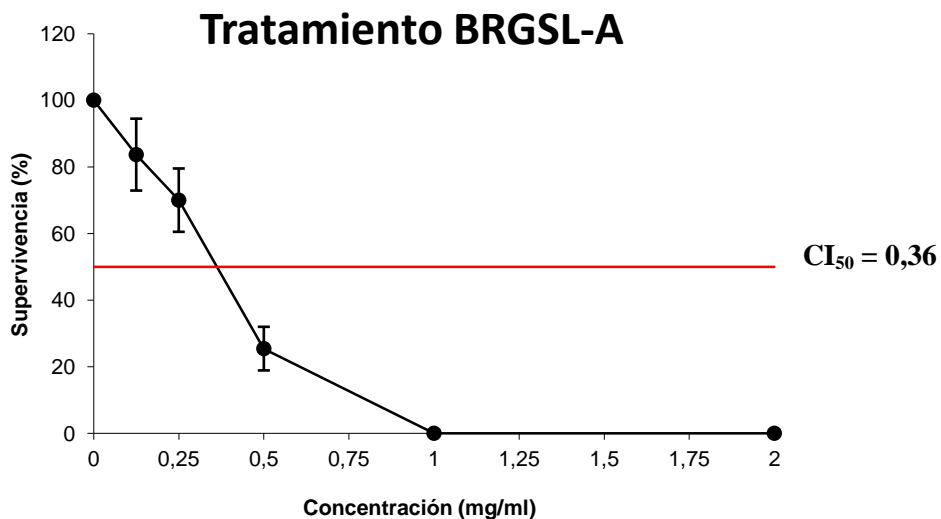


Figura 6. Supervivencia del cultivo HL-60 tratado con *B.rapa* con alta concentración en GNA. Las barras de error representan la desviación estándar de los tres experimentos independientes.

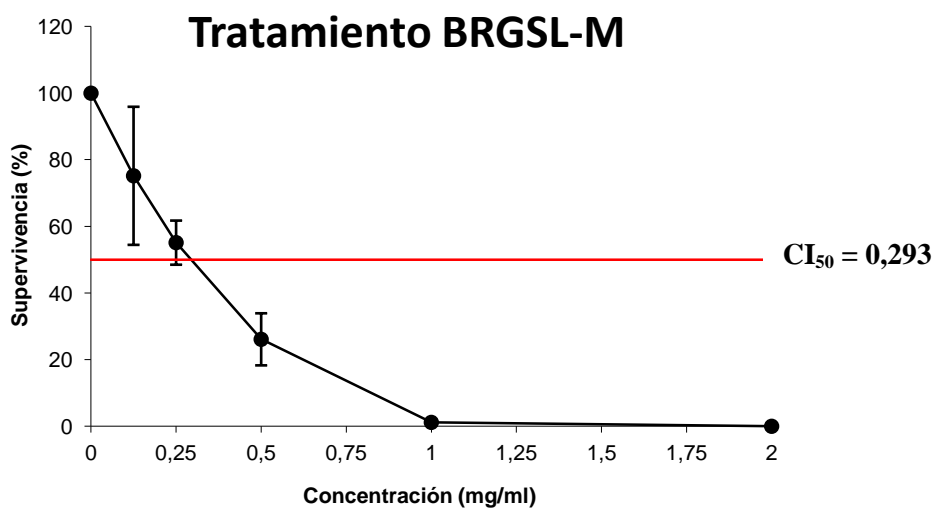


Figura 7. Supervivencia del cultivo HL-60 tratado con *B.rapa* con media concentración en GNA. Las barras de error representan la desviación estándar de los tres experimentos independientes.

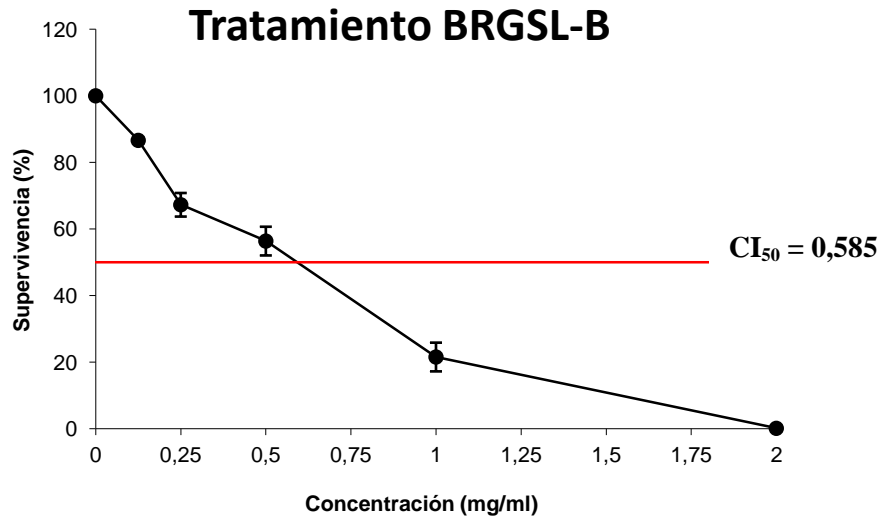


Figura 8. Supervivencia del cultivo HL-60 tratado con *B.rapa* con baja concentración en GNA. Las barras de error representan la desviación estándar de los tres experimentos independientes.

El CI_{50} en el caso de BRGSL-M es muy semejante al obtenido con BRGSL-A, lo que puede indicar que entradas con concentraciones medias en glucosinolatos producen el efecto observado en entradas de concentraciones en glucosinolatos más altas. El efecto global de los tres tratamientos fue que a medida que disminuye la concentración de GNA en *B. rapa*, aumenta el valor de CI_{50} , lo que indica una disminución de la inhibición del crecimiento celular. Estos resultados demostraron la importancia no sólo de la presencia de GNA en la planta, como precursor, para producir el efecto citotóxico, sino también demostró la importancia que tiene su concentración para que su digestión induzca dicho efecto.

En las Figuras 9 y 10 se muestran las curvas de supervivencia del ensayo de GNA y el ensayo del complejo GNA+Mirosinasa. Es notable la representación de la Figura 9 en la que no se llegó a formar la curva de crecimiento tumoral debido a la supervivencia del cultivo a todas las dosis ensayadas, sin causar ningún efecto en el crecimiento celular. La razón de esta falta de citotoxicidad con el glucosinolato intacto reside en el proceso metabólico que se llevó a cabo con el complejo GNA y mirosinasa, mediante el cual el glucosinolato es hidrolizado y sus productos de degradación producen el efecto anticancerígeno. La acción de la mirosinasa en el siguiente ensayo fue fundamental para producir el efecto inhibitorio del cultivo ($CI_{50}=0,0026$ mg/ml). Estas curvas de

supervivencia cuantifican (CI_{50}) y demuestran el efecto inhibitorio en el crecimiento tumoral y quimiopreventivo de *B. rapa*.

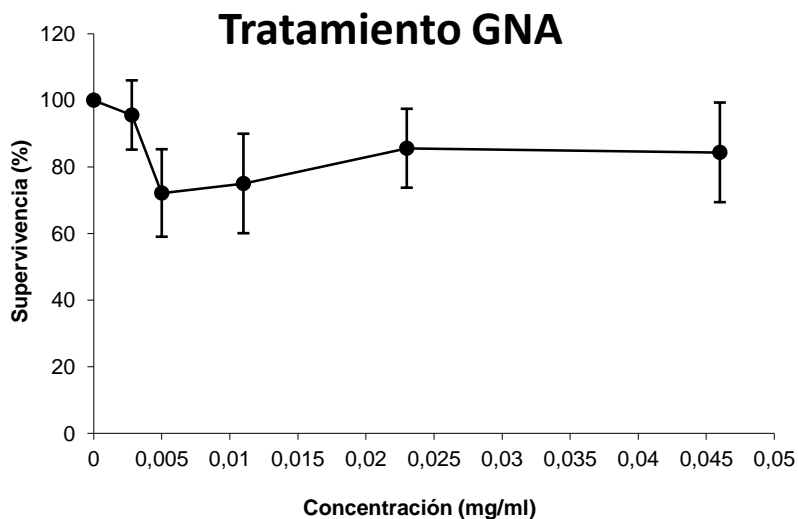


Figura 9. Supervivencia del cultivo HL-60 tratado con GNA. Las barras de error representan la desviación estándar de los tres experimentos independientes.

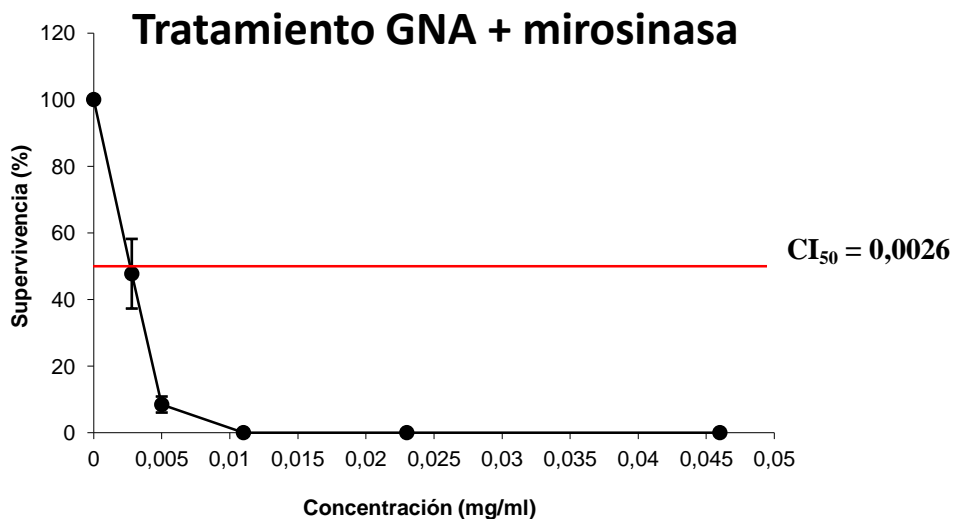


Figura 10. Supervivencia del cultivo HL-60 tratado con GNA+Mirosinasa. Las barras de error representan la desviación estándar de los tres experimentos independientes.

Diversos autores han estudiado otras especies de *Brassica* encontrando el efecto inhibitorio del crecimiento tumoral debido a la hidrólisis de glucosinolatos en otros tipos de células. En este sentido, hay estudios que han evaluado isotiocianatos de síntesis y demostrado que la exposición a 100 μM durante 24 y 48 h del 2-propenil-isotiocianato (derivado de SIN) y 3-butenil-isotiocianato (derivado de GNA) en dos tipos de cultivos celulares humanos producen la inhibición de la proliferación celular y la detención del ciclo celular (Kadir et al., 2015). Esta actividad también se ha demostrado en células de hepatoma murino, inhibiendo el crecimiento celular dependiendo de la dosis de tratamiento (Hwang et al., 2006; Jie et al., 2014). Se ha visto que los isotiocianatos (bencil-isotiocianato, fenetil-isotiocianato, allil-isotiocianato y butil-isotiocianato) producen la interrupción de la formación de los filamentos de microtúbulos inhibiendo el crecimiento en plantas modelo (*Arabidopsis thaliana*) y de células de cáncer de vejiga en rata, con valores de CI_{50} de 3,6, 4,9, 13,2 y 26,1 μM , respectivamente (Øverby et al., 2015). Todas estas investigaciones se han centrado en la actividad anti-carcinogénica de los productos de degradación de glucosinolatos como compuestos responsables del efecto quimiopreventivo y nuestros resultados están en consonancia con todas ellas, ya que hemos demostrado que GNA no es citotóxica, pero sí lo son sus productos de hidrólisis y el intervalo de concentraciones en el que aparece su citotoxicidad.

Conclusiones

Se ha estudiado por primera vez la actividad citotóxica de las nabizas para determinar las propiedades antitumorales de *Brassica rapa* por su contenido en glucosinolatos, mediante la medición de la capacidad inhibidora del crecimiento de células tumorales HL-60.

Se ensayaron muestras de nabizas con diferente concentración de glucosinolatos. La GNA es su glucosinolato mayoritario y se utilizó como componente simple activo en el estudio. Todas las plantas de *B. rapa* ensayadas fueron citotóxicas, en diferente grado, estableciéndose una relación entre dicho efecto y el contenido en glucosinolatos de cada planta, sin embargo el ensayo llevado a cabo con el glucosinolato intacto no provocó efecto inhibitorio en el cultivo celular. La actividad hidrolítica de la enzima mirosinasa sobre la GNA fue la que permitió que los productos de la hidrólisis provocaran el efecto citotóxico incluso en mayor medida que la nabiza con más alta concentración en GNA.

En resumen, en el estudio de las propiedades quimiopreventivas de las verduras de *B. rapa*, hemos explorado la toxicidad celular tanto de las nabizas, como del glucosinolato mayoritario intacto (GNA) y de sus productos de hidrólisis, y hemos confirmado que la toxicidad frente a HL-60 se asocia principalmente con estos productos de degradación resultantes de la actividad de la mirosinasa sobre la GNA. Estos resultados nos permiten destacar los beneficios del uso de esta planta en la quimiopreención del cáncer. Recomendamos así la ingesta de *Brassica rapa* como una verdura nutracéutica y de alto valor añadido para incluir en la dieta humana.

Referencias

- Abbaoui, B., Riedl, K.M., Ralston, R.A., Thomas-Ahner, J.M., Schwartz, S.J., Clinton, S.K. and Mortazavi, A. (2012). Inhibition of bladder cancer by broccoli isothiocyanates sulforaphane and erucin: characterization, metabolism, and interconversion. *Mol Nutr Food Res.* 56(11), 1675-1687.
- Cartea, M.E., De Haro, A., Obregón, S., Soengas, P. and Velasco, P. (2012). Glucosinolate variation in leaves of *Brassica rapa* crops. *Plant Foods Hum. Nutr.* 67, 283-288.
- Fahey, J.W., Wehage, S.L., Holtzclaw, W.D. (2012). Protection of humans by plant glucosinolates: efficiency of conversion of glucosinolates to isothiocyanates by the gastrointestinal microflora. *Cancer Prev Res.* 5(4), 603-611.
- Feskanich, D., Ziegler, R.G., Michaud D.S. (2000). Prospective study of fruit and vegetable consumption and risk of lung cancer among men and women. *J Natl Cancer Inst.* 92(22), 1812-1823.
- Gómez-Campo, C. (1980). Morphology and morpho-taxonomy of the tribe *Brassicaceae*. In *Brassica Crops and Wild Allies: Biology and Breeding*. Tsunoda, S., Hinata, K., Gómez-Campo, C. Eds., Scientific Societies Press, Tokyo, pp 3-31.
- Gupta, P., Kim, B., Kim, S.H., Srivastava, S.K. (2014). Molecular targets of isothiocyanates in cancer: Recent advances. *Mol Nutr Food Res.* 58(8), 1685-1707.
- Hayes, J.D., Kelleher, M.O., Eggleston, I.M., (2008). The cancer chemopreventive actions of phytochemicals derived from glucosinolates. *Eur J Nutr.* 47 (Suppl. 2), 73-88.
- Hwang, E.S. and Lee, H.J. (2006). Induction of quinone reductase by allylisothiocyanate (AITC) and the *N*-acetylcysteine conjugate of AITC in Hepalclc7 mouse hepatoma cells. *BioFactors.* 26, 7-15.
- Jie, M., Cheung, W.M., Yu, V., Zhou, Y., Tong, P.H., Ho, J.W. (2014). Anti-proliferative activities of sinigrin on carcinogen-induced hepatotoxicity in rats. *PLoS ONE*, 9, e110145.
- Juge, N., Mithen, R.F., Traka, M. (2007). Molecular basis of chemoprevention by sulforaphane: a comprehensive review. *Cell Mol Life Sci.* 64, 1105-1127.

- Kadir, N.H., David, R., Rossiter, J.T., Gooderham, N.J. (2015). The selective cytotoxicity of the alkenyl glucosinolate hydrolysis products and their presence in *Brassica* vegetables. *Toxicology*. 334, 59-71.
- Keum, Y.S., Khor, T.O., Lin, W., Shen, G., Kwon, K.H., Barve, A., Li, W., Kong, A.N. (2009). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of broccoli sprouts on the suppression of prostate cancer in transgenic adenocarcinoma of mouse prostate (TRAMP) mice: implication of induction of Nrf2, HO-1 and apoptosis and the suppression of Akt-dependent kinase pathway. *Pharmaceut Res*. 26, 2324-2331.
- Kim, J.K., Chu, S.M., Kim, S.J. Lee, D.J., Lee, S.Y. Lim, S.H., Ha, S.H., Kweon, S.J., Cho, H.S. (2010). Variation of glucosinolates in vegetable crops of *Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*. *Food Chem*. 119, 423-428.
- Lozano-Baena, M.D., Tasset, I., Obregón-Cano, S. De Haro-Bailon, A., Muñoz-Serrano, A. and Alonso-Moraga, A. (2015). Antigenotoxicity and Tumor Growing Inhibition by Leafy *Brassica carinata* and Sinigrin. *Molecules*. 20, 15748-15765.
- Luang-In, V., Narbad, A., Nueno-Palop, C., Mithen, R., Bennett, M., Rossiter, J.T. (2014). The metabolism of methylsulfinylalkyl- and methylthioalkyl-glucosinolates by a selection of human gut bacteria. *Mol Nutr Food Res*. 58(4), 875-883.
- Ludikhuyze, L., Rodrigo, L., Hendrickx, M. (2000). The activity of myrosinase from broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*): Influence of intrinsic and extrinsic factors. *J Food Prot*. 63, 400-403.
- Mithen, R.F. (2001). Glucosinolates and their degradation product. *Adv Bot Res*. 35, 213-262.
- Øverby, A., Bævre, M.S., Thangstad, O.P., Bones, A.M. (2015). Disintegration of microtubules in *Arabidopsis thaliana* and bladder cancer cells by isothiocyanates. *Front. Plant Sci*. 6, 6.
- Saha, S., Hollands, W., Teucher, B. (2012). Isothiocyanate concentrations and interconversion of sulforaphane to erucin in human subjects after consumption of commercial frozen broccoli compared to fresh broccoli. *Mol Nutr Food Res*. 56(12), 1906-1916.
- Singh, A.V., Xiao, D., Lew, K.L., Dhir, R., Singh, S.V. (2004). Sulforaphane induces caspase-mediated apoptosis in cultured PC-3 human prostate cancer cells and retards growth of PC-3 xenografts in vivo. *Carcinogenesis*. 25(1), 83-90.

- Singh, S.V., Warin, R., Xiao, D., Powolny, A.A., Stan, S.D., Arlotti, J.A., Zeng, Y., Hahm, E.R., Marynowski, S.W., Bommareddy, A., Desai, D., Amin, S., Parise, R.A., Beumer, J.H., Chambers, W.H. (2009). Sulforaphane inhibits prostate carcinogenesis and pulmonary metastasis in TRAMP mice in association with increased cytotoxicity of natural killer cells. *Cancer Res.* 69, 2117-2125.
- Traka, M.H., Spinks, C.A., Doleman, J.F., Melchini, A., Ball, R.Y., Mills, R.D., Mithen, R.F. (2010). The dietary isothiocyanate sulforaphane modulates gene expression and alternative gene splicing in a PTEN null preclinical murine model of prostate cancer. *Mol Cancer.* 9,189.
- Voorrips, L.E., Goldbohm, R.A., van Poppel, G., Sturmans, F., Hermus, R.J., van den Brandt, P.A. (2000). Vegetable and fruit consumption and risks of colon and rectal cancer in a prospective cohort study: the Netherlands cohort study on diet and cancer. *Am J Epidemiol.* 152(11), 1081-1092.
- Willett, W.C. (2000). Dieta y cáncer. *Oncologist.* 5(5), 393-404.
- Wu, S.H., Chyau, C.C., Chen, J.H., Tu, S.F., Lin, H.H., Chou, F.P. (2015). Anti-cancerous effects of *Wasabia japonica* extract in Hep3B liver cancer cells via ROS accumulation, DNA damage and p73-mediated apoptosis. *J Funct Foods.* 14, 445-455.
- Xu, K., Thornalley, P.J. (2000). Studies on the mechanism of the inhibition of human leukaemia cell growth by dietary isothiocyanates and their cysteine adducts in vitro. *Biochem Pharmacol.* 60(2), 221-231.
- Zhao, B., Seow, A., Lee, E.J. (2001). Dietary isothiocyanates, glutathione S-transferase -M1, -T1 polymorphisms and lung cancer risk among Chinese women in Singapore cancer epidemiology. *Biomarkers Prev.* 10(10), 1063-1067.
- Zhu, C.Y., Loft, S. (2003). Effect of chemopreventive compounds from *Brassica* vegetables on NAD (P)H: Quinine reductase and induction of DNA strand breaks in murine hepa1c1c7 cells. *Food Chem Toxicol.* 41, 455-462.



Capítulo IX

Conclusiones

Capítulo IX

Conclusiones

Las conclusiones que se derivan de los trabajos de investigación realizados en la presente tesis son las que se exponen a continuación:

Conclusión 1 (Capítulo III)- Se ha demostrado la capacidad del cultivo de *Brassica rapa* de producir nabizas y grelos en el sur de España (Córdoba) y se ha evaluado el contenido de glucosinolatos totales e individuales y el contenido en minerales en los productos cosechados en Córdoba, La Palma y en la zona de cultivo tradicional (Pontevedra).

- En **La Palma** las plantas de *Brassica rapa* dieron cosechas de nabizas y de grelos, siendo la concentración de glucosinolatos en nabizas menor que en grelos, y las concentraciones en la mayoría de los minerales, superiores a las demás localidades. Considerando que estos datos proceden de una sola temporada agrícola solamente pueden considerarse como resultados preliminares sobre las características de cultivo en esta zona.
- En **Córdoba**, se ha establecido que el mes de septiembre es el más adecuado para la obtención de nabizas y grelos de características y calidad nutritiva equiparable a los de Pontevedra. También se ha puesto en evidencia la necesidad de selección de genotipos adecuados para la producción de grelos ya que en esta zona hay entradas que solo forman nabizas. Se encontraron diferencias en la concentración de glucosinolatos en función del desarrollo de la planta y de la fecha de siembra, y se obtuvieron mayores concentraciones de glucosinolatos en plantas bien desarrolladas y sembradas en septiembre. Los contenidos de glucosinolatos en plantas sembradas en Córdoba fueron semejantes al contenido en glucosinolatos de las plantas sembradas en Pontevedra, y en ambas cosechas los concentraciones en nabizas superaron las contenidos en grelos. Las concentraciones en la mayoría de los constituyentes inorgánicos no estuvieron influenciadas por el desarrollo de la planta y fueron semejantes a los valores de las plantas cultivadas en Pontevedra, exceptuando las concentraciones de Zn y K que fueron más bajas.

Conclusión 2 (Capítulo IV)- A partir del estudio de una colección de germoplasma de *Brassica rapa* procedente de la Misión Biológica de Galicia, se realizó una selección del material más adecuado para su cultivo en Córdoba. Se llevó a cabo la caracterización agronómica del cultivo durante dos temporadas (2013/14 y 2014/15) y se evaluaron las nabizas y grelos obtenidos respecto al contenido de glucosinolatos, minerales, fibra y análisis sensorial.

- Hay que destacar que el perfil de glucosinolatos de las entradas cosechadas en Córdoba fue el mismo que el obtenido en las plantas cultivadas en Pontevedra. Las concentraciones de glucosinolatos totales fueron mayores en nabizas que en grelos en todas las entradas, siendo la gluconapina el glucosinolato mayoritario en todas las entradas y precursor de compuestos beneficiosos para la salud. Tanto nabizas como grelos presentaron bajo contenido en progoitrina, un glucosinolato antinutricional cuyos productos de degradación interfieren en la absorción de iodo en animales monogástricos.
- Respecto al contenido inorgánico, no se observaron diferencias en el contenido total entre nabizas y grelos. Destacó la gran variabilidad encontrada en Ca en todas las entradas tanto en nabizas como en grelos. La entrada BRS0504 produjo las nabizas con la concentración más alta en Ca y los grelos de la entrada BRS0498 destacaron por los contenidos más altos en Ca, Mg Cu y Zn.
- Hay una clara diferencia en la concentración de fibra neutro detergente y fibra ácido detergente entre nabizas y grelos, siendo ambas mayor en grelos. Hay diferencias significativas entre las entradas respecto al contenido de fibra en grelos. Destacamos entradas con alta concentración, (BRS0143), otras con concentración intermedia (BRS0498) y otras con baja concentración (BRS0427).

Relacionando la valoración organoléptica de grelos con los datos de composición nutricional, destacamos para el cultivo de *Brassica rapa* en Córdoba las entradas BRS0143, BRS0496 y BRS0498. De estas entradas, se cosecharon los grelos con mejor textura, sabor y nivel medio de amargor, y además destacaron por sus características nutricionales, la BRS0143 por su concentración alta de Ca y fibra, la BRS0496 por su concentración de Ca y nivel medio de fibra y la entrada BRS0498 por su alta concentración en Ca, Mg, Cu y Zn y concentración media de fibra.

Conclusión 3 (Capítulos V, VI y VII)- Se ha estudiado el potencial de la espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS) para el análisis rápido, simultáneo y preciso del contenido en minerales, glucosinolatos y fibra ácido detergente de nabizas y grelos:

- **(Capítulo V)** Se han desarrollado por primera vez ecuaciones de calibración para predecir el contenido mineral en nabizas y grelos. Los resultados obtenidos tanto en la validación cruzada como en la validación externa confirman la fiabilidad y capacidad de la tecnología NIRS para predecir de forma exacta y precisa el contenido de Ca, Fe, K, Na y Mg, a partir de sus espectros NIRS, al mismo tiempo se puede obtener también una estimación aproximada del contenido en Mn, P y Zn.
- **(Capítulo VI)** Se han obtenido por primera vez ecuaciones de calibración para analizar el contenido en glucosinolatos individuales y glucosinolatos totales en nabizas y grelos. Las ecuaciones desarrolladas para glucosinolatos totales y para gluconapina permiten predecir el contenido en estos compuestos con suficiente precisión para fines de selección. Las ecuaciones desarrolladas para glucobrasicanapina y progoitrina son de utilidad para una correcta clasificación de los grupos de muestras en función de su concentración en "altos" y "bajos".
- **(Capítulo VII)** Se han obtenido por primera vez dos ecuaciones de calibración con dos tratamientos matemáticos diferentes, ambos igualmente válidos, que permiten la utilización de NIRS para el análisis rápido y preciso del contenido en fibra ácido detergente en muestras de nabizas y grelos.

El conjunto de ecuaciones de calibración desarrolladas en este trabajos permiten predecir la composición de las nabizas y grelos a partir de sus espectros NIRS, serán una herramienta fundamental en los programas de mejora genética de la calidad de *Brassica rapa* respecto a dichos componentes, así como en los trabajos de control de la calidad nutritiva de los productos cosechados.

Conclusión 4 (Capítulo VIII)- Se han estudiado por primera vez las propiedades antitumorales de muestras de nabizas, de su glucosinato mayoritario (gluconapina) y de los productos de hidrólisis del mismo, mediante la medición de la capacidad inhibidora del crecimiento de células tumorales HL-60. Se ha demostrado que todas las nabizas ensayadas fueron citotóxicas, estableciéndose una relación entre dicho efecto y

el contenido en glucosinolatos de cada muestra. También se ha puesto de manifiesto que el glucosinolato intacto no provocó efecto inhibitorio en el cultivo celular, siendo necesaria la acción de la enzima mirosinasa para que se produzca la inhibición del crecimiento tumoral.



Referencias bibliográficas

Referencias bibliográficas

- Agencia De Defensa De La Competencia De Andalucía (ADCA). (2013). Competencia y Cadena de valor en la producción y distribución hortícola en Andalucía.
- Agerbirk, N. and Olsen, C.E. (2012). Glucosinolate structures in evolution, *Phytochemistry*. 77, 16-45.
- Agricultural Marketing Resource Centre. (2013). www.agmrc.org/commodities_products/grains_oilseeds/rapeseed
- Akao, Y., Maruyama, H., Matsumoto, K., Ohguchi, K., Nishizawa, K., Sakamoto, T., Araki, Y., Mishima, S., Nozawa, Y. (2003). Cell growth inhibitory effect of cinnamic acid derivatives from propolis on human tumor cell lines. *Biol Pharm Bull*. 26, 1057-1059.
- Anderson, J.W., Baird, P., Davis, Jr R.H., Ferreri, S., Knudtson, M., Koraym, A., Waters, V. and Williams, C.L. (2009). Health benefits of dietary fiber. *Nutrition Reviews*. 67(4), 188-205.
- Arias-Carmona, M.D. (2009). Caracterización físico-químico y sensorial de nabiza y grelo (*Brassica rapa* L.). Tesis Doctoral. Universidad de Santiago de Compostela. España.
- Baladrón, J.J. (1991). Taxonomía, distribución y estudio agronómico de los cultivos del género *brassica* en Galicia. Tesis doctoral. Universidad de Santiago de Compostela. España.
- Barbetti, M.J., Li, C.X., Banga, S.S., Banga, S.K., Singh, D., Sandhu, P.S., Singh, R., Liu, S.Y., You, M.P. (2015). New host resistances in *Brassica napus* and *Brassica juncea* from Australia, China and India: Key to managing Sclerotinia stem rot (*Sclerotinia sclerotiorum*) without fungicides. *Crop Prot*. 78, 127-130.
- Base de Datos de *Brassica* (BrGDB): <http://www.plantgdb.org/BrGDB>
- Base de Datos Española de Composición de Alimentos (BEDCA): <http://www.bedca.net/bdpub/index.php>
- Batten, G. (1998). Plant analysis using near infrared reflectance spectroscopy: the potential and limitations. *Aus J Exp Agric*. 38, 697-706.
- Belitz, H.D. y Grosch, W. (2004). Química de los alimentos. Eds. Acribia, S.A. Zaragoza. España.
- Blanco, M., Villaroya, I. (2002). NIR spectroscopy: a rapid-response analytical tool. *Trends Anal Chem*. 21, 40-50.

- Bouzari, A., Holstege D. and Barrett, D. M. (2015). Mineral, fiber, and total phenolic retention in eight fruits and vegetables: a comparison of refrigerated and frozen storage. *J Agric Food Chem.* 63(3), 951-956.
- Breitman, T.R., Selonick, S.E., Collins, S.J. (1980). Induction of differentiation of the human promyelocytic leukemia cell line (hl60) by retinoic acid. *Proc Natl Acad Sci USA.* 77, 2936-2940.
- Burkitt, D.P. (1973). Epidemiology of large bowel disease: the role of fibre. *Proc Nutr Soc.* 32(3), 145-149.
- Cardone M., Mazzoncini M., Menini S., Rocco V., Senatore A., Seggiani M. and Vitolo S. (2003). *Brassica carinata* as an alternative oil crop for the production of biodiesel in Italy: agronomic evaluation, fuel production by transesterification and characterization. *Biomass Bioenerg.* 25, 623-636.
- Carlson, D.G., Daxenbichler, M.E. and Tookey, H.L., (1987). Glucosinolates in turnip tops and roots: cultivars grown for greens and/or roots. *J Amer Hort Soc Sci.* 112, 179-183.
- Černiauskiene, J., Kulaitiene, J., Danilchenko, H., Jariene, E., Juknevičienė E. and Juknevičienė, E. (2014). Pumpkin Fruit Flour as a Source for Food Enrichment in Dietary Fiber. *Not Bot Horti Agrobi.* 1, 1842-4309.
- Chavez, P.F., Sacré, P.Y., De Bleye, C., Netchacovitch, L., Mantanus, J., Motte, H., Schubert, M., Hubert, P., and Ziemons, E. (2015). Active content determination of pharmaceutical tablets using near infrared spectroscopy as process analytical technology tool. *Talanta.* 1(144), 1352-1359.
- Chen, D., Daniel, K.G., Chen, M.S., Kuhn, D.J., Landis-Piwowar, K.R., Ping Dou, Q. (2005). Dietary flavonoids as proteasome inhibitors and apoptosis inducers in human leukemia cells. *Biochem Pharmacol.* 69, 1421-1432.
- Choi, H.S., Cho, M.C., Lee, H.G. and Yoon, D.Y. (2010). Indole-3-carbinol induces apoptosis through p53 and activation of caspase-8 pathway in lung cancer A549 cells. *Food Chem Toxicol.* 48(3), 883-890.
- Collett, M.G., Stegelmeier, B.L., Tapper, B.A. (2014). Could nitrile derivatives of turnip (*Brassica rapa*) glucosinolates be hepato- or cholangiotoxic in cattle?. *J Agric Food Chem.* 62(30), 7370-7375.
- Collins, S.J., Gallo, P.C., Gallagher, R.E. (1977). Continuous growth and differentiation of human promyelocytic leukemia cell line (hl60) in suspension culture. *Nature.* 270, 347-349.

- Collins, S.J., Ruscetti, F.W., Gallagher, R.E., Gallo, R.C. (1978). Terminal differentiation of human promyelocytic leukemia cells induced by dimethyl sulfoxide and other polar compounds. *Proc Natl Acad Sci.* 75, 2458-2462.
- Conte-Anazetti, M., Silva-Melo, P., Duran, N., Haun, M. (2003). Comparative cytotoxicity of dimethylamide- crotonin in the promyelocytic leukemia cell line (HL60) and human peripheral blood mononuclear cells. *Toxicol.* 188, 261-274.
- Costell, E. y Durán, L. (1981). El análisis sensorial en el control de calidad de los alimentos II. Planteamiento y planificación: selección de pruebas. *Rev. Agroquim Tecnol.* 21, 149-165.
- Cozzolino, D. (2009). Near Infrared Spectroscopy in Natural Products Analysis. *Plant Med.* 75, 746-756.
- Cozzolino, D., Cynkar, W., Janik, L-, Dambergs, R.G., Gishen, M. (2006). Analysis of grape and wine by near infrared spectroscopy - a review. *J Near Infrared Spectrosc.* 14, 279-89.
- Cozzolino, D., Fassio, A., y Fernández, E. (2003). Uso de la Espectroscopía de Reflectancia en el Infrarrojo Cercano para el análisis de calidad de ensilaje de maíz. *Agricultura Técnica.* 63(4), 387-393.
- Dayod, M., Tyerman, S.D., Leigh, R.A., Gilliam, M. (2010). Calcium storage in plants and the implications for calcium biofortification. *Protoplasma.* 247, 215-231.
- Delourme, R., Falentin, C., Huteau, V., Clouet, V., Horvais, R., Gandon, B., Specel, S., Hanneton, L., Dheu, J. E., Deschamps, M., Margale, E., Vincourt P. and Renard, M. (2006). Genetic control of oil content in oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Theor Appl Genet.* 113(7), 1331-1345.
- Diario Oficial de la Unión Europea (DOUE). (2009). Reglamento (CE) nº 510/2006 del Consejo «GRELOS DE GALICIA» N° CE: ES-PGI-0005-0469-13.06.2005.
- Dimov, Z., Suprianto, E., Hermann, F., and Möllers, C. (2012). Genetic variation for seed hull and fibre content in a collection of European winter oilseed rape material (*Brassica napus* L.) and development of NIRS calibrations. *Plant Breeding.* 131, 361-368.
- Dixon, G.R., (2007). Vegetable *Brassicac*s and related crucifers. CABI Publishing, Wallingford, UK.
- Du, S., Xu, M. and Yao, J. (2016). Relationship between fibre degradation kinetics and chemical composition of forages and by-products in ruminants. *J Appl Anim Res.* 44(1), 189-193.

- Dwivedi, S.L., Britt, A.B., Tripathi, L., Sharma, S., Upadhyaya H.D. and Ortiz R. (2015). Haploids: Constraints and opportunities in plant breeding. *Biotechnol Adv.* 33(6, Part 1), 812-829.
- Fahey, J.W., Zalcmann, A.T. and Talalay, P. (2001). The chemical diversity and distribution of glucosinolatos and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry.* 56, 5-51.
- Feng, F., Wu, Q. and Zeng, L. (2015). Rapid analysis of diesel fuel properties by Near Infrared Reflectance Spectra, *Spectrochim Acta A.* 149, 271-278.
- Font, R., Del Río, M. and De Haro-Bailón, A. (2006). The use of near-infrared spectroscopy (NIRS) in the study of seed quality components in plant breeding programs. *Ind Crop Prod.* 24, 307-313.
- Font, R., Del Río, M., Cartea, E. and De Haro, A. (2005). Quantification of glucosinolates in leaves of leaf rape (*Brassica napus* ssp. *pabularia*) by near-infrared spectroscopy. *Phytochemistry.* 66(2), 175-185.
- Food and Agriculture Organization of The United Nations (FAOSTAT). <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/S>
- Foster, A.J., Kakani, V.G., Ge, J., and Mosali, J. (2013). Rapid assessment of bioenergy feedstock quality by near infrared reflectance spectroscopy. *Agron J.* 105(6), 1487-1497.
- Francisco, M. (2010). Compuestos bioactivos y producción de grelos y nabizas: variación fenotípica y ambiental. Tesis Doctoral. Universidad de Vigo.
- Francisco, M., Padilla, G., Lema, M., Velasco, P. (2009). El grelo de Galicia. *Horticultura.* 210, 44-49.
- Frontela, C., Ros, G. and Martínez, C. (2011). Phytic acid content and “in vitro” iron, calcium and zinc bioavailability in bakery products: The effect of processing. *J Cereal Sci.* 54(1), 173-179.
- Frossard, E., Bucher, M. Mächler, F. Mozafar, A. and Hurrell, R. (2000). Potential for increasing the content and bioavailability of Fe, Zn and Ca in plants for human nutrition. *J Sci Food Agr.* 80(7), 861-879.
- Gómez-Campo, C. (1980). Morphology and morpho-taxonomy of the tribe *Brassicaceae*. In *Brassica Crops and Wild Allies: Biology and Breeding*. Tsunoda, S., Hinata, K., Gómez-Campo, C. Eds., Scientific Societies Press, Tokyo, pp 3-31.

- Gómez-Campo, C. and Prakash, S. (1999). Origin and domestication. In *Biology of Brassica coenospecies*. Gómez-Campo, C. Eds. Elsevier Science B.V. Amsterdam, Holanda, pp 32-52.
- Gómez-Galera, S., Rojas, E., Sudhakar, D., Zhu, C., Pelacho, A.M., Capell, T. (2010). Critical evaluation of strategies for mineral fortification of staple food crops. *Transgenic Res.* 19, 165-180.
- Guo, Y., Ni, Y., and Kokot, S. (2016). Evaluation of chemical components and properties of the jujube fruit using near infrared spectroscopy and chemometrics. *Spectrochim Acta A.* 153, 79-86.
- Hagen, S.F. Borge, G.I.A., Solhaug, K.A., Bengtsson, G.B. (2009). Effect of cold storage and harvest date on bioactive compounds in curly kale (*Brassica oleracea* L. var. *acephala*). *Postharvest Biol Technol.* 51, 36-42.
- Halkier, B.A. and Gershenzon, J. (2006). Biology and biochemistry of glucosinolates. *Annu Rev Plant Biol.* 57, 303-333.
- Helland, H.S., Leufvén, A., Bengtsson, G.B., Skaret, J., Lea, P., Wold, A.B. (2016). Storage of fresh-cut swede and turnip in modified atmosphere: effects on vitamin C, sugars, glucosinolates and sensory attributes. *Postharvest Biol Technol.* 111, 150-160.
- Hill, R.R., Barnes, R.F. (1977). Genetic Variability for Chemical Composition of Alfalfa. II. Yield and Traits Associated with Digestibility. *Crop Sci.* 17, 948-952.
- Hwang, E.S. and Lee, H.J. (2006). Induction of quinone reductase by allylisothiocyanate (AITC) and the *N*-acetylcysteine conjugate of AITC in Hepa1c1c7 mouse hepatoma cells. *BioFactors.* 26, 7-15.
- Israels, L.G. and Israels, E.D. (1999). Apoptosis. *Stem cells.* 17, 306-313.
- Jahangir, M., Kim, H. K., Choi, Y. H., and Verpoorte, R. (2009). Health-Affecting Compounds in *Brassicaceae*. *Compr Rev Food Sci F.* 8(2), 31-43.
- Jakubikova, J., Bao, Y., Sedlak, J. (2005). Isothiocyanates induce cell cycle arrest, apoptosis and mitochondrial potential depolarization in HL-60 and multidrug-resistant cell lines. *Anticancer Res.* 25, 3375-3386.
- Jeong-Hwan, M., Tae-Jin, Y. Soo-Jin, K. and Beom-Seok, P. (2011). *Brassica rapa* Genome Sequencing Project. In *Genetics, Genomics and Breeding of Vegetable Brassicas*, Science Publishers Eds. pp 304-327.

- Jie, M., Cheung, W.M., Yu, V., Zhou, Y., Tong, P.H., Ho, J.W. (2014). Anti-proliferative activities of sinigrin on carcinogen-induced hepatotoxicity in rats. *PLoS ONE*, 9, e110145.
- Johnson, T.L., Dinkova-Kostova, A.T. and Fahey, J.W. (2016). Glucosinolates from the *Brassica* Vegetables and Their Health Effects. Encyclopedia of Food and Health. B. Caballero, P. M. Finglas and F. Toldrá. Oxford, Academic Press, pp 248-255.
- Jones, G. and Senders, O.G. (2002). A sensory profile of turnip greens as affected by variety and maturity. *J Food Sci.* 67, 3126-3129.
- Juge, N., Mithen, R.F., Traka, M. (2007). Molecular basis of chemoprevention by sulforaphane: a comprehensive review. *Cell Mol Life Sci.* 64, 1105-1127.
- Kadir, N.H., David, R., Rossiter, J.T., Gooderham, N.J. (2015). The selective cytotoxicity of the alkenyl glucosinolate hydrolysis products and their presence in *Brassica* vegetables. *Toxicology.* 334, 59-71.
- Keum, Y.S., Khor, T.O., Lin, W., Shen, G., Kwon, K.H., Barve, A., Li, W., Kong, A.N. (2009). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of broccoli sprouts on the suppression of prostate cancer in transgenic adenocarcinoma of mouse prostate (TRAMP) mice: implication of induction of Nrf2, HO-1 and apoptosis and the suppression of Akt-dependent kinase pathway. *Pharmaceut Res.* 26, 2324-2331.
- Komolka, P., Górecka, D. and Dziejczak, K. (2012). The effect of thermal processing of cruciferous vegetables on their content of dietary fiber and its fractions. *Acta Sci Pol Technol Aliment.* 11(4), 347-354.
- Kopsell, D.E., Kopsell, D.A., Lefsrud, M.G., and Curran-Celentano, J. (2004). Variability in elemental accumulations among leafy *Brassica oleracea* cultivars and selections. *J Plant Nutr.* 27(10), 1813-1826.
- Körbitz, W. (1999). Biodiesel Production in Europe and North America, an Encouraging Prospect, *Renewable Energy*, pp1078-1083.
- Lamy, E., Garcia-Kaufer, M., Pinzhorn, J., Merstch-Sundermann, V. (2012). Antigenotoxic action of isothiocyanate-containing mustard as determined by two cancer biomarkers in a human intervention trial. *Eur J Cancer Prev.* 21(4), 400-406.
- Liu, M.C., Li, Z.G., Deng, W., Wang, G.M., Yang, Y.W. (2009). Changes in volatile compounds of pickled mustard tuber (*Brassica juncea* var. *tsatsai*) during the pickling process. *Int J Food Sci Tech.* 44(11), 2278-2286.

- Lozano-Baena, M.D., Tasset, I., Obregón-Cano, S., De Haro-Bailon, A., Muñoz-Serrano, A. and Alonso-Moraga, A. (2015). Antigenotoxicity and Tumor Growing Inhibition by Leafy *Brassica carinata* and Sinigrin. *Molecules*. 20, 15748-15765.
- Mao, H., Wang, Z. and Lyons, G. (2015). Germination-enhancing and zinc-sparing roles for selenium in broccoli. *Acta Agr Scand*. 65(2), 141-149.
- Martínez, D., Font, R., Gómez, P., Blanco, T., and Del Río, M. (2014). Determining the mineral composition in *Cucurbita pepo* fruit using near infrared reflectance spectroscopy. *J Sci Food Agri*. 94(15), 3171-3180.
- Martínez-Ballesta, M.D.C., Carvajal, M. (2015). Myrosinase in *Brassicaceae*: the most important issue for glucosinolate turnover and food quality. *Phytochem Rev*. 14(6), 1045-1051.
- Mataix Verdú, J. (2005) Nutrición para educadores. Ediciones Díaz de Santos, pp 752.
- Matsui, J., Kiyokawa, N., Takenouchi, H., Taguchi, T., Suzuki, K., Shiozawa, Y., Saito, M., Tang, W., Katagiri, Y.U., Okita, H., Fujimoto, J. (2005). Dietary bioflavonoids induce apoptosis in human leukemia cells. *Leukemia Res*. 29, 573-581.
- McClure, F.W. (2004). 204 years of near infrared technology: 1800 - 2003. *J Near Infrared Spectrosc*. 11, 487-518.
- Mi, L., Wang, X., Govind, S., Hood, B.L., Veenstra, T.D., Conrads, T.P., Saha, D.T., Goldman, R., Chung, F.L. (2007). The role of protein binding in induction of apoptosis by phenethyl isothiocyanate and sulforaphane in human non-small lung cancer cells. *Cancer Res*. 67 (13), 6409-6416.
- Miller, D.D., Welch, R.M., (2013). Food system strategies for preventing micronutrient malnutrition. *Food Policy*. 42, 115-128.
- Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (MAGRAMA) <http://www.magrama.gob.es/es/estadistica/temas/estadisticasagrarias/agricultura/esyrce/>
- Mithen R.F. (2001). Glucosinolates and their degradation product. *Adv Bot Res*. 35, 213-262.
- Mølmann, J.A.B., Steindal, A.L.H., Bengtsson, G.B., Seljåsen, R., Lea, P., Skaret, J., Johansen, T.J. (2014). Effects of temperature and photoperiod on sensory quality and contents of glucosinolates, flavonols and vitamin C in broccoli florets *Food Chem*. 172, 47-55.

- Moreno-Rojas, R. (2000). *Nutrición y Dietética para Tecnólogos de Alimentos*. Díaz de Santos, S.A. Eds. Madrid, España.
- Mougin, A., Mauroux, O., Matthey-Doret, W., Barcos, E.M., Beaud, F., Bousbaine, A., Viton, F., Smarrito-Menozzi, C. (2015). Impact of boiling conditions on the molecular and sensory profile of a vegetable broth. *J Agri Food Chem.* 63(5), 1393-1400.
- Murray, I. (1986). Near Infrared Analysis of Forages. In *Recent advances in animal nutrition. Studies in the agricultural and food sciences*. W. Haresign and D.J.A. Cole Eds. UK: Butterworths, pp 141-156.
- Norris, K.H., Barnes, R.F., Moore, J.E. and Shenk, J.S. (1976). Predicting forage quality by infrared reflectance spectroscopy. *J Anim Sci.* 43, 889-897.
- Osborne, B.G., Fearn, T., Hindle, P.H. (1993). *Practical near infrared spectroscopy with applications in food and beverage analysis*, 2nd edition. Harlow: Longman Scientific and Technical, pp 227.
- Øverby, A., Bævre, M.S., Thangstad, O.P., Bones, A.M. (2015). Disintegration of microtubules in *Arabidopsis thaliana* and bladder cancer cells by isothiocyanates. *Front. Plant Sci.* 6, 6.
- Padilla, G., Cartea, M.E., Velasco, P., De Haro, A. and Ordás, A. (2007). Variation of glucosinolates in vegetable crops of *Brassica rapa*. *Phytochemistry.* 68(4), 536-545.
- Palani, K., Harbaum-Piayda, B., Meske, D., Keppler, J.K., Bockelmann, W., Heller, K.J., Schwarz, K. (2015). Influence of fermentation on glucosinolates and glucobrassicin degradation products in sauerkraut. *Food Chem.* 190, 755-762.
- Periago, M.J., Ros, G., Rincón, F. and Martínez, C. (1997). Nutritional meaning of dietary fibre and phytic acid in meat-based homogenised weaning foods. *Food Res Int.* 30(3-4), 223-230.
- Porep, J.U., Kammerer, D.R. and Carle, R. (2015). On-line application of near infrared (NIR) spectroscopy in food production. *Trends Food Sci Tech.* 46(2, Part A), 211-230.
- Prakash, O. (1961). *Food and drinks in ancient India*. Munshi Ram Manohar Lal. Delhi, pp 165-168.
- Primo, E. (1997). *Química de los Alimentos*. Eds. Síntesis, S.A. Madrid. España.

- Rakow, G. (2004). Species origin and economic importance of *Brassica*. In Biotechnology in Agriculture and Forestry: *Brassica*. Nagata, T., Lörz, H., Widholm, J.M. Eds., Springer, Berlin, Germany.
- Rao, S. and Horn, F. (1995). Cereals and *Brassicac*s for forage. In Forages: An Introduction to Grassland Agriculture. Barnes, R., Miller, D., Nelson, C. Eds., Iowa State University Press, Ames, USA, pp 451-462.
- Roggo, Y., Chalus, P., Maurer, L., Lema-Martinez, C., Edmond, A., Jent, N. (2007). A review of near infrared spectroscopy and chemometrics in pharmaceutical technologies. *J Pharm Biomed Anal.* 44, 683-700.
- Rosa, E.A.S. (1999). Chemical composition. In Biology of *Brassica* coenospecies Gómez-Campo, C. Eds., Elsevier Science B.V., Amsterdam, pp 315-357.
- Sadowski, J. and Kole, C. (2011). Genetics, genomics and breeding of vegetable *Brassicac*s, CRC Press.
- Sancho, J., Bota, E. y de Castro, J.J. (1999). Introducción al análisis sensorial de los alimentos. Eds. Edicions Universitat de Barcelona. España.
- Schmitt, S., Garrigues, S. and De la Guardia, M. (2014). Determination of the mineral composition of foods by infrared spectroscopy: a review of a green alternative. *Crit Rev Anal Chem.* 44(2), 186-197.
- Schonhof, I., Krumbein, A. and Brückner, B. (2004). Genotypic effect on glucosinolates and sensory properties of broccoli and cauliflower. *Nahrung.* 48, 25-33.
- Shenk, J. S. and Westerhaus, M.O. (1993). Analysis of agriculture and food products by near infrared reflectance spectroscopy. [Monograph]. Infracsoft International, Port Matilda, Pennsylvania, USA, pp 116.
- Šindelářová, K., Száková, J., Tremlová, J., Mestek, O., Praus, L., Kaňa, A., Najmanová J. and Tlustoš P. (2015). The response of broccoli (*Brassica oleracea* convar. *italica*) varieties on foliar application of selenium: uptake, translocation, and speciation. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess* 32(12), 2027-2038.
- Singh, S.V., Warin, R., Xiao, D., Powolny, A.A., Stan, S.D., Arlotti, J.A., Zeng, Y., Hahm, E.R., Marynowski, S.W., Bommareddy, A., Desai, D., Amin, S., Parise, R.A., Beumer, J.H., Chambers, W.H. (2009). Sulforaphane inhibits prostate carcinogenesis and pulmonary metastasis in TRAMP mice in association with increased cytotoxicity of natural killer cells. *Cancer Res.* 69, 2117-2125.

- Soh, A. C., Frakes, R.V., Chilcote, D.O., Sleper, D.A. (1984). Genetic Variation in Acid Detergent Fiber, Neutral Detergent Fiber, Hemicellulose, Crude Protein, and Their Relationship with In Vitro Dry Matter Digestibility in Tall Fescue. *Crop Sci.* 24, 721-727.
- Stone, H. and Sidel, J.L. (2004). Sensory evaluation practices (3rd Ed.). London: Elsevier Academic Press.
- Strissel, P.L., Strick, R. (2005). Multiple effects of Bioflavonoids on gene regulation, cell proliferation and apoptosis: Natural compounds move into the lime light of cancer research. *Leukemia Res.* 29, 859-861.
- Tian, M., Xu, X., Liu, Y., Xie, L. and Pan, S. (2016). Effect of Se treatment on glucosinolate metabolism and health-promoting compounds in the broccoli sprouts of three cultivars. *Food Chem.* 190, 374-380.
- Traka, M. and R. Mithen (2009). Glucosinolates, isothiocyanates and human health. *Phytochem Rev.* 8(1), 269-282.
- Traka, M.H., Spinks, C.A., Doleman, J.F., Melchini, A., Ball, R.Y., Mills, R.D., Mithen, R.F. (2010). The dietary isothiocyanate sulforaphane modulates gene expression and alternative gene splicing in a PTEN null preclinical murine model of prostate cancer. *Mol Cancer.* 9, 189.
- Tsiftoglou, A.S., Pappas¹, I.S., Vizirianakis, I.S. (2003). Mechanisms involved in the induced differentiation of leukemia cells. *Pharmacol and Therapeutics.* 100, 257-290.
- U N. 1935. Genome analysis in *Brassica* with special reference to the experimental formation of *Brassica napus* and peculiar mode of fertilisation. *Jap J Bot.* 7, 389-452.
- US Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Nutrient Data Laboratory. USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 27 (revised). Version Current: May 2015.
- Vale, A.P., Santos, J., Brito, N.V., Marinho, C., Amorim, V., Rosa, E., Beatriz, M., Oliveira, P.P. (2015). Effect of refrigerated storage on the bioactive compounds and microbial quality of *Brassica oleracea* sprouts, *Postharvest Biol Tec.* 109, 120-129.
- Van Maarschalkerweerd, M. and Husted, S. (2015). Recent developments in fast spectroscopy for plant mineral analysis. *Front Plant Sci.* 6, 169.

- Van Soest, P.J. (1982). Nutritional ecology of the ruminant. Cornell University Press, Ithaca, NY, USA.
- Van Soest, P.J. and Robertson, J.B. (1985). In Analysis of forages and fibrous foods. Cornell University Publication: Ithaca, New York, pp165.
- Van Soest, P.J., Robertson, J.B., Lewis, B.A. (1991). Methods for Dietary Fiber, Neutral Detergent Fiber, and Nonstarch Polysaccharides in Relation to Animal Nutrition. *J Dairy Sci.* 74, 3583-3597.
- Van Soest, P.J., Wine, R.H. (1967). Use of Detergents in the Analysis of Fibrous Feed. IV. The Determination of Plant Cell Wall Constituents. *J Assoc Off Anal Chem.* 50, 55.
- Varela, P. and Ares, G. (2012). Sensory profiling, the blurred line between sensory and consumer science. A review of novel methods for product characterization. *Food Res Int l.* 48, 893-908.
- Vilar, M., Velasco, P., Carrea M.E., Ordás, A. (2007). Potencial de las brásicas hortícolas para la alimentación humana. Actas de Horticultura nº 48. Sociedad Española de Ciencias Hortícolas. Pontevedra. España.
- Villatoro, M., Font, R., Saha, S., Obregón, S., Anter, J., Muñoz, A., De Haro, A., Alonso, A. and Del Río, M. (2012). In vivo biological activity of rocket extracts (*Eruca vesicaria* subsp. *sativa* (Miller) Thell) and sulforaphane. *Food Chem Toxicol.* 50(5), 1384-1392.
- Wang, X., Cheng, F. and Wang, X. (2016). User guidelines for the *Brassica* database: BRAD. *Methods Mol. Biol.* 1374, 215-231.
- White, P.J., Broadley, M.R. (2009). Biofortification of crops with seven mineral elements often lacking in human diets - iron, zinc, copper, calcium, magnesium, selenium and iodine. *New Phytol.* 182(1), 49-84.
- Williams, P.C. (2001). Implementation of near infrared technology, 2nd edition. St Paul: American Association of Cereal Chemist, pp 145-151.
- Xu, K., Thornalley, P.J. (2000). Studies on the mechanism of the inhibition of human leukaemia cell growth by dietary isothiocyanates and their cysteine adducts in vitro. *Biochem Pharmacol.* 60(2), 221-231.
- Yadav, S. S., Redden, R. J., Hatfield, J. L., Campen, H. L. and Hall, A. E. (2011). Crop Adaption to Climate Change. John Willey and Sons Ltd, London.

- Yamada-Kato, T., Nagai, M. Ohnishi, M. and Yoshida, K. (2012). Inhibitory Effects of Wasabi Isothiocyanates on Chemical Mediator Release in RBL-2H3 Rat Basophilic Leukemia Cells. *J Nutr Sci Vitaminol.* 58, 303-307.
- Yen, A., Brown, D., Fishbaugh, J. (1987). Control of H160 monocytic differentiation, different pathways and uncoupled expression of differentiation markers. *Exp Cell Res.* 168, 247-254.



ANEXO I

ANEXO I: Tablas

Abreviaturas: PRO: progoitrina; GNL: gluconapoleiferina; GNA: gluconapina; GBN: glucobrasicanapina; GBS: glucobrasicina; GST: gluconasturtina; NGBS; neoglucobrasicina

Capítulo III

Tabla III.1. Contenido de glucosinolatos en nabizas de Pontevedra temporada 2009/10.

Temporada	Origen	Siembra	Bloque	Parte de la planta	Identificación	Glucosinolatos (μ moles/g masa seca)								
						Total	PRO	GNL	GNA	GBN	GBS	GST	NGBS	otros
2009/10	Pontevedra	1	1	Nabizas	BRS0082	34,32	3,07	0,67	26,25	1,23	0,76	1,24	0,28	0,83
2009/10	Pontevedra	1	1	Nabizas	BRS0143	48,29	2,31	0,58	42,45	0,93	0,42	0,85	0,08	0,67
2009/10	Pontevedra	1	1	Nabizas	BRS0163	65,54	1,30	0,65	58,32	1,70	1,19	1,35	0,17	0,86
2009/10	Pontevedra	1	1	Nabizas	BRS0401	48,93	0,68	0,32	45,66	0,81	0,28	0,65	0,16	0,38
2009/10	Pontevedra	1	1	Nabizas	BRS0472	49,98	1,67	0,57	43,15	1,68	0,81	0,98	0,14	0,99
2009/10	Pontevedra	1	2	Nabizas	BRS0082	33,75	3,09	0,55	26,69	0,90	0,64	1,12	0,19	0,56
2009/10	Pontevedra	1	2	Nabizas	BRS0143	49,03	3,50	0,59	41,47	1,04	0,70	1,01	0,10	0,63
2009/10	Pontevedra	1	2	Nabizas	BRS0163	64,95	0,88	0,69	56,83	2,17	1,46	1,71	0,20	1,02
2009/10	Pontevedra	1	2	Nabizas	BRS0401	67,67	0,72	0,51	60,97	2,94	0,88	0,97	0,10	0,58
2009/10	Pontevedra	1	2	Nabizas	BRS0472	37,38	2,27	0,48	31,19	1,14	0,66	0,80	0,18	0,66
2009/10	Pontevedra	1	3	Nabizas	BRS0082	35,23	3,73	0,73	24,81	1,79	1,15	1,82	0,32	0,87
2009/10	Pontevedra	1	3	Nabizas	BRS0143	43,64	3,42	0,44	36,38	1,32	0,71	0,79	0,08	0,49
2009/10	Pontevedra	1	3	Nabizas	BRS0163	60,64	0,32	0,47	54,80	1,96	0,69	1,20	0,09	1,11
2009/10	Pontevedra	1	3	Nabizas	BRS0401	53,52	0,81	0,56	46,40	2,71	0,74	1,09	0,20	1,02
2009/10	Pontevedra	1	3	Nabizas	BRS0472	40,35	1,84	0,47	33,79	1,22	1,02	0,89	0,17	0,94

Temporada	Origen	Siembra	Bloque	Parte de la planta	Identificación	Glucosinolatos (μ moles/g masa seca)								
						Total	PRO	GNL	GNA	GBN	GBS	GST	NGBS	otros
					Media	48,88	1,97	0,55	41,94	1,57	0,81	1,10	0,16	0,77
					Mínimo	33,75	0,32	0,32	24,81	0,81	0,28	0,65	0,08	0,38
					Máximo	67,67	3,73	0,73	60,97	2,94	1,46	1,82	0,32	1,11
					Desviación estándar	11,68	1,17	0,11	12,07	0,65	0,30	0,33	0,07	0,22

Tabla III.2. Contenido de glucosinolatos en grelos de Pontevedra temporada 2009/10

Temporada	Origen	Siembra	Bloque	Parte de la planta	Identificación	Glucosinolatos (μ moles/g masa seca)								
						total	PRO	GNL	GNA	GBN	GBS	GST	NGBS	otros
2009/10	Pontevedra	1	1	Grelos	BRS0082	40,54	2,08	0,27	34,54	1,66	0,50	0,69	0,49	0,30
2009/10	Pontevedra	1	1	Grelos	BRS0143	29,58	2,48	0,65	23,73	0,41	0,88	0,78	0,11	0,55
2009/10	Pontevedra	1	1	Grelos	BRS0163	45,66	0,16	0,32	42,19	1,11	0,54	0,91	0,13	0,29
2009/10	Pontevedra	1	1	Grelos	BRS0401	45,44	1,00	0,33	40,30	2,13	0,65	0,57	0,25	0,21
2009/10	Pontevedra	1	1	Grelos	BRS0472	43,18	0,92	0,36	37,43	2,33	0,54	0,78	0,45	0,37
2009/10	Pontevedra	1	2	Grelos	BRS0082	53,95	3,24	0,39	45,56	2,33	0,49	1,00	0,64	0,31
2009/10	Pontevedra	1	2	Grelos	BRS0143	34,53	2,23	0,34	28,73	1,47	0,45	0,82	0,11	0,37
2009/10	Pontevedra	1	2	Grelos	BRS0163	53,52	0,49	0,47	48,80	1,20	0,87	1,08	0,17	0,43
2009/10	Pontevedra	1	2	Grelos	BRS0401	40,76	0,27	0,24	37,29	1,53	0,54	0,40	0,30	0,19
2009/10	Pontevedra	1	2	Grelos	BRS0472	41,09	1,42	0,34	35,16	2,49	0,49	0,70	0,27	0,23
2009/10	Pontevedra	1	3	Grelos	BRS0082	35,24	2,69	0,26	28,47	1,91	0,33	0,93	0,40	0,26
2009/10	Pontevedra	1	3	Grelos	BRS0143	26,82	2,97	0,44	20,89	0,63	0,62	0,64	0,07	0,55
2009/10	Pontevedra	1	3	Grelos	BRS0163	63,87	0,40	0,36	58,13	2,49	0,49	1,38	0,20	0,43
2009/10	Pontevedra	1	3	Grelos	BRS0401	53,17	1,10	0,36	46,46	3,07	0,59	1,15	0,20	0,25
2009/10	Pontevedra	1	3	Grelos	BRS0472	36,09	2,86	0,51	29,15	1,65	0,63	0,69	0,22	0,38

Temporada	Origen	Siembra	Bloque	Parte de la planta	Identificación	Glucosinolatos (μ moles/g masa seca)								
						total	PRO	GNL	GNA	GBN	GBS	GST	NGBS	otros
					Media	42,90	1,62	0,38	37,12	1,76	0,57	0,83	0,27	0,34
					Mínimo	26,82	0,16	0,24	20,89	0,41	0,33	0,40	0,07	0,19
					Máximo	63,87	3,24	0,65	58,13	3,07	0,88	1,38	0,64	0,55
					Desviación estándar	10,07	1,08	0,11	10,12	0,74	0,15	0,25	0,16	0,11

Tabla III.3. Contenido de glucosinolatos en nabizas de La Palma, temporada 2009/10

Temporada	Origen	Siembra	Bloque	Parte de la planta	Identificación	Glucosinolatos (μ moles/g masa seca)								
						Total	PRO	GNL	GNA	GBN	GBS	GST	NGBS	otros
2009/10	La Palma	1	1	Nabizas	BRS0082	13,59	1,24	0,12	7,26	1,21	1,77	1,14	0,79	0,06
2009/10	La Palma	1	2	Nabizas	BRS0082	15,76	1,22	0,16	11,01	1,26	0,93	0,64	0,44	0,10
2009/10	La Palma	1	3	Nabizas	BRS0082	9,81	0,83	0,10	6,00	1,02	1,02	0,56	0,25	0,04
2009/10	La Palma	1	1	Nabizas	BRS0143	15,50	1,67	0,13	10,60	0,52	1,08	0,84	0,34	0,31
2009/10	La Palma	1	2	Nabizas	BRS0143	14,05	2,79	0,18	8,62	1,15	0,31	0,72	0,06	0,23
2009/10	La Palma	1	3	Nabizas	BRS0143	11,47	1,53	0,14	7,26	1,18	0,32	0,90	0,09	0,07
2009/10	La Palma	1	1	Nabizas	BRS0163	17,73	0,19		13,89	1,50	0,69	0,69	0,15	0,62
2009/10	La Palma	1	2	Nabizas	BRS0163	18,88	0,21	0,10	14,55	1,80	0,81	0,85	0,06	0,50
2009/10	La Palma	1	3	Nabizas	BRS0163	20,16	0,30	0,18	16,78	1,03	0,69	0,76	0,17	0,26
2009/10	La Palma	1	1	Nabizas	BRS0401	18,45	0,19		14,96	1,13	0,62	0,49	0,97	0,10
2009/10	La Palma	1	2	Nabizas	BRS0401	17,17	0,21	0,16	13,99	1,01	0,40		1,06	0,34
2009/10	La Palma	1	3	Nabizas	BRS0401	24,17	0,23	0,21	18,86	1,08	0,98		2,70	0,11
2009/10	La Palma	1	1	Nabizas	BRS0472	12,71	1,40		7,54	1,33	0,77	0,53	0,89	0,27
2009/10	La Palma	1	2	Nabizas	BRS0472	15,29	1,68	0,20	10,07		0,71	1,18	1,24	0,20
2009/10	La Palma	1	3	Nabizas	BRS0472	12,07	0,72		8,71	1,11	0,52	0,66	0,21	0,16

Temporada	Origen	Siembra	Bloque	Parte de la planta	Identificación	Glucosinolatos (μ moles/g masa seca)								
						Total	PRO	GNL	GNA	GBN	GBS	GST	NGBS	otros
2009/10	La Palma	2	1	Nabizas	BRS0082	13,89	1,64	0,12	10,08	0,40	0,63	0,63	0,27	0,12
2009/10	La Palma	2	2	Nabizas	BRS0082	11,27	0,99		8,24	0,90	0,42	0,55	0,08	0,08
2009/10	La Palma	2	3	Nabizas	BRS0082	15,49	1,05	0,23	11,20	1,54	0,63	0,52	0,21	0,11
2009/10	La Palma	2	1	Nabizas	BRS0143	14,76	2,71		10,10	0,80	0,24	0,63	0,19	0,10
2009/10	La Palma	2	2	Nabizas	BRS0143	8,26	1,18	0,12	5,86	0,24	0,20	0,51	0,11	0,05
2009/10	La Palma	2	3	Nabizas	BRS0143	16,80	1,94	0,27	12,23	1,15	0,19	0,85	0,09	0,08
2009/10	La Palma	2	1	Nabizas	BRS0163	24,27	0,35	0,10	21,48	0,89	0,50	0,60	0,08	0,28
2009/10	La Palma	2	2	Nabizas	BRS0163	21,72	0,12	0,24	18,34	1,53	0,39	0,79	0,10	0,22
2009/10	La Palma	2	3	Nabizas	BRS0163	20,02	0,16	0,21	17,32	1,06	0,33	0,56	0,14	0,26
2009/10	La Palma	2	1	Nabizas	BRS0401	18,07	0,24	0,09	16,18	0,35	0,27	0,38	0,48	0,08
2009/10	La Palma	2	2	Nabizas	BRS0401	17,78	0,13		14,69	1,39	0,43	0,37	0,71	0,06
2009/10	La Palma	2	3	Nabizas	BRS0401	26,29	0,19	0,38	22,73	1,77	0,33	0,55	0,24	0,11
2009/10	La Palma	2	1	Nabizas	BRS0472	16,06	0,88	0,10	13,19	0,82	0,15	0,63	0,14	0,14
2009/10	La Palma	2	2	Nabizas	BRS0472	17,16	1,61	0,27	13,38	0,75	0,23	0,57	0,22	0,14
2009/10	La Palma	2	3	Nabizas	BRS0472	15,28	1,03	0,29	11,89	0,82	0,32	0,52	0,29	0,13
2009/10	La Palma	3	1	Nabizas	BRS0082	7,17	0,98	0,24	2,65	0,21	1,67	0,64	0,38	0,40
2009/10	La Palma	3	2	Nabizas	BRS0082	6,73	1,01	0,25	3,11	0,33	0,92	0,62	0,30	0,19
2009/10	La Palma	3	3	Nabizas	BRS0082	10,98	1,42	0,15	2,72	0,24	3,05	0,58	2,64	0,20
2009/10	La Palma	3	1	Nabizas	BRS0143	12,26	0,17	0,30	8,70	0,62	1,09	0,49	0,34	0,55
2009/10	La Palma	3	2	Nabizas	BRS0143	15,20	3,31	0,28	7,03	0,50	2,15	0,61	1,15	0,16
2009/10	La Palma	3	3	Nabizas	BRS0143	17,02	2,20	0,27	11,12	0,86	1,11	0,71	0,45	0,30
2009/10	La Palma	3	1	Nabizas	BRS0163	6,97	1,48	0,27	3,05	0,35	0,61	0,49	0,31	0,41
2009/10	La Palma	3	2	Nabizas	BRS0163	11,95	0,13	0,21	8,54	0,66	0,91	0,46	0,34	0,70
2009/10	La Palma	3	3	Nabizas	BRS0163	19,02	0,22	0,20	14,64	1,17	0,84	0,74	0,78	0,43
2009/10	La Palma	3	1	Nabizas	BRS0401	20,26	0,31	0,32	12,39	1,03	1,56	0,43	4,05	0,17

Temporada	Origen	Siembra	Bloque	Parte de la planta	Identificación	Glucosinolatos ($\mu\text{moles/g}$ masa seca)								
						Total	PRO	GNL	GNA	GBN	GBS	GST	NGBS	otros
2009/10	La Palma	3	2	Nabizas	BRS0401	15,98	0,54		9,60	0,79	1,37	0,33	3,22	0,14
2009/10	La Palma	3	3	Nabizas	BRS0401	14,36	0,12	0,13	8,84	0,49	1,33	0,35	2,97	0,14
2009/10	La Palma	3	1	Nabizas	BRS0472	11,33	1,17	0,44	6,71	0,35	1,03	0,75	0,55	0,33
2009/10	La Palma	3	2	Nabizas	BRS0472	13,81	0,76	0,25	9,12	0,78	0,70	0,66	1,28	0,26
2009/10	La Palma	3	3	Nabizas	BRS0472	9,99	1,63	0,20	3,48	1,13	1,86	0,53	0,75	0,41
Media						15,27	0,98	0,21	10,86	0,91	0,82	0,63	0,72	0,22
Mínimo						6,73	0,12	0,09	2,65	0,21	0,15	0,33	0,06	0,04
Máximo						26,29	3,31	0,44	22,73	1,80	3,05	1,18	4,05	0,70
Desviación estándar						4,50	0,80	0,08	4,86	0,42	0,59	0,18	0,94	0,16

Tabla III.4. Contenido de glucosinolatos en grelos de La Palma temporada 2009/10

Temporada	Origen	Siembra	Bloque	Parte de la planta	Identificación	Glucosinolatos ($\mu\text{moles/g}$ masa seca)								
						Total	PRO	GNL	GNA	GBN	GBS	GST	NGBS	otros
2009/10	La Palma	1	1	Grelos	BRS0082	32,31	4,44	0,25	22,52	0,76	0,74	1,94	1,27	0,39
2009/10	La Palma	1	2	Grelos	BRS0082	28,72	2,41		22,13	1,45	0,44	1,32	0,71	0,26
2009/10	La Palma	1	3	Grelos	BRS0082	29,61	3,81		21,93	1,01	0,53	1,38	0,77	0,19
2009/10	La Palma	1	1	Grelos	BRS0143	33,36	4,07	0,41	25,17	1,29	0,75	1,13	0,29	0,26
2009/10	La Palma	1	2	Grelos	BRS0143	24,71	3,82	0,13	18,07	1,22	0,19	0,99	0,12	0,17
2009/10	La Palma	1	3	Grelos	BRS0143	23,62	2,22	0,21	17,82	1,74	0,27	1,01	0,18	0,16
2009/10	La Palma	1	1	Grelos	BRS0163	55,54	0,11	0,21	49,34	2,92	0,46	1,77	0,36	0,38
2009/10	La Palma	1	2	Grelos	BRS0163	29,62	0,14		25,65	2,51	0,17	0,91	0,15	0,10
2009/10	La Palma	1	3	Grelos	BRS0163	43,02	0,28	0,19	37,83	1,83	0,46	1,66	0,43	0,35
2009/10	La Palma	1	1	Grelos	BRS0401	50,80	0,31	0,27	44,41	2,72	0,83	1,06	1,04	0,16

Temporada	Origen	Siembra	Bloque	Parte de la planta	Identificación	Glucosinolatos (μ moles/g masa seca)								
						Total	PRO	GNL	GNA	GBN	GBS	GST	NGBS	otros
2009/10	La Palma	1	2	Grelos	BRS0401	46,51	0,26	0,12	41,61	1,80	0,54	1,01	1,02	0,15
2009/10	La Palma	1	3	Grelos	BRS0401	54,17	0,35	0,35	47,29	2,99	0,97	1,15	0,93	0,13
2009/10	La Palma	1	1	Grelos	BRS0472	43,40	2,07	0,27	37,23	0,90	0,89	0,90	0,82	0,33
2009/10	La Palma	1	2	Grelos	BRS0472	57,29	3,95	0,31	44,47	4,39	0,89	2,31	0,72	0,24
2009/10	La Palma	1	3	Grelos	BRS0472	32,65	1,14	0,18	27,69	1,04	0,39	1,45	0,37	0,40
2009/10	La Palma	2	1	Grelos	BRS0082	16,96	2,07		12,87	0,48	0,32	0,47	0,56	0,19
2009/10	La Palma	2	2	Grelos	BRS0082	19,64	2,74		13,55	1,20	0,64	0,69	0,59	0,23
2009/10	La Palma	2	3	Grelos	BRS0082	11,09	0,74		8,58	0,47	0,28	0,39	0,47	0,16
2009/10	La Palma	2	1	Grelos	BRS0143	22,21	6,32		11,98	2,03	0,61	0,65	0,51	0,11
2009/10	La Palma	2	2	Grelos	BRS0143	12,70	2,42		8,45	0,45	0,48	0,54	0,30	0,07
2009/10	La Palma	2	3	Grelos	BRS0143	17,89	2,77		12,78	0,66	0,59	0,82	0,16	0,11
2009/10	La Palma	2	1	Grelos	BRS0163	44,06	0,14	0,09	39,82	1,71	0,52	0,94	0,50	0,34
2009/10	La Palma	2	2	Grelos	BRS0163	32,28	0,27		28,66	1,39	0,50	0,92	0,26	0,28
2009/10	La Palma	2	3	Grelos	BRS0163	60,81	0,25	0,13	55,24	2,20	0,50	1,81	0,36	0,33
2009/10	La Palma	2	1	Grelos	BRS0401	49,60	2,91		41,88	3,04	0,30	0,92	0,42	0,14
2009/10	La Palma	2	2	Grelos	BRS0401	46,97	1,00		41,93	2,39	0,28	0,95	0,34	0,09
2009/10	La Palma	2	3	Grelos	BRS0401	48,17	0,97		44,70	0,77	0,43	0,69	0,46	0,15
2009/10	La Palma	2	1	Grelos	BRS0472	44,59	2,60		38,51	1,11	0,68	0,94	0,30	0,46
2009/10	La Palma	2	2	Grelos	BRS0472	22,92	1,54		19,57	0,48	0,31	0,61	0,20	0,21
2009/10	La Palma	2	3	Grelos	BRS0472	22,16	3,78		15,56	0,65	0,87	0,59	0,45	0,27
					Media	35,25	2,00	0,22	29,24	1,59	0,53	1,06	0,50	0,23
					Mínimo	11,09	0,11	0,09	8,45	0,45	0,17	0,39	0,12	0,07
					Máximo	60,81	6,32	0,41	55,24	4,39	0,97	2,31	1,27	0,46
					Desviación estándar	14,29	1,64	0,09	13,87	0,97	0,22	0,46	0,29	0,11

Tabla III.5. Contenido de glucosinolatos en nabizas de Córdoba temporada 2009/10

Temporada	Origen	Siembra	Bloque	Parte de la planta	Identificación	Glucosinolatos (μ moles/g masa seca)							
						Total	PRO	GNL	GNA	GBN	GBS	NGBS	otros
2009/10	Córdoba	1	1	Nabizas	BRS0082	11,19	2,22	0,3	7,47	0,59	0,21	0,31	0,09
2009/10	Córdoba	1	2	Nabizas	BRS0082	1,45	0,33	0,29	0,65	0,04	0,03	0,1	0,01
2009/10	Córdoba	1	3	Nabizas	BRS0082	7,21	1,85	0,34	4,24	0,43	0,12	0,2	0,03
2009/10	Córdoba	1	1	Nabizas	BRS0143	2,64		0,25	2,08	0,12	0,09	0,09	0,01
2009/10	Córdoba	1	2	Nabizas	BRS0143	1,2		0,28	0,82	0,07	0,02	0,01	
2009/10	Córdoba	1	3	Nabizas	BRS0143	0,83		0,27	0,42	0,03	0,03	0,08	
2009/10	Córdoba	1	1	Nabizas	BRS0163	11,79		0,37	10,29	0,79	0,06	0,18	0,1
2009/10	Córdoba	1	2	Nabizas	BRS0163	3,43		0,31	2,76	0,2	0,01	0,12	0,03
2009/10	Córdoba	1	3	Nabizas	BRS0163	7,31		0,29	6,45	0,37	0,03	0,14	0,03
2009/10	Córdoba	1	1	Nabizas	BRS0401	5,13		0,24	4,35	0,31	0,02	0,2	0,01
2009/10	Córdoba	1	2	Nabizas	BRS0401	2,17	0,06	0,23	1,62	0,1	0,02	0,14	
2009/10	Córdoba	1	3	Nabizas	BRS0401	3,79	0,06	0,27	3,18	0,14	0,01	0,13	
2009/10	Córdoba	1	1	Nabizas	BRS0472	8,19	1,03	0,39	5,82	0,63	0,11	0,17	0,04
2009/10	Córdoba	1	2	Nabizas	BRS0472	2,16		0,37	1,53	0,09	0,04	0,12	0,01
2009/10	Córdoba	1	3	Nabizas	BRS0472	1,59		0,32	1,06	0,06	0,02	0,12	0,01
2009/10	Córdoba	3	1	Nabizas	BRS0082	25,5	5,51	0,28	16,84	0,93	0,25	1,46	0,23
2009/10	Córdoba	3	2	Nabizas	BRS0082	20,12	5,62	0,26	11,51	0,68	0,38	1,51	0,16
2009/10	Córdoba	3	3	Nabizas	BRS0082	25,02	6,76	0,34	14,48	0,9	0,39	1,94	0,21
2009/10	Córdoba	3	1	Nabizas	BRS0143	20,75	3,61	0,31	15,15	0,93	0,11	0,44	0,2
2009/10	Córdoba	3	2	Nabizas	BRS0143	22,96	4,6	0,3	16,09	0,69	0,19	0,74	0,35

Temporada	Origen	Siembra	Bloque	Parte de la planta	Identificación	Glucosinolatos (μ moles/g masa seca)							
						Total	PRO	GNL	GNA	GBN	GBS	NGBS	otros
2009/10	Córdoba	3	3	Nabizas	BRS0143	23,6	4,06	0,29	17,36	1,01	0,16	0,45	0,27
2009/10	Córdoba	3	1	Nabizas	BRS0163	36,87	3,54	0,31	29,19	1,56	0,5	1,27	0,5
2009/10	Córdoba	3	2	Nabizas	BRS0163	38,6	2,67	0,26	31,77	1,62	0,39	0,8	1,09
2009/10	Córdoba	3	3	Nabizas	BRS0163	42,65	4,52	0,3	33,92	2,03	0,28	0,79	0,81
2009/10	Córdoba	3	1	Nabizas	BRS0401	31,77	1,34	0,29	27,97	0,74	0,18	1,16	0,09
2009/10	Córdoba	3	2	Nabizas	BRS0401	33,83	2	0,34	28,19	1,27	0,23	1,73	0,07
2009/10	Córdoba	3	3	Nabizas	BRS0401	30,46	1,3	0,26	25,95	1,37	0,13	1,38	0,07
2009/10	Córdoba	3	1	Nabizas	BRS0472	25,61	3,13	0,32	19,48	1,12	0,17	1,23	0,16
2009/10	Córdoba	3	2	Nabizas	BRS0472	25,9	3,24	0,25	19,42	0,95	0,21	1,54	0,29
2009/10	Córdoba	3	3	Nabizas	BRS0472	23,5	2,78	0,33	17,68	1,27	0,15	1,08	0,21
Media						16,57	2,87	0,30	12,59	0,70	0,15	0,65	0,20
Mínimo						0,83	0,06	0,23	0,42	0,03	0,01	0,01	0,01
Máximo						42,65	6,76	0,39	33,92	2,03	0,50	1,94	1,09
Desviación estándar						13,26	1,88	0,04	10,66	0,55	0,13	0,61	0,26

Tabla III.6. Contenido de glucosinolatos en nabizas de Córdoba temporada 2010/11

Temporada	Origen	Siembra	Bloque	Parte de la planta	Identificación	Glucosinolatos (μ moles/g masa seca)						
						Total	PRO	GNA	GBN	GBS	GST	otros
2010/11	Córdoba	1	1	Nabizas	BRS0082	26,87	2,72	21,32	0,93	0,46	1,39	0,05
2010/11	Córdoba	1	2	Nabizas	BRS0082	29,78	3,20	23,35	1,15	0,53	1,51	0,05
2010/11	Córdoba	1	3	Nabizas	BRS0082	32,73	2,46	26,84	1,29	0,51	1,60	0,04
2010/11	Córdoba	1	1	Nabizas	BRS0143	22,82		19,77	1,50	0,40	1,10	0,06
2010/11	Córdoba	1	2	Nabizas	BRS0143	26,35	2,10	21,82	1,17	0,23	0,99	0,04

Temporada	Origen	Siembra	Bloque	Parte de la planta	Identificación	Glucosinolatos (μ moles/g masa seca)						
						Total	PRO	GNA	GBN	GBS	GST	otros
2010/11	Córdoba	1	3	Nabizas	BRS0143	24,61	3,06	19,35	0,72	0,31	1,12	0,05
2010/11	Córdoba	1	1	Nabizas	BRS0163	59,90	0,72	54,12	2,21	0,92	1,82	0,10
2010/11	Córdoba	1	2	Nabizas	BRS0163	47,68	0,66	40,95	3,89	0,61	1,50	0,08
2010/11	Córdoba	1	3	Nabizas	BRS0163	45,23	0,91	39,76	2,57	0,45	1,47	0,06
2010/11	Córdoba	1	1	Nabizas	BRS0401	42,19	0,79	37,61	2,14	0,33	1,28	0,05
2010/11	Córdoba	1	2	Nabizas	BRS0401	40,39	0,52	36,30	1,99	0,33	1,21	0,04
2010/11	Córdoba	1	3	Nabizas	BRS0401	37,67	0,54	33,42	2,28	0,23	1,17	0,03
2010/11	Córdoba	1	1	Nabizas	BRS0472	30,80	1,94	26,01	1,33	0,49	0,98	0,06
2010/11	Córdoba	1	2	Nabizas	BRS0472	31,91	1,95	26,47	1,86	0,54	1,05	0,04
2010/11	Córdoba	1	3	Nabizas	BRS0472	34,51	2,49	28,40	2,13	0,45	1,01	0,05
2010/11	Córdoba	2	1	Nabizas	BRS0082	26,58	1,58	20,47	2,87	0,46	1,16	0,03
2010/11	Córdoba	2	2	Nabizas	BRS0082	25,64	1,37	21,21	1,53	0,35	1,19	0,00
2010/11	Córdoba	2	3	Nabizas	BRS0082	30,03	1,88	22,20	4,22	0,37	1,36	0,00
2010/11	Córdoba	2	1	Nabizas	BRS0143	9,11		8,15	0,22	0,30	0,43	0,00
2010/11	Córdoba	2	2	Nabizas	BRS0143	8,05	0,90	6,07	0,43	0,19	0,46	0,00
2010/11	Córdoba	2	3	Nabizas	BRS0143	8,70	0,82	7,20	0,25	0,15	0,29	0,00
2010/11	Córdoba	2	1	Nabizas	BRS0163	24,43	0,35	21,59	1,72	0,12	0,66	0,00
2010/11	Córdoba	2	2	Nabizas	BRS0163	22,03	0,32	18,35	2,71	0,11	0,51	0,03
2010/11	Córdoba	2	3	Nabizas	BRS0163	32,11	0,31	28,73	2,14	0,10	0,84	0,00
2010/11	Córdoba	2	1	Nabizas	BRS0401	21,57	0,27	18,98	1,55	0,38	0,40	0,00
2010/11	Córdoba	2	2	Nabizas	BRS0401	14,15		12,22	1,31	0,22	0,35	0,07
2010/11	Córdoba	2	3	Nabizas	BRS0401	18,37		16,50	1,14	0,16	0,56	0,00
2010/11	Córdoba	2	1	Nabizas	BRS0472	24,63	0,79	21,08	2,15	0,13	0,45	0,03
2010/11	Córdoba	2	2	Nabizas	BRS0472	20,37	0,59	17,45	1,84	0,13	0,35	0,00
2010/11	Córdoba	2	3	Nabizas	BRS0472	23,61	1,49	19,34	2,00	0,17	0,61	0,00

Temporada	Origen	Siembra	Bloque	Parte de la planta	Identificación	Glucosinolatos (μ moles/g masa seca)						
						Total	PRO	GNA	GBN	GBS	GST	otros
					Media	28,09	1,34	23,83	1,77	0,34	0,96	0,03
					Mínimo	8,05	0,27	6,07	0,22	0,10	0,29	0,00
					Máximo	59,90	3,20	54,12	4,22	0,92	1,82	0,10
					Desviación estándar	11,60	0,91	10,49	0,92	0,19	0,44	0,03

Tabla III.7. Contenido de glucosinolatos en grelos de Córdoba temporada 2010/11

Temporada	Origen	Siembra	Bloque	Parte de la planta	Identificación	Glucosinolatos (μ moles/g masa seca)						
						Total	PRO	GNA	GBN	GBS	GST	otros
2010/11	Córdoba	1	1	Grelos	BRS0143	15,54	1,21	13,31	0,22	0,24	0,53	0,03
2010/11	Córdoba	1	2	Grelos	BRS0143	14,71	2,62	10,96	0,48	0,16	0,46	0,03
2010/11	Córdoba	1	3	Grelos	BRS0143	20,60	2,86	16,15	0,73	0,19	0,64	0,03
2010/11	Córdoba	1	1	Grelos	BRS0472	19,53	0,57	17,25	0,93	0,13	0,63	0,03
2010/11	Córdoba	1	2	Grelos	BRS0472	14,70	0,85	13,00	0,26	0,34	0,25	0,00
2010/11	Córdoba	1	3	Grelos	BRS0472	27,30	1,18	24,99	0,34	0,13	0,66	0,00
2010/11	Córdoba	2	1	Grelos	BRS0143	9,47	0,81	7,95	0,16	0,18	0,36	0,00
2010/11	Córdoba	2	2	Grelos	BRS0143	13,28	1,70	10,43	0,37	0,18	0,56	0,04
2010/11	Córdoba	2	3	Grelos	BRS0143	10,05	1,45	7,52	0,56	0,07	0,46	0,00
					Media	16,13	1,47	13,50	0,45	0,18	0,51	0,02
					Mínimo	9,47	0,57	7,52	0,16	0,07	0,25	0,00
					Máximo	27,30	2,86	24,99	0,93	0,34	0,66	0,04
					Desviación estándar	5,59	0,80	5,43	0,25	0,08	0,14	0,02

Tabla III.8. Contenido de glucosinolatos en nabizas de Córdoba temporada 2011/12

Temporada	Origen	Siembra	Bloque	Parte de la planta	Identificación	Glucosinolatos ($\mu\text{moles/g}$ masa seca)							
						Total	PRO	GNA	GBN	GBS	GST	NGBS	otros
2011/12	Córdoba	1	1	Nabizas	BRS0082	40,97	11,14	21,92	1,31	1,78	2,16	1,55	1,11
2011/12	Córdoba	1	2	Nabizas	BRS0082	32,12	8,32	17,75	1,65	1,51	1,54	0,89	0,47
2011/12	Córdoba	1	3	Nabizas	BRS0082	42,00	7,52	26,49	2,20	2,19	1,71	1,08	0,82
2011/12	Córdoba	1	1	Nabizas	BRS0143	20,17	3,39	13,87	0,48	0,62	0,23	0,54	1,03
2011/12	Córdoba	1	2	Nabizas	BRS0143	43,70	5,84	30,08	2,83	2,25	1,27	0,74	0,69
2011/12	Córdoba	1	3	Nabizas	BRS0143	33,39	6,17	21,13	2,35	1,57	1,05	0,65	0,47
2011/12	Córdoba	1	1	Nabizas	BRS0163	77,84	1,81	66,59	3,94	2,44	1,43	0,96	0,68
2011/12	Córdoba	1	2	Nabizas	BRS0163	51,43	1,62	44,51	2,09	1,08	0,92	0,36	0,85
2011/12	Córdoba	1	3	Nabizas	BRS0163	62,93	2,94	53,82	2,30	1,27	1,10	0,40	1,10
2011/12	Córdoba	1	1	Nabizas	BRS0401	58,64	2,40	48,49	3,06	2,10	0,89	1,26	0,45
2011/12	Córdoba	1	2	Nabizas	BRS0401	42,48	0,47	35,02	3,43	1,27	0,60	1,38	0,30
2011/12	Córdoba	1	3	Nabizas	BRS0401	56,34	1,96	44,54	4,08	1,42	0,94	2,79	0,62
2011/12	Córdoba	1	1	Nabizas	BRS0472	36,47	2,20	28,69	1,54	1,36	0,74	1,13	0,82
2011/12	Córdoba	1	2	Nabizas	BRS0472	42,62	7,55	27,66	2,33	1,26	1,23	1,08	1,51
2011/12	Córdoba	1	3	Nabizas	BRS0472	37,52	6,27	22,87	2,86	1,76	0,94	1,85	0,96
2011/12	Córdoba	1	1	Nabizas	BRS0082	37,34	8,84	21,81	1,80	1,60	1,44	1,01	0,85
2011/12	Córdoba	1	2	Nabizas	BRS0082	35,08	6,21	22,70	1,45	1,86	1,40	0,80	0,66
2011/12	Córdoba	1	3	Nabizas	BRS0082	43,80	7,15	29,14	1,88	1,84	1,65	1,18	0,96
2011/12	Córdoba	1	1	Nabizas	BRS0143	33,24	6,01	23,49	0,84	0,82	1,04	0,42	0,62
2011/12	Córdoba	1	2	Nabizas	BRS0143	43,12	8,07	28,66	2,01	1,46	1,57	0,50	0,86
2011/12	Córdoba	1	3	Nabizas	BRS0143	37,88	7,27	25,13	2,96	0,59	1,21	0,32	0,40
2011/12	Córdoba	1	1	Nabizas	BRS0163	78,81	1,91	64,26	7,32	1,36	1,98	0,76	1,23
2011/12	Córdoba	1	2	Nabizas	BRS0163	65,16	1,94	54,86	3,88	1,24	1,62	0,70	0,93

Temporada	Origen	Siembra	Bloque	Parte de la planta	Identificación	Glucosinolatos (µmoles/g masa seca)							
						Total	PRO	GNA	GBN	GBS	GST	NGBS	otros
2011/12	Córdoba	1	3	Nabizas	BRS0163	66,55	2,35	54,40	4,03	2,15	1,80	1,00	0,82
2011/12	Córdoba	1	1	Nabizas	BRS0401	50,47	2,21	41,98	2,47	1,53	0,61	1,30	0,36
2011/12	Córdoba	1	2	Nabizas	BRS0401	54,93	2,17	47,81	1,44	1,56	0,82	0,81	0,32
2011/12	Córdoba	1	3	Nabizas	BRS0401	39,31	1,44	30,80	2,59	1,92	0,46	1,62	0,48
2011/12	Córdoba	1	1	Nabizas	BRS0472	45,55	3,94	35,53	2,19	1,28	1,07	0,94	0,60
2011/12	Córdoba	1	2	Nabizas	BRS0472	25,79	3,68	16,60	1,79	1,49	1,02	0,58	0,62
2011/12	Córdoba	1	3	Nabizas	BRS0472	40,51	4,95	28,84	1,41	1,39	0,95	1,58	1,40
2011/12	Córdoba	2	1	Nabizas	BRS0082	33,49	2,82	25,55	1,02	0,39	2,65	0,33	0,74
2011/12	Córdoba	2	2	Nabizas	BRS0082	40,87	2,46	29,78	5,02	0,33	2,24	0,41	0,63
2011/12	Córdoba	2	3	Nabizas	BRS0082	27,87	2,34	21,52	1,18	0,47	1,26	0,34	0,76
2011/12	Córdoba	2	1	Nabizas	BRS0143	19,51	1,45	15,44	0,82	0,19	0,27	0,15	1,18
2011/12	Córdoba	2	2	Nabizas	BRS0143	21,74	1,52	18,38	0,29	0,31	0,50	0,10	0,63
2011/12	Córdoba	2	3	Nabizas	BRS0143	17,74	1,51	14,28	0,61	0,16	0,56	0,15	0,47
2011/12	Córdoba	2	1	Nabizas	BRS0163	48,72	1,18	41,02	2,53	0,45	2,66	0,33	0,55
2011/12	Córdoba	2	2	Nabizas	BRS0163	56,90	1,49	48,07	3,52	0,76	2,25	0,25	0,56
2011/12	Córdoba	2	3	Nabizas	BRS0163	39,36	1,50	32,56	2,76	0,77	1,11	0,24	0,44
2011/12	Córdoba	2	1	Nabizas	BRS0401	36,57	0,93	33,14	0,92	0,25	0,85	0,21	0,27
2011/12	Córdoba	2	2	Nabizas	BRS0401	49,86	1,38	42,91	3,63	0,51	0,75	0,13	0,56
2011/12	Córdoba	2	3	Nabizas	BRS0401	40,95	1,13	37,72	0,42	0,41	0,85	0,14	0,28
2011/12	Córdoba	2	1	Nabizas	BRS0472	38,66	1,90	30,40	3,29	0,73	1,71	0,33	0,29
2011/12	Córdoba	2	2	Nabizas	BRS0472	34,99	1,58	28,30	2,60	0,46	1,24	0,19	0,61
2011/12	Córdoba	2	3	Nabizas	BRS0472	34,85	1,59	28,71	2,59	0,25	1,04	0,23	0,45
					Media	42,63	3,61	32,83	2,35	1,16	1,23	0,75	0,70
					Mínimo	17,74	0,47	13,87	0,29	0,16	0,23	0,10	0,27
					Máximo	78,81	11,14	66,59	7,32	2,44	2,66	2,79	1,51

Temporada	Origen	Siembra	Bloque	Parte de la planta	Identificación	Glucosinolatos ($\mu\text{moles/g}$ masa seca)							
						Total	PRO	GNA	GBN	GBS	GST	NGBS	otros
Desviación estándar						13,84	2,68	13,13	1,34	0,65	0,58	0,56	0,30

Tabla III.9. Contenido de glucosinolatos en grelos de Córdoba temporada 2011/12

Temporada	Origen	Siembra	Bloque	Parte de la planta	Identificación	Glucosinolatos ($\mu\text{moles/g}$ masa seca)							
						Total	PRO	GNA	GBN	GBS	GST	NGBS	otros
2011/12	Córdoba	1	1	Grelos	BRS0143	34,38	2,81	28,54	0,83	0,16	1,07	0,21	0,76
2011/12	Córdoba	1	1	Grelos	BRS0143	32,46	3,19	27,03	0,46	0,10	1,15	0,22	0,31
2011/12	Córdoba	1	1	Grelos	BRS0143	28,15	2,53	23,53	1,21	0,09	0,41	0,18	0,20
2011/12	Córdoba	1	2	Grelos	BRS0143	29,28	1,89	24,07	2,10	0,23	0,52	0,14	0,34
2011/12	Córdoba	1	2	Grelos	BRS0143	32,17	5,68	23,61		0,22	1,49	0,10	1,07
2011/12	Córdoba	1	2	Grelos	BRS0143	32,65	5,04	23,36	0,75	0,19	2,00	0,35	0,96
2011/12	Córdoba	1	2	Grelos	BRS0143	35,12	1,92	29,97	0,37	0,30	1,45	0,51	0,61
2011/12	Córdoba	1	2	Grelos	BRS0143	33,83	3,64	27,19	0,24	0,42	1,15	0,42	0,79
2011/12	Córdoba	1	2	Grelos	BRS0143	36,46	3,85	30,09	0,39	0,40	1,28	0,18	0,28
2011/12	Córdoba	1	3	Grelos	BRS0143	27,59	3,73	21,39	0,52	0,20	1,14	0,06	0,55
2011/12	Córdoba	1	3	Grelos	BRS0143	20,00	2,38	14,93	0,96	0,60	0,70	0,26	0,18
2011/12	Córdoba	1	3	Grelos	BRS0143	16,10	3,02	11,95	0,49	0,12	0,29	0,09	0,14
2011/12	Córdoba	1	3	Grelos	BRS0143	30,85	3,09	23,32	1,54	0,74	1,55	0,31	0,29
2011/12	Córdoba	1	3	Grelos	BRS0143	29,27	4,43	20,80	1,29	0,26	1,06	0,24	1,19
2011/12	Córdoba	1	3	Grelos	BRS0143	24,28	4,07	17,95	0,46	0,26	0,96	0,23	0,34
2011/12	Córdoba	2	1	Grelos	BRS0143	22,34	0,89	18,60	1,22	0,23	0,46	0,10	0,83
2011/12	Córdoba	2	1	Grelos	BRS0143	23,89	1,57	19,12	0,22	0,10	1,53	0,04	1,31

Temporada	Origen	Siembra	Bloque	Parte de la planta	Identificación	Glucosinolatos (µmoles/g masa seca)							
						Total	PRO	GNA	GBN	GBS	GST	NGBS	otros
2011/12	Córdoba	2	1	Grelos	BRS0143	31,54	1,28	25,36	2,11	0,27	0,72	0,09	1,71
2011/12	Córdoba	2	1	Grelos	BRS0143	21,70	1,06	17,84	0,18	0,26	1,11	0,08	1,16
2011/12	Córdoba	2	1	Grelos	BRS0143	36,73	2,21	29,40	3,63	0,38	0,77	0,15	0,21
2011/12	Córdoba	2	1	Grelos	BRS0143	25,55	2,42	20,00	0,37	0,34	1,66	0,03	0,75
2011/12	Córdoba	2	2	Grelos	BRS0143	18,25	1,24	13,83	0,16	0,54	0,43	0,09	1,95
2011/12	Córdoba	2	2	Grelos	BRS0143	19,94	1,91	13,01	0,18	0,31	0,60	0,06	3,86
2011/12	Córdoba	2	2	Grelos	BRS0143	20,25	3,10	14,13	0,90	0,21	0,93	0,07	0,91
2011/12	Córdoba	2	2	Grelos	BRS0143	27,93	1,61	24,79	0,33	0,21	0,56	0,04	0,40
2011/12	Córdoba	2	2	Grelos	BRS0143	32,27	1,39	27,83	0,59	0,73	1,05	0,07	0,60
2011/12	Córdoba	2	2	Grelos	BRS0143	32,82	1,40	28,53	0,37	0,42	1,18	0,09	0,84
2011/12	Córdoba	2	3	Grelos	BRS0143	30,80	1,42	26,45	0,33	0,29	1,31	0,11	0,89
2011/12	Córdoba	2	3	Grelos	BRS0143	24,52	1,67	21,38		0,36	0,93	0,04	0,14
2011/12	Córdoba	2	3	Grelos	BRS0143	18,12	1,73	14,56		0,49	0,91	0,15	0,28
2011/12	Córdoba	2	3	Grelos	BRS0143	15,50	1,22	11,25		0,26	0,48	0,14	2,15
2011/12	Córdoba	2	3	Grelos	BRS0143	31,51	0,55	29,62		0,22	0,42	0,03	0,67
2011/12	Córdoba	2	3	Grelos	BRS0143	26,89	2,55	22,23		0,44	1,38	0,15	0,14
					Media	27,37	2,44	21,99	0,82	0,31	0,99	0,15	0,81
					Mínimo	15,50	0,55	11,25	0,16	0,09	0,29	0,03	0,14
					Máximo	36,73	5,68	30,09	3,63	0,74	2,00	0,51	3,86
					Desviación estándar	6,14	1,25	5,74	0,78	0,16	0,43	0,12	0,75

Tabla III.10. Contenido de componentes inorgánicos en nabizas de Pontevedra temporada 2009/10

Temporada	Origen	Siembra	Bloque	Parte de la planta	Identificación	Componentes inorgánicos								
						Na (mg/g)	K (mg/g)	Mg (mg/g)	Ca (mg/g)	P (mg/g)	Fe (µg/g)	Mn (µg/g)	Cu (µg/g)	Zn (µg/g)
2009/10	Pontevedra	1	4	Nabizas	BRS0082	0,61	32,23	2,17	8,25	9,94	287,65	28,71	10,47	78,59
2009/10	Pontevedra	1	1	Nabizas	BRS0143	0,48	30,71	1,68	10,25	7,88	132,43	25,39	8,22	75,91
2009/10	Pontevedra	1	2	Nabizas	BRS0163	0,47	32,55	2,21	7,14	8,59	174,69	27,03	9,47	78,05
2009/10	Pontevedra	1	5	Nabizas	BRS0401	0,59	30,28	1,70	13,91	5,72	315,96	25,75	5,90	68,62
2009/10	Pontevedra	1	3	Nabizas	BRS0472	0,98	34,35	1,88	7,18	8,81	139,42	25,77	9,69	70,78
2009/10	Pontevedra	2	3	Nabizas	BRS0082	0,58	36,35	2,50	12,67	8,54	162,85	23,77	8,52	57,47
2009/10	Pontevedra	2	1	Nabizas	BRS0143	0,68	29,11	2,10	8,34	8,67	140,65	22,28	8,95	71,86
2009/10	Pontevedra	2	5	Nabizas	BRS0163	0,90	34,89	2,02	7,28	9,59	335,20	28,81	7,46	72,59
2009/10	Pontevedra	2	2	Nabizas	BRS0401	0,46	32,49	1,84	13,52	8,17	149,93	23,86	8,13	65,71
2009/10	Pontevedra	2	4	Nabizas	BRS0472	0,66	36,38	2,40	14,69	7,05	363,48	26,16	8,94	71,48
2009/10	Pontevedra	3	5	Nabizas	BRS0082	0,61	37,59	2,04	6,03	9,87	304,91	24,88	8,22	73,32
2009/10	Pontevedra	3	2	Nabizas	BRS0143	0,67	33,35	1,98	10,82	9,34	401,27	24,84	7,01	83,05
2009/10	Pontevedra	3	3	Nabizas	BRS0163	0,72	32,71	1,87	10,66	7,73	242,08	28,22	7,36	68,29
2009/10	Pontevedra	3	1	Nabizas	BRS0401	0,53	33,13	1,81	10,84	7,47	323,02	23,11	6,40	71,57
2009/10	Pontevedra	3	4	Nabizas	BRS0472	0,57	34,34	1,88	6,36	9,70	313,62	25,19	7,71	63,00
Media						0,63	33,36	2,01	9,86	8,47	252,48	25,59	8,16	71,35
Mínimo						0,46	29,11	1,68	6,03	5,72	132,43	22,28	5,90	57,47
Máximo						0,98	37,59	2,50	14,69	9,94	401,27	28,81	10,47	83,05
Desviación estándar						0,15	2,36	0,24	2,89	1,18	93,52	1,97	1,24	6,39

Tabla III.11. Contenido de componentes inorgánicos de grelos en Pontevedra temporada 2009/10

Temporada	Origen	Siembra	Bloque	Parte de la planta	Identificación	Componentes inorgánicos								
						Na (mg/g)	K (mg/g)	Mg (mg/g)	Ca (mg/g)	P (mg/g)	Fe (µg/g)	Mn (µg/g)	Cu (µg/g)	Zn (µg/g)
2009/10	Pontevedra	1	4	Grelos	BRS0082	0,80	32,73	2,04	9,86	7,09	170,93	23,93	11,49	70,52
2009/10	Pontevedra	1	1	Grelos	BRS0143	0,44	32,71	1,70	6,97	6,25	152,30	22,38	4,98	65,58
2009/10	Pontevedra	1	2	Grelos	BRS0163	0,81	30,71	1,44	8,05	5,68	138,22	17,58	5,32	41,83
2009/10	Pontevedra	1	5	Grelos	BRS0401	0,82	29,08	1,66	11,66	4,72	149,38	22,61	6,92	48,10
2009/10	Pontevedra	1	3	Grelos	BRS0472	0,49	30,59	1,71	7,18	6,27	489,64	28,83	7,79	71,40
2009/10	Pontevedra	2	3	Grelos	BRS0082	0,66	33,34	2,07	8,95	6,97	157,73	19,64	6,89	59,80
2009/10	Pontevedra	2	1	Grelos	BRS0143	0,37	22,34	1,86	10,39	5,28	242,40	21,47	4,68	59,68
2009/10	Pontevedra	2	5	Grelos	BRS0163	0,91	31,31	1,84	9,68	6,66	204,68	22,68	0,53	59,30
2009/10	Pontevedra	2	2	Grelos	BRS0401	0,84	28,84	1,44	10,46	4,70	143,34	18,37	4,70	38,78
2009/10	Pontevedra	2	4	Grelos	BRS0472	0,55	36,16	1,85	10,07	5,75	148,91	16,76	3,74	60,26
2009/10	Pontevedra	3	5	Grelos	BRS0082	0,35	32,20	1,90	8,72	4,50	159,91	17,38	6,60	68,77
2009/10	Pontevedra	3	2	Grelos	BRS0143	0,47	30,82	1,89	10,67	6,04	207,46	19,52	5,66	49,99
2009/10	Pontevedra	3	3	Grelos	BRS0163	0,54	26,50	1,71	5,98	6,81	216,99	19,49	6,16	54,44
2009/10	Pontevedra	3	1	Grelos	BRS0401	1,00	34,87	2,00	11,46	4,90	168,63	16,22	5,72	53,14
2009/10	Pontevedra	3	4	Grelos	BRS0472	0,91	37,02	1,65	9,50	6,50	249,85	22,46	4,35	63,96
					Media	0,66	31,28	1,78	9,31	5,88	200,02	20,62	5,70	57,70
					Mínimo	0,35	22,34	1,44	5,98	4,50	138,22	16,22	0,53	38,78
					Máximo	1,00	37,02	2,07	11,66	7,09	489,64	28,83	11,49	71,40
					Desviación estándar	0,22	3,72	0,19	1,66	0,88	87,93	3,34	2,34	9,95

Tabla III.12. Contenido de componentes inorgánicos en nabizas de La Palma temporada 2009/10

Temporada	Origen	Siembra	Bloque	Parte de la planta	Identificación	Componentes inorgánicos								
						Na (mg/g)	K (mg/g)	Mg (mg/g)	Ca (mg/g)	P (mg/g)	Fe (µg/g)	Mn (µg/g)	Cu (µg/g)	Zn (µg/g)
2009/10	La Palma	1	1	Nabizas	BRS0082	3,96	35,26	2,46	20,48	2,25	373,08	34,06	9,41	45,62
2009/10	La Palma	1	2	Nabizas	BRS0082	5,23	35,89	2,91	17,80	1,11	851,91	49,66	10,91	48,61
2009/10	La Palma	1	3	Nabizas	BRS0082	5,90	36,70	3,05	21,23	4,32	1309,61	65,93	11,04	46,84
2009/10	La Palma	1	1	Nabizas	BRS0143	5,03	39,00	2,53	19,54	1,55	554,81	45,33	8,92	44,03
2009/10	La Palma	1	2	Nabizas	BRS0143	6,10	47,03	2,54	20,19	2,64	790,74	48,96	10,17	49,46
2009/10	La Palma	1	3	Nabizas	BRS0143	6,95	36,04	4,09	34,11	3,89	597,79	47,88	10,13	43,26
2009/10	La Palma	1	1	Nabizas	BRS0163	7,35	38,73	2,58	18,66	0,68	332,88	33,63	9,44	43,38
2009/10	La Palma	1	2	Nabizas	BRS0163	7,40	38,94	3,43	26,42	3,60	1489,28	75,57	11,48	42,16
2009/10	La Palma	1	3	Nabizas	BRS0163	5,88	36,38	2,63	18,37	4,66	562,92	50,41	11,18	43,34
2009/10	La Palma	1	1	Nabizas	BRS0401	3,77	36,98	2,30	23,00	0,75	720,88	46,81	9,65	47,23
2009/10	La Palma	1	2	Nabizas	BRS0401	6,27	37,58	2,84	28,74	0,81	916,81	53,33	10,67	41,74
2009/10	La Palma	1	3	Nabizas	BRS0401	5,85	36,76	2,37	11,61	4,29	350,45	39,54	10,47	48,85
2009/10	La Palma	1	1	Nabizas	BRS0472	5,73	34,78	2,61	22,69	1,23	622,24	45,44	9,03	46,91
2009/10	La Palma	1	2	Nabizas	BRS0472	5,68	35,79	3,13	22,81	2,38	1278,43	69,07	10,65	52,49
2009/10	La Palma	1	3	Nabizas	BRS0472	8,43	39,14	2,96	30,02	3,25	528,75	45,59	9,38	38,98
2009/10	La Palma	2	1	Nabizas	BRS0082	3,66	38,91	2,59	18,96	3,56	658,87	40,63	9,47	41,86
2009/10	La Palma	2	2	Nabizas	BRS0082	4,00	36,59	2,38	17,56	3,37	417,27	39,10	9,50	40,46
2009/10	La Palma	2	3	Nabizas	BRS0082	5,69	43,56	2,10	16,81	3,27	1649,76	70,01	11,14	47,60
2009/10	La Palma	2	1	Nabizas	BRS0143	3,65	37,38	3,46	30,90	1,64	1139,24	62,25	10,67	42,14
2009/10	La Palma	2	2	Nabizas	BRS0143	6,50	44,91	3,45	30,14	2,02	2381,36	93,65	9,44	34,78
2009/10	La Palma	2	3	Nabizas	BRS0143	1,89	38,62	2,41	21,45	3,22	990,00	89,06	11,44	40,97

Temporada	Origen	Siembra	Bloque	Parte de la planta	Identificación	Componentes inorgánicos								
						Na (mg/g)	K (mg/g)	Mg (mg/g)	Ca (mg/g)	P (mg/g)	Fe (µg/g)	Mn (µg/g)	Cu (µg/g)	Zn (µg/g)
2009/10	La Palma	2	1	Nabizas	BRS0163	3,24	40,40	2,21	19,52	2,51	690,06	45,92	8,63	41,97
2009/10	La Palma	2	2	Nabizas	BRS0163	4,68	46,53	2,07	27,22	2,49	435,82	41,79	10,91	46,97
2009/10	La Palma	2	3	Nabizas	BRS0163	5,32	34,01	2,53	21,10	3,94	911,38	54,59	9,98	43,20
2009/10	La Palma	2	1	Nabizas	BRS0401	4,69	38,96	3,00	27,08	2,43	759,61	43,34	7,60	40,55
2009/10	La Palma	2	2	Nabizas	BRS0401	1,91	43,79	1,97	19,97	1,84	924,61	51,10	8,50	43,49
2009/10	La Palma	2	3	Nabizas	BRS0401	3,04	44,51	2,79	20,41	2,82	406,60	39,00	10,12	40,66
2009/10	La Palma	2	1	Nabizas	BRS0472	5,22	44,06	2,25	19,85	2,80	779,03	52,10	9,58	43,28
2009/10	La Palma	2	2	Nabizas	BRS0472	4,46	40,86	2,17	18,22	4,30	432,57	37,05	8,40	40,37
2009/10	La Palma	2	3	Nabizas	BRS0472	3,29	44,23	2,12	19,28	3,01	955,71	54,70	9,62	48,22
2009/10	La Palma	3	1	Nabizas	BRS0082	2,20	43,71	3,69	23,97	1,62	756,52	53,45	7,30	42,13
2009/10	La Palma	3	2	Nabizas	BRS0082	2,22	38,04	3,27	22,89	1,94	980,42	62,01	9,03	40,48
2009/10	La Palma	3	3	Nabizas	BRS0082	2,07	38,67	3,98	21,69	2,50	1374,68	73,89	10,27	43,60
2009/10	La Palma	3	1	Nabizas	BRS0143	1,93	43,38	3,72	22,82	2,06	755,19	54,62	7,86	43,56
2009/10	La Palma	3	2	Nabizas	BRS0143	1,89	42,96	3,30	25,64	2,82	645,71	52,82	8,75	46,30
2009/10	La Palma	3	3	Nabizas	BRS0143	2,33	44,66	3,32	19,79	3,58	606,75	48,52	9,45	39,85
2009/10	La Palma	3	1	Nabizas	BRS0163	2,22	46,77	3,09	20,58	3,35	535,18	46,28	7,89	41,50
2009/10	La Palma	3	2	Nabizas	BRS0163	2,96	42,63	2,65	21,97	3,00	637,15	50,24	10,24	49,70
2009/10	La Palma	3	3	Nabizas	BRS0163	2,07	41,37	2,91	22,76	2,41	833,15	60,05	9,07	45,34
2009/10	La Palma	3	1	Nabizas	BRS0401	2,07	34,58	3,59	25,05	1,19	471,51	37,09	7,14	44,99
2009/10	La Palma	3	2	Nabizas	BRS0401	2,57	38,36	3,70	25,60	2,23	587,09	47,02	8,07	42,94
2009/10	La Palma	3	3	Nabizas	BRS0401	2,86	36,20	5,04	31,42	2,60	625,97	51,13	8,37	44,39
2009/10	La Palma	3	1	Nabizas	BRS0472	2,03	38,54	3,68	22,26	2,81	600,13	48,99	8,19	44,47

Temporada	Origen	Siembra	Bloque	Parte de la planta	Identificación	Componentes inorgánicos								
						Na (mg/g)	K (mg/g)	Mg (mg/g)	Ca (mg/g)	P (mg/g)	Fe (µg/g)	Mn (µg/g)	Cu (µg/g)	Zn (µg/g)
2009/10	La Palma	3	2	Nabizas	BRS0472	2,46	40,66	3,28	23,14	1,74	756,63	61,92	7,91	46,31
2009/10	La Palma	3	3	Nabizas	BRS0472	2,64	41,01	3,86	24,43	3,67	900,53	60,90	9,34	44,81
					Media	4,12	39,86	2,96	22,63	2,63	797,31	52,76	9,48	44,00
					Mínimo	1,89	34,01	1,97	11,61	0,68	332,88	33,63	7,14	34,78
					Máximo	8,43	47,03	5,04	34,11	4,66	2381,36	93,65	11,48	52,49
					Desviación estándar	1,84	3,62	0,66	4,42	1,02	388,50	13,15	1,15	3,35

Tabla III.13. Contenido de componentes inorgánicos en grelos de La Palma temporada 2009/10

Temporada	Origen	Siembra	Bloque	Parte de la planta	Identificación	Componentes inorgánicos								
						Na (mg/g)	K (mg/g)	Mg (mg/g)	Ca (mg/g)	P (mg/g)	Fe (µg/g)	Mn (µg/g)	Cu (µg/g)	Zn (µg/g)
2009/10	La Palma	1	1	Grelos	BRS0082	2,80	35,87	2,24	7,08	6,11	233,64	27,44	7,51	58,24
2009/10	La Palma	1	2	Grelos	BRS0082	3,44	39,33	3,15	8,64	6,36	245,27	25,37	7,28	61,54
2009/10	La Palma	1	3	Grelos	BRS0082	3,79	34,64	2,33	7,36	5,25	211,87	20,48	7,15	50,22
2009/10	La Palma	1	1	Grelos	BRS0143	4,76	34,14	2,50	10,66	4,57	289,27	31,17	5,57	46,96
2009/10	La Palma	1	2	Grelos	BRS0143	7,79	36,86	2,58	12,47	4,50	324,03	28,57	3,77	33,39
2009/10	La Palma	1	3	Grelos	BRS0143	5,63	36,88	2,58	13,18	4,81	295,50	30,90	5,54	36,31
2009/10	La Palma	1	1	Grelos	BRS0163	4,55	36,38	2,65	7,82	6,76	303,43	27,86	5,37	60,22
2009/10	La Palma	1	2	Grelos	BRS0163	4,49	29,45	2,05	6,11	4,99	429,20	26,54	5,08	46,05
2009/10	La Palma	1	3	Grelos	BRS0163	8,60	46,27	2,88	11,07	6,43	548,13	44,13	5,33	59,87

Temporada	Origen	Siembra	Bloque	Parte de la planta	Identificación	Componentes inorgánicos									
						Na (mg/g)	K (mg/g)	Mg (mg/g)	Ca (mg/g)	P (mg/g)	Fe (µg/g)	Mn (µg/g)	Cu (µg/g)	Zn (µg/g)	
2009/10	La Palma	1	1	Grellos	BRS0401	2,96	33,38	2,03	7,81	4,98	259,45	22,32	6,44	46,04	
2009/10	La Palma	1	2	Grellos	BRS0401	4,70	34,26	2,75	10,52	5,61	223,80	20,54	5,08	46,02	
2009/10	La Palma	1	3	Grellos	BRS0401	3,70	31,48	2,11	8,56	5,27	499,23	35,13	5,79	53,79	
2009/10	La Palma	1	1	Grellos	BRS0472	1,92	36,13	2,02	8,31	3,29	166,04	17,57	4,99	43,59	
2009/10	La Palma	1	2	Grellos	BRS0472	2,31	33,11	2,67	6,60	5,22	303,67	32,56	7,28	64,96	
2009/10	La Palma	1	3	Grellos	BRS0472	2,79	40,44	2,81	8,64	6,74	341,06	34,70	7,19	59,71	
2009/10	La Palma	2	1	Grellos	BRS0082	3,80	37,25	2,00	8,38	2,95	229,83	22,36	5,22	50,68	
2009/10	La Palma	2	2	Grellos	BRS0082	3,36	43,53	2,24	9,28	5,11	328,01	29,26	8,70	60,86	
2009/10	La Palma	2	3	Grellos	BRS0082	2,92	33,30	1,92	5,82	5,23	290,69	26,33	7,91	63,61	
2009/10	La Palma	2	1	Grellos	BRS0143	3,87	41,58	2,14	12,55	3,37	1708,08	63,82	5,86	44,07	
2009/10	La Palma	2	2	Grellos	BRS0143	4,75	38,66	2,02	12,90	2,87	1686,83	67,27	7,27	40,00	
2009/10	La Palma	2	3	Grellos	BRS0143	1,08	46,41	2,23	16,84	3,25	1726,88	65,75	7,99	39,16	
2009/10	La Palma	2	1	Grellos	BRS0163	3,68	39,76	2,58	9,82	5,30	292,82	26,19	5,72	53,26	
2009/10	La Palma	2	2	Grellos	BRS0163	3,47	37,70	2,38	11,95	5,42	325,63	26,04	5,10	39,56	
2009/10	La Palma	2	3	Grellos	BRS0163	3,30	32,77	2,82	9,75	5,86	1895,23	74,19	8,23	62,70	
2009/10	La Palma	2	1	Grellos	BRS0401	2,92	37,28	2,17	7,98	5,41	517,77	40,97	7,57	62,04	
2009/10	La Palma	2	2	Grellos	BRS0401	4,80	31,60	2,34	14,02	3,36	327,06	28,12	5,45	56,00	
2009/10	La Palma	2	3	Grellos	BRS0401	5,14	33,23	2,12	12,48	4,50	309,33	26,19	4,14	46,45	
2009/10	La Palma	2	1	Grellos	BRS0472	1,93	34,83	2,26	10,77	5,40	570,65	45,52	10,22	74,79	
2009/10	La Palma	2	2	Grellos	BRS0472	2,12	35,67	2,47	7,89	5,53	275,91	28,52	7,83	64,37	
2009/10	La Palma	2	3	Grellos	BRS0472	3,30	37,29	2,53	7,59	6,06	336,23	31,20	8,48	63,72	
						Media	3,82	36,65	2,39	9,76	5,02	516,48	34,23	6,50	52,94
						Mínimo	1,08	29,45	1,92	5,82	2,87	166,04	17,57	3,77	33,39

Temporada	Origen	Siembra	Bloque	Parte de la planta	Identificación	Componentes inorgánicos								
						Na (mg/g)	K (mg/g)	Mg (mg/g)	Ca (mg/g)	P (mg/g)	Fe (µg/g)	Mn (µg/g)	Cu (µg/g)	Zn (µg/g)
					Máximo	8,60	46,41	3,15	16,84	6,76	1895,23	74,19	10,22	74,79
					Desviación estándar	1,59	4,08	0,31	2,63	1,11	504,18	14,87	1,51	10,30

Tabla III.14. Contenido de componentes inorgánicos en nabizas de Córdoba temporada 2009/10

Temporada	Origen	Siembra	Bloque	Parte de la planta	Identificación	Componentes inorgánicos								
						Na (mg/g)	K (mg/g)	Mg (mg/g)	Ca (mg/g)	P (mg/g)	Fe (µg/g)	Mn (µg/g)	Cu (µg/g)	Zn (µg/g)
2009/10	Córdoba	1	1	Nabizas	BRS0082	0,31	20,15	1,40	7,35	4,35	129,33	25,55	5,82	36,27
2009/10	Córdoba	1	2	Nabizas	BRS0082	0,26	22,62	1,46	11,72	4,56	272,92	28,45	6,18	36,36
2009/10	Córdoba	1	3	Nabizas	BRS0082	0,28	17,30	1,32	8,53	4,38	102,91	28,69	5,91	25,58
2009/10	Córdoba	1	1	Nabizas	BRS0143	0,42	26,40	1,98	28,57	2,35	177,12	72,18	6,86	27,19
2009/10	Córdoba	1	2	Nabizas	BRS0143	0,27	27,41	1,74	33,25	2,88	192,25	73,60	8,00	29,91
2009/10	Córdoba	1	3	Nabizas	BRS0143	0,22	24,80	1,70	28,61	2,49	290,77	77,52	8,08	28,54
2009/10	Córdoba	1	1	Nabizas	BRS0163	0,31	21,84	1,20	10,34	3,89	76,07	26,84	8,87	35,64
2009/10	Córdoba	1	2	Nabizas	BRS0163	0,44	17,33	1,61	12,64	3,29	226,98	32,45	7,90	34,60
2009/10	Córdoba	1	3	Nabizas	BRS0163	0,24	18,17	1,30	10,04	3,50	100,68	34,87	8,02	38,18
2009/10	Córdoba	1	1	Nabizas	BRS0401	0,26	23,80	1,38	15,17	2,78	122,44	38,13	5,91	27,83
2009/10	Córdoba	1	2	Nabizas	BRS0401	0,22	20,40	1,73	16,17	2,72	252,80	36,90	6,87	32,99
2009/10	Córdoba	1	3	Nabizas	BRS0401	0,25	21,12	1,28	12,75	4,07	95,07	30,21	6,73	32,76
2009/10	Córdoba	1	1	Nabizas	BRS0472	0,28	23,65	1,34	10,27	4,09	152,43	32,54	7,31	37,55

Temporada	Origen	Siembra	Bloque	Parte de la planta	Identificación	Componentes inorgánicos								
						Na (mg/g)	K (mg/g)	Mg (mg/g)	Ca (mg/g)	P (mg/g)	Fe (µg/g)	Mn (µg/g)	Cu (µg/g)	Zn (µg/g)
2009/10	Córdoba	1	2	Nabizas	BRS0472	0,25	19,97	1,23	9,27	3,97	80,66	27,34	6,49	33,36
2009/10	Córdoba	1	3	Nabizas	BRS0472	0,24	22,97	1,29	10,26	3,97	215,83	30,68	6,96	35,73
2009/10	Córdoba	3	1	Nabizas	BRS0082	1,09	29,56	2,10	15,13	3,76	210,43	36,14	9,03	43,99
2009/10	Córdoba	3	2	Nabizas	BRS0082	0,87	29,35	2,59	20,28	3,70	134,23	51,70	9,26	42,45
2009/10	Córdoba	3	3	Nabizas	BRS0082	0,58	24,90	2,04	14,47	4,05	113,50	33,86	9,04	54,35
2009/10	Córdoba	3	1	Nabizas	BRS0143	1,12	33,35	2,27	19,67	2,32	168,93	65,39	6,60	27,92
2009/10	Córdoba	3	2	Nabizas	BRS0143	0,74	29,53	2,44	20,04	2,80	148,21	56,72	8,16	36,71
2009/10	Córdoba	3	3	Nabizas	BRS0143	0,57	27,71	1,93	17,12	2,84	155,40	52,65	7,76	40,96
2009/10	Córdoba	3	1	Nabizas	BRS0163	0,71	28,54	2,30	19,54	3,64	120,96	50,89	7,39	44,03
2009/10	Córdoba	3	2	Nabizas	BRS0163	0,51	23,06	1,86	15,81	3,47	92,37	39,53	8,03	37,93
2009/10	Córdoba	3	3	Nabizas	BRS0163	0,80	32,00	2,04	19,14	3,75	110,68	50,43	7,81	44,73
2009/10	Córdoba	3	1	Nabizas	BRS0401	0,64	27,94	2,04	16,25	3,11	172,89	59,97	8,76	41,41
2009/10	Córdoba	3	2	Nabizas	BRS0401	0,59	31,03	2,35	18,45	4,08	185,81	47,51	8,77	52,56
2009/10	Córdoba	3	3	Nabizas	BRS0401	0,70	27,95	2,47	21,70	2,93	118,66	43,54	6,85	40,88
2009/10	Córdoba	3	1	Nabizas	BRS0472	0,99	26,08	2,43	20,92	2,83	264,41	43,17	7,87	35,51
2009/10	Córdoba	3	2	Nabizas	BRS0472	0,50	18,46	1,23	9,12	2,04	135,91	31,85	7,25	27,52
2009/10	Córdoba	3	3	Nabizas	BRS0472	0,83	30,11	1,88	14,35	3,90	126,79	50,95	8,38	43,16
					Media	0,52	24,92	1,80	16,23	3,42	158,25	43,68	7,56	36,89
					Mínimo	0,22	17,30	1,20	7,35	2,04	76,07	25,55	5,82	25,58
					Máximo	1,12	33,35	2,59	33,25	4,56	290,77	77,52	9,26	54,35
					Desviación estándar	0,28	4,57	0,44	6,30	0,69	59,69	14,94	1,00	7,16

Tabla III.15. Contenido de componentes inorgánicos en nabizas de Córdoba temporada 2010/11

Temporada	Origen	Siembra	Bloque	Parte de la planta	Identificación	Componentes inorgánicos								
						Na (mg/g)	K (mg/g)	Mg (mg/g)	Ca (mg/g)	P (mg/g)	Fe (µg/g)	Mn (µg/g)	Cu (µg/g)	Zn (µg/g)
2010/11	Córdoba	1	1	Nabizas	BRS0082	0,47	30,27	1,37	6,70	6,56	123,66	21,58	8,88	42,20
2010/11	Córdoba	1	2	Nabizas	BRS0082	0,59	31,07	1,64	8,55	6,67	159,51	25,77	8,34	52,22
2010/11	Córdoba	1	3	Nabizas	BRS0082	0,42	27,89	1,49	8,45	5,90	164,52	23,01	8,46	52,28
2010/11	Córdoba	1	1	Nabizas	BRS0143	0,63	32,75	1,21	7,58	4,52	98,46	19,75	5,97	38,37
2010/11	Córdoba	1	2	Nabizas	BRS0143	0,77	32,50	1,13	9,96	4,41	249,88	27,63	7,06	40,27
2010/11	Córdoba	1	3	Nabizas	BRS0143	0,63	29,89	1,08	11,06	3,79	105,81	31,90	5,53	34,56
2010/11	Córdoba	1	1	Nabizas	BRS0163	0,41	28,94	1,39	7,09	8,11	175,82	29,86	9,07	47,28
2010/11	Córdoba	1	2	Nabizas	BRS0163	0,75	25,35	1,39	11,24	4,53	190,88	30,94	7,88	34,17
2010/11	Córdoba	1	3	Nabizas	BRS0163	0,58	30,37	1,30	8,61	5,98	173,09	25,45	6,99	31,92
2010/11	Córdoba	1	1	Nabizas	BRS0401	0,50	27,05	1,30	10,25	4,66	186,74	19,71	7,65	37,84
2010/11	Córdoba	1	2	Nabizas	BRS0401	0,98	29,15	1,48	11,16	5,47	236,12	28,10	8,10	39,66
2010/11	Córdoba	1	3	Nabizas	BRS0401	0,64	26,35	1,24	13,15	4,58	340,36	26,35	6,59	31,42
2010/11	Córdoba	1	1	Nabizas	BRS0472	0,68	27,42	1,28	8,16	5,06	140,37	21,07	7,45	31,33
2010/11	Córdoba	1	2	Nabizas	BRS0472	0,91	29,42	1,36	9,95	5,60	185,69	22,60	7,42	37,16
2010/11	Córdoba	1	3	Nabizas	BRS0472	0,52	33,36	1,45	9,80	6,10	215,67	23,61	8,82	45,50
2010/11	Córdoba	2	1	Nabizas	BRS0082	0,18	21,03	1,03	6,90	4,13	95,93	16,53	6,78	34,85
2010/11	Córdoba	2	2	Nabizas	BRS0082	0,20	20,40	1,31	11,27	4,11	102,64	14,14	7,40	39,50
2010/11	Córdoba	2	3	Nabizas	BRS0082	0,25	21,67	1,36	11,48	4,39	102,00	16,60	5,47	24,14
2010/11	Córdoba	2	1	Nabizas	BRS0143	0,27	22,17	1,15	21,05	3,96	153,15	42,25	6,07	14,40
2010/11	Córdoba	2	2	Nabizas	BRS0143	0,36	24,04	1,49	39,54	3,05	148,62	43,98	5,28	25,75
2010/11	Córdoba	2	3	Nabizas	BRS0143	1,12	20,38	2,07	31,86	2,59	154,84	59,08	5,38	27,68

Temporada	Origen	Siembra	Bloque	Parte de la planta	Identificación	Componentes inorgánicos								
						Na (mg/g)	K (mg/g)	Mg (mg/g)	Ca (mg/g)	P (mg/g)	Fe (µg/g)	Mn (µg/g)	Cu (µg/g)	Zn (µg/g)
2010/11	Córdoba	2	1	Nabizas	BRS0163	0,84	23,46	0,93	13,55	2,87	113,67	30,91	5,23	22,25
2010/11	Córdoba	2	2	Nabizas	BRS0163	0,20	22,87	1,72	19,34	2,50	106,24	21,36	4,90	20,84
2010/11	Córdoba	2	3	Nabizas	BRS0163	0,55	24,46	1,69	20,87	2,52	99,98	38,93	5,09	29,70
2010/11	Córdoba	2	1	Nabizas	BRS0401	0,45	23,47	1,43	21,06	2,26	155,95	32,87	5,34	28,99
2010/11	Córdoba	2	2	Nabizas	BRS0401	0,31	21,57	1,48	30,41	2,58	118,12	26,16	4,61	20,06
2010/11	Córdoba	2	3	Nabizas	BRS0401	0,63	15,62	0,90	14,35	2,64	121,16	38,06	5,28	16,16
2010/11	Córdoba	2	1	Nabizas	BRS0472	0,19	24,14	0,84	10,50	6,11	64,49	22,27	4,61	21,84
2010/11	Córdoba	2	2	Nabizas	BRS0472	0,13	21,45	0,78	11,86	2,89	57,17	25,83	4,55	21,27
2010/11	Córdoba	2	3	Nabizas	BRS0472	0,19	25,72	1,04	13,52	3,44	71,58	21,87	4,60	20,01
					Media	0,51	25,81	1,31	13,98	4,40	147,07	27,61	6,49	32,12
					Mínimo	0,13	15,62	0,78	6,70	2,26	57,17	14,14	4,55	14,40
					Máximo	1,12	33,36	2,07	39,54	8,11	340,36	59,08	9,07	52,28
					Desviación estándar	0,26	4,39	0,28	7,99	1,52	60,48	9,45	1,47	10,28

Tabla III.16. Contenido de componentes inorgánicos en grelos de Córdoba temporada 2010/11

Temporada	Origen	Siembra	Bloque	Parte de la planta	Identificación	Componentes inorgánicos								
						Na (mg/g)	K (mg/g)	Mg (mg/g)	Ca (mg/g)	P (mg/g)	Fe (µg/g)	Mn (µg/g)	Cu (µg/g)	Zn (µg/g)
2010/11	Córdoba	1	1	Grelos	BRS0143	0,29	30,40	1,01	10,06	4,31	74,10	11,87	4,92	30,30
2010/11	Córdoba	1	2	Grelos	BRS0143	0,25	31,04	0,98	9,68	4,70	95,88	10,34	4,08	22,74
2010/11	Córdoba	1	2	Grelos	BRS0143	0,26	25,96	0,90	8,98	3,01	47,32	7,43	4,23	17,17

Temporada	Origen	Siembra	Bloque	Parte de la planta	Identificación	Componentes inorgánicos								
						Na (mg/g)	K (mg/g)	Mg (mg/g)	Ca (mg/g)	P (mg/g)	Fe (µg/g)	Mn (µg/g)	Cu (µg/g)	Zn (µg/g)
2010/11	Córdoba	1	2	Grelos	BRS0143	0,26	32,39	0,83	8,33	3,61	66,24	8,70	4,84	25,33
2010/11	Córdoba	1	3	Grelos	BRS0143	0,27	28,72	1,16	7,93	4,49	95,32	11,65	7,02	25,35
2010/11	Córdoba	1	3	Grelos	BRS0143	0,25	25,73	1,18	13,34	3,42	68,12	3,34	4,31	29,73
2010/11	Córdoba	1	3	Grelos	BRS0143	0,24	26,69	1,14	11,29	4,01	74,16	14,08	4,51	24,18
2010/11	Córdoba	1	1	Grelos	BRS0472	0,69	25,18	1,38	14,44	3,24	80,99	21,77	6,06	21,21
2010/11	Córdoba	1	2	Grelos	BRS0472	0,57	26,50	1,80	18,08	2,74	171,58	16,89	5,47	25,47
2010/11	Córdoba	1	3	Grelos	BRS0472	0,28	29,21	1,41	13,00	4,07	66,58	10,69	7,04	34,55
2010/11	Córdoba	1	3	Grelos	BRS0472	0,24	28,45	1,42	14,18	3,93	116,82	18,61	8,08	24,36
2010/11	Córdoba	2	1	Grelos	BRS0143	0,22	25,32	0,80	5,76	4,07	99,50	20,45	3,97	20,24
2010/11	Córdoba	2	2	Grelos	BRS0143	0,30	26,28	0,76	5,15	4,16	52,41	12,90	3,32	17,64
2010/11	Córdoba	2	2	Grelos	BRS0143	0,35	29,17	1,23	15,26	4,06	75,70	23,01	3,80	15,78
2010/11	Córdoba	2	2	Grelos	BRS0143	0,41	30,55	0,98	7,02	4,84	68,42	18,22	3,70	14,60
2010/11	Córdoba	2	3	Grelos	BRS0143	0,18	24,21	0,94	6,47	3,78	65,70	16,23	4,35	21,13
Media						0,32	27,86	1,12	10,56	3,90	82,43	14,14	4,98	23,11
Mínimo						0,18	24,21	0,76	5,15	2,74	47,32	3,34	3,32	14,60
Máximo						0,69	32,39	1,80	18,08	4,84	171,58	23,01	8,08	34,55
Desviación estándar						0,14	2,45	0,28	3,81	0,58	29,76	5,51	1,38	5,49

Tabla III.17. Contenido de componentes inorgánicos en nabizas de Córdoba temporada 2011/12

Temporada	Origen	Siembra	Bloque	Parte de la planta	Identificación	Componentes inorgánicos								
						Na (mg/g)	K (mg/g)	Mg (mg/g)	Ca (mg/g)	P (mg/g)	Fe (µg/g)	Mn (µg/g)	Cu (µg/g)	Zn (µg/g)
2011/12	Córdoba	1	1	Nabizas	BRS0082	0,51	20,69	1,82	9,01	7,17	312,00	32,85	12,28	44,93
2011/12	Córdoba	1	2	Nabizas	BRS0082	0,41	30,38	2,57	16,77	7,84	821,57	57,52	10,16	43,17
2011/12	Córdoba	1	3	Nabizas	BRS0082	0,58	21,65	1,83	8,18	10,49	217,26	36,44	9,63	42,69
2011/12	Córdoba	1	1	Nabizas	BRS0143	0,89	26,56	2,00	15,64	8,78	83,10	49,15	4,92	25,04
2011/12	Córdoba	1	2	Nabizas	BRS0143	0,27	24,61	1,99	10,32	7,00	179,08	36,80	8,08	36,07
2011/12	Córdoba	1	3	Nabizas	BRS0143	0,70	23,90	1,96	12,74	6,25	95,99	39,02	7,50	33,50
2011/12	Córdoba	1	1	Nabizas	BRS0163	0,34	17,56	2,59	20,83	11,93	935,71	60,15	8,87	31,68
2011/12	Córdoba	1	2	Nabizas	BRS0163	0,56	20,80	2,03	13,68	9,03	529,56	48,35	9,34	41,25
2011/12	Córdoba	1	3	Nabizas	BRS0163	0,37	21,16	1,73	11,26	8,77	156,97	38,51	10,01	37,43
2011/12	Córdoba	1	1	Nabizas	BRS0401	0,26	22,26	1,33	9,90	8,50	236,51	31,95	9,68	34,31
2011/12	Córdoba	1	2	Nabizas	BRS0401	0,51	29,56	1,73	18,47	7,59	324,15	43,45	7,32	30,20
2011/12	Córdoba	1	3	Nabizas	BRS0401	0,34	27,16	1,68	14,32	7,57	443,90	41,15	9,95	32,78
2011/12	Córdoba	1	1	Nabizas	BRS0472	0,33	32,97	1,34	13,44	7,50	139,55	34,50	7,52	26,86
2011/12	Córdoba	1	2	Nabizas	BRS0472	0,29	32,35	1,66	12,67	8,58	168,97	36,26	9,11	37,84
2011/12	Córdoba	1	3	Nabizas	BRS0472	0,75	28,89	1,81	16,28	6,48	172,52	41,88	6,84	58,67
2011/12	Córdoba	2	1	Nabizas	BRS0082	0,12	15,31	0,91	6,97	5,69	87,43	23,33	7,60	39,89
2011/12	Córdoba	2	2	Nabizas	BRS0082	0,15	17,96	1,11	5,55	7,42	88,62	20,84	6,33	42,38
2011/12	Córdoba	2	3	Nabizas	BRS0082	0,19	18,28	1,07	6,79	9,60	105,52	25,45	7,41	36,87
2011/12	Córdoba	2	1	Nabizas	BRS0143	0,14	17,80	0,70	7,05	5,60	75,04	25,57	4,44	22,03
2011/12	Córdoba	2	2	Nabizas	BRS0143	0,18	18,60	0,75	5,77	5,45	81,12	29,51	5,00	25,81
2011/12	Córdoba	2	3	Nabizas	BRS0143	0,31	17,96	0,85	6,50	6,14	66,33	27,61	5,92	23,39

Temporada	Origen	Siembra	Bloque	Parte de la planta	Identificación	Componentes inorgánicos								
						Na (mg/g)	K (mg/g)	Mg (mg/g)	Ca (mg/g)	P (mg/g)	Fe (µg/g)	Mn (µg/g)	Cu (µg/g)	Zn (µg/g)
2011/12	Córdoba	2	1	Nabizas	BRS0163	0,16	14,46	0,99	6,95	5,83	92,39	27,55	5,81	35,45
2011/12	Córdoba	2	2	Nabizas	BRS0163	0,18	15,79	1,14	5,64	5,57	94,08	31,76	7,33	38,02
2011/12	Córdoba	2	3	Nabizas	BRS0163	0,25	19,15	0,80	6,30	6,71	91,18	31,95	7,68	41,78
2011/12	Córdoba	2	1	Nabizas	BRS0401	0,10	9,23	0,82	9,17	4,67	194,18	34,61	3,23	26,25
2011/12	Córdoba	2	2	Nabizas	BRS0401	0,14	15,04	0,92	6,51	5,31	118,82	26,54	5,93	32,34
2011/12	Córdoba	2	3	Nabizas	BRS0401	0,25	18,50	1,16	8,64	4,57	125,02	28,69	6,00	27,76
2011/12	Córdoba	2	1	Nabizas	BRS0472	0,25	16,46	1,01	7,20	6,27	87,12	26,46	6,14	34,26
2011/12	Córdoba	2	2	Nabizas	BRS0472	0,18	17,78	1,05	5,72	5,10	76,59	26,45	6,75	30,32
2011/12	Córdoba	2	3	Nabizas	BRS0472	0,20	19,97	1,02	7,15	6,87	79,81	25,85	7,38	35,91
					Media	0,33	21,09	1,41	10,18	7,14	209,34	34,67	7,47	34,96
					Mínimo	0,10	9,23	0,70	5,55	4,57	66,33	20,84	3,23	22,03
					Máximo	0,89	32,97	2,59	20,83	11,93	935,71	60,15	12,28	58,67
					Desviación estándar	0,20	5,75	0,54	4,31	1,75	213,81	9,72	1,99	7,72

Tabla III.18. Contenido de componentes inorgánicos en grelos de Córdoba temporada 2011/12

Temporada	Origen	Siembra	Bloque	Parte de la planta	Identificación	Componentes inorgánicos								
						Na (mg/g)	K (mg/g)	Mg (mg/g)	Ca (mg/g)	P (mg/g)	Fe (µg/g)	Mn (µg/g)	Cu (µg/g)	Zn (µg/g)
2011/12	Córdoba	1	1	Grelos	BRS0143	0,30	19,53	1,24	11,49	4,84	58,57	18,79	5,12	15,44
2011/12	Córdoba	1	1	Grelos	BRS0143	0,19	19,46	0,66	10,92	5,01	48,42	19,65	2,91	11,16
2011/12	Córdoba	1	1	Grelos	BRS0143	0,17	33,66	0,88	12,07	4,67	303,57	19,70	2,93	12,60

Temporada	Origen	Siembra	Bloque	Parte de la planta	Identificación	Componentes inorgánicos								
						Na (mg/g)	K (mg/g)	Mg (mg/g)	Ca (mg/g)	P (mg/g)	Fe (µg/g)	Mn (µg/g)	Cu (µg/g)	Zn (µg/g)
2011/12	Córdoba	1	2	Grelos	BRS0143	0,22	18,47	0,75	8,36	4,51	55,18	14,97	2,86	16,61
2011/12	Córdoba	1	2	Grelos	BRS0143	0,14	23,39	1,31	7,36	6,60	75,19	18,66	5,07	19,75
2011/12	Córdoba	1	2	Grelos	BRS0143	0,28	21,76	1,42	13,57	5,37	146,62	24,82	4,00	16,57
2011/12	Córdoba	1	2	Grelos	BRS0143	0,20	24,52	1,14	10,20	6,83	71,05	22,61	4,66	22,24
2011/12	Córdoba	1	2	Grelos	BRS0143	0,12	23,92	1,53	11,83	6,22	69,06	19,95	3,49	23,76
2011/12	Córdoba	1	2	Grelos	BRS0143	0,17	22,55	1,24	6,96	6,78	77,83	17,14	4,91	23,04
2011/12	Córdoba	1	3	Grelos	BRS0143	0,95	27,41	1,61	19,53	4,54	172,66	40,44	5,42	27,51
2011/12	Córdoba	1	3	Grelos	BRS0143	1,02	24,51	1,55	18,55	5,79	97,35	27,38	5,86	24,45
2011/12	Córdoba	1	3	Grelos	BRS0143	0,73	34,70	0,77	15,77	5,27	36,29	21,26	4,55	29,24
2011/12	Córdoba	1	3	Grelos	BRS0143	0,82	28,57	1,38	11,28	6,55	56,41	25,99	5,01	24,32
2011/12	Córdoba	1	3	Grelos	BRS0143	0,77	24,95	1,43	14,27	6,18	174,62	31,45	4,38	24,23
2011/12	Córdoba	1	3	Grelos	BRS0143	0,84	35,25	1,83	18,97	6,37	300,23	35,97	7,27	28,46
2011/12	Córdoba	2	1	Grelos	BRS0143	0,13	13,39	0,80	7,67	4,47	52,98	18,28	3,73	22,25
2011/12	Córdoba	2	1	Grelos	BRS0143	0,11	5,43	0,93	5,19	3,80	57,53	12,81	3,06	20,22
2011/12	Córdoba	2	1	Grelos	BRS0143	0,10	15,16	0,88	6,41	4,77	43,37	13,44	4,39	25,41
2011/12	Córdoba	2	1	Grelos	BRS0143	0,12	14,33	1,07	6,35	3,70	50,18	15,06	4,15	16,22
2011/12	Córdoba	2	1	Grelos	BRS0143	0,18	20,46	1,03	6,55	4,79	78,86	20,16	4,25	23,86
2011/12	Córdoba	2	1	Grelos	BRS0143	0,15	16,31	1,08	6,54	4,13	79,14	17,39	5,18	26,60
2011/12	Córdoba	2	2	Grelos	BRS0143	0,17	19,76	0,98	5,08	4,04	45,46	12,56	5,20	21,83
2011/12	Córdoba	2	2	Grelos	BRS0143	0,14	17,59	0,85	6,31	4,35	59,47	15,62	4,35	24,68
2011/12	Córdoba	2	2	Grelos	BRS0143	0,34	24,12	1,14	8,42	5,31	100,74	23,57	5,54	23,69
2011/12	Córdoba	2	2	Grelos	BRS0143	0,15	14,67	0,75	9,21	4,85	67,37	19,06	3,92	22,20
2011/12	Córdoba	2	2	Grelos	BRS0143	0,30	21,45	0,77	7,03	4,38	65,43	25,47	4,40	20,83

Temporada	Origen	Siembra	Bloque	Parte de la planta	Identificación	Componentes inorgánicos								
						Na (mg/g)	K (mg/g)	Mg (mg/g)	Ca (mg/g)	P (mg/g)	Fe (µg/g)	Mn (µg/g)	Cu (µg/g)	Zn (µg/g)
2011/12	Córdoba	2	2	Grelos	BRS0143	0,19	14,96	0,93	7,72	5,06	75,21	24,35	5,40	26,57
2011/12	Córdoba	2	3	Grelos	BRS0143	0,56	20,59	1,14	8,66	5,61	47,83	21,97	5,89	25,80
2011/12	Córdoba	2	3	Grelos	BRS0143	0,60	24,90	1,03	7,97	5,14	60,42	21,35	6,54	26,88
2011/12	Córdoba	2	3	Grelos	BRS0143	0,32	25,65	1,20	7,17	5,28	57,05	21,26	6,05	27,24
2011/12	Córdoba	2	3	Grelos	BRS0143	0,29	18,16	0,96	6,04	5,08	82,93	18,17	4,65	24,19
2011/12	Córdoba	2	3	Grelos	BRS0143	0,50	13,76	1,47	7,86	5,49	181,56	18,09	4,64	33,19
2011/12	Córdoba	2	3	Grelos	BRS0143	0,24	12,52	0,88	6,33	6,43	140,61	19,26	6,44	26,88
Media						0,35	21,09	1,11	9,63	5,22	93,61	21,11	4,73	22,97
Mínimo						0,10	5,43	0,66	5,08	3,70	36,29	12,56	2,86	11,16
Máximo						1,02	35,25	1,83	19,53	6,83	303,57	40,44	7,27	33,19
Desviación estándar						0,27	6,59	0,29	4,02	0,88	66,44	6,13	1,08	4,85

Capítulo IV

Tabla IV.1. Contenido de glucosinolatos en nabizas de Córdoba temporada 2013/14

Temporada	Origen	Bloque	Parte de la planta	Identificación	Glucosinolatos (μ moles/g masa seca)							
					Total	PRO	GNA	GBN	GBS	GST	NGBS	otros
2013/14	Córdoba	1	Nabizas	BRS0143	11,10	1,02	8,28	0,17	0,08	0,88	0,11	0,56
2013/14	Córdoba	2	Nabizas	BRS0143	24,32	3,66	16,49	0,61	0,17	2,01	0,12	1,27
2013/14	Córdoba	3	Nabizas	BRS0143	24,29	2,76	18,62	0,32	0,25	1,36	0,07	0,92
2013/14	Córdoba	1	Nabizas	BRS0427	14,31	0,61	11,36	0,65	0,12	0,92	0,10	0,53
2013/14	Córdoba	2	Nabizas	BRS0427	21,71	1,22	17,83	1,26	0,12	0,85	0,00	0,43
2013/14	Córdoba	3	Nabizas	BRS0427	32,23	1,96	26,35	1,19	0,21	1,11	0,05	1,35
2013/14	Córdoba	3	Nabizas	BRS0469	25,27	0,39	21,62	0,33	0,28	1,73	0,12	0,80
2013/14	Córdoba	3	Nabizas	BRS0471	25,52	3,07	18,50	2,31	0,26	0,93	0,13	0,34
2013/14	Córdoba	1	Nabizas	BRS0496	19,20	0,81	16,06	1,03	0,08	0,88	0,06	0,27
2013/14	Córdoba	2	Nabizas	BRS0496	25,94	2,31	19,99	1,01	0,23	1,69	0,13	0,58
2013/14	Córdoba	3	Nabizas	BRS0496	21,99	0,78	17,98	1,43	0,34	1,00	0,08	0,39
2013/14	Córdoba	3	Nabizas	BRS0438	44,92	0,00	41,21	0,88	0,31	1,61	0,28	0,63
2013/14	Córdoba	3	Nabizas	BRS0450	44,97	0,57	37,62	3,58	0,44	2,17	0,10	0,49
2013/14	Córdoba	1	Nabizas	BRS0458	17,14	0,19	15,06	0,45	0,05	0,63	0,07	0,69
2013/14	Córdoba	2	Nabizas	BRS0458	37,84	0,17	32,58	2,98	0,20	1,05	0,18	0,68
2013/14	Córdoba	3	Nabizas	BRS0458	25,63	0,25	21,88	1,65	0,08	0,65	0,17	0,95
2013/14	Córdoba	3	Nabizas	BRS0466	28,19	2,15	20,68	1,97	0,27	1,90	0,18	1,04
2013/14	Córdoba	1	Nabizas	BRS0470	25,41	0,38	21,04	2,17	0,13	0,87	0,19	0,63
2013/14	Córdoba	2	Nabizas	BRS0470	40,83	0,28	37,89	0,02	0,20	1,04	0,47	0,92
2013/14	Córdoba	3	Nabizas	BRS0470	34,42	0,21	29,93	2,02	0,11	0,83	0,14	1,19
2013/14	Córdoba	3	Nabizas	BRS0484	44,01	0,00	38,75	0,61	0,50	2,04	0,58	1,53

Temporada	Origen	Bloque	Parte de la planta	Identificación	Glucosinolatos ($\mu\text{moles/g}$ masa seca)							
					Total	PRO	GNA	GBN	GBS	GST	NGBS	otros
2013/14	Córdoba	3	Nabizas	BRS0498	14,52	1,47	9,60	1,16	0,12	1,08	0,09	0,99
2013/14	Córdoba	3	Nabizas	BRS0499	27,42	1,13	23,00	0,77	0,24	1,38	0,17	0,74
2013/14	Córdoba	1	Nabizas	BRS0504	25,35	1,74	18,34	1,43	0,52	1,95	0,29	1,08
2013/14	Córdoba	2	Nabizas	BRS0504	42,02	3,15	33,28	1,63	0,33	2,01	0,19	1,43
2013/14	Córdoba	3	Nabizas	BRS0504	27,45	1,67	22,62	0,26	0,22	1,42	0,12	1,13
2013/14	Córdoba	3	Nabizas	BRS0507	30,83	0,26	27,50	0,32	0,20	1,48	0,08	1,01
2013/14	Córdoba	3	Nabizas	BRS0544	42,14	0,70	36,73	1,96	0,23	1,36	0,16	1,01
2013/14	Córdoba	1	Nabizas	BRSin05-C2	10,29	0,92	7,72	0,43	0,08	0,61	0,10	0,43
2013/14	Córdoba	2	Nabizas	BRSin05-C2	29,55	3,39	22,17	1,39	0,22	1,17	0,14	1,08
2013/14	Córdoba	3	Nabizas	BRSin05-C2	28,66	2,10	24,25	0,33	0,39	0,92	0,21	0,45
				Media	27,98	1,27	23,06	1,17	0,23	1,27	0,16	0,82
				Mínimo	10,29	0,00	7,72	0,02	0,05	0,61	0,00	0,27
				Máximo	44,97	3,66	41,21	3,58	0,52	2,17	0,58	1,53
				Desviación estándar	9,77	1,09	9,19	0,86	0,12	0,47	0,12	0,34

Tabla IV.2. Contenido de glucosinolatos en grelos de Córdoba temporada 2013/14

Temporada	Origen	Bloque	Parte de la planta	Identificación	Glucosinolatos ($\mu\text{moles/g}$ masa seca)							
					Total	PRO	GNA	GBN	GBS	GST	NGBS	otros
2013/14	Córdoba	1	Grelos	BRS0143	19,07	2,54	12,59	0,32	0,35	1,92	0,30	1,05
2013/14	Córdoba	2	Grelos	BRS0143	21,57	3,66	14,53	0,43	0,22	1,79	0,16	0,78
2013/14	Córdoba	3	Grelos	BRS0143	22,37	1,56	17,43	0,83	0,23	1,54	0,16	0,61

Temporada	Origen	Bloque	Parte de la planta	Identificación	Glucosinolatos (µmoles/g masa seca)							
					Total	PRO	GNA	GBN	GBS	GST	NGBS	otros
2013/14	Córdoba	1	Grelos	BRS0140	18,58	0,91	13,82	1,09	0,27	1,55	0,27	0,67
2013/14	Córdoba	2	Grelos	BRS0140	30,12	2,32	22,77	0,62	0,79	2,19	0,50	0,93
2013/14	Córdoba	3	Grelos	BRS0140	27,25	1,80	21,27	0,85	0,35	1,89	0,28	0,81
2013/14	Córdoba	1	Grelos	BRS0427	15,30	0,66	11,89	0,83	0,11	0,66	0,12	1,03
2013/14	Córdoba	2	Grelos	BRS0427	23,64	1,11	18,57	2,00	0,21	0,91	0,24	0,61
2013/14	Córdoba	3	Grelos	BRS0427	20,12	1,59	15,63	0,53	0,24	1,37	0,23	0,51
2013/14	Córdoba	1	Grelos	BRS0463	30,90	6,05	20,27	0,73	0,34	2,16	0,24	1,11
2013/14	Córdoba	2	Grelos	BRS0463	28,99	1,95	21,74	0,72	0,62	2,66	0,71	0,60
2013/14	Córdoba	3	Grelos	BRS0463	25,01	0,71	20,33	0,66	0,27	1,81	0,17	1,06
2013/14	Córdoba	1	Grelos	BRS0496	16,92	1,84	11,73	0,17	0,32	1,21	0,23	1,42
2013/14	Córdoba	2	Grelos	BRS0496	31,33	3,23	22,58	2,88	0,44	1,26	0,40	0,54
2013/14	Córdoba	3	Grelos	BRS0496	19,62	1,76	15,56	0,46	0,16	1,02	0,16	0,50
2013/14	Córdoba	1	Grelos	BRS0458	32,18	0,38	27,87	1,06	0,58	1,09	0,61	0,59
2013/14	Córdoba	2	Grelos	BRS0458	26,22	0,36	22,38	1,34	0,33	1,03	0,38	0,40
2013/14	Córdoba	3	Grelos	BRS0458	34,83	0,53	28,76	2,04	0,38	1,63	0,56	0,93
2013/14	Córdoba	1	Grelos	BRS0470	33,97	0,37	30,18	0,76	0,32	0,95	0,34	1,05
2013/14	Córdoba	2	Grelos	BRS0470	51,05	0,39	42,27	3,40	0,57	1,68	0,85	1,90
2013/14	Córdoba	3	Grelos	BRS0470	42,53	0,56	36,51	3,03	0,25	0,88	0,39	0,92
2013/14	Córdoba	1	Grelos	BRS0498	33,19	8,82	19,19	0,75	0,30	3,12	0,40	0,62
2013/14	Córdoba	2	Grelos	BRS0498	22,53	3,92	14,54	0,75	0,28	2,34	0,18	0,53
2013/14	Córdoba	3	Grelos	BRS0498	32,56	4,37	22,03	1,38	0,35	3,30	0,48	0,66
2013/14	Córdoba	1	Grelos	BRS0504	34,95	1,43	28,36	2,30	0,23	1,96	0,33	0,33
2013/14	Córdoba	2	Grelos	BRS0504	40,55	1,55	34,60	1,44	0,28	2,13	0,17	0,38
2013/14	Córdoba	3	Grelos	BRS0504	34,98	4,09	26,33	0,99	0,26	2,49	0,01	0,82
2013/14	Córdoba	1	Grelos	BRS0507	29,24	0,43	26,76	0,32	0,17	0,02	0,17	1,37

Temporada	Origen	Bloque	Parte de la planta	Identificación	Glucosinolatos (µmoles/g masa seca)							
					Total	PRO	GNA	GBN	GBS	GST	NGBS	otros
2013/14	Córdoba	2	Grelos	BRS0507	38,54	0,42	32,37	0,37	0,38	3,00	0,36	1,64
2013/14	Córdoba	3	Grelos	BRS0507	33,17	0,41	30,83	0,42	0,18	0,01	0,25	1,07
2013/14	Córdoba	1	Grelos	BRS0544	63,80	0,54	54,22	3,04	1,19	3,17	0,50	1,15
2013/14	Córdoba	2	Grelos	BRS0544	44,68	0,63	35,55	2,19	0,35	2,09	0,35	3,53
2013/14	Córdoba	3	Grelos	BRS0544	44,95	1,06	35,34	3,37	0,50	2,70	0,35	1,63
2013/14	Córdoba	1	Grelos	BRSin05-C2	18,46	1,93	12,78	0,62	0,50	1,61	0,32	0,70
2013/14	Córdoba	2	Grelos	BRSin05-C2	21,10	1,59	15,58	1,03	0,24	1,49	0,25	0,90
2013/14	Córdoba	3	Grelos	BRSin05-C2	24,81	2,38	19,33	0,90	0,18	1,30	0,32	0,40
				Media	30,25	1,88	23,79	1,24	0,35	1,72	0,33	0,94
				Mínimo	15,30	0,36	11,73	0,17	0,11	0,01	0,01	0,33
				Máximo	63,80	8,82	54,22	3,40	1,19	3,30	0,85	3,53
				Desviación estándar	10,48	1,81	9,587	0,938	0,2	0,81	0,1714	0,584

Tabla IV.3. Contenido de glucosinolatos en nabizas de Córdoba temporada 2014/15

Temporada	Origen	Bloque	Parte de la planta	Identificación	Glucosinolatos (µmoles/g masa seca)							
					Total	PRO	GNA	GBN	GBS	GST	NGBS	otros
2014/15	Córdoba	1	Nabizas	BRS0143	23,71	2,05	16,64	1,17	0,01	2,10	0,24	1,52
2014/15	Córdoba	2	Nabizas	BRS0143	35,55	3,34	26,53	1,80	0,02	2,27	0,13	1,47
2014/15	Córdoba	3	Nabizas	BRS0143	35,04	1,51	26,47	2,16	0,58	2,41	0,19	1,72
2014/15	Córdoba	1	Nabizas	BRS0427	28,85	1,63	22,34	1,60	0,30	1,80	0,29	0,90

Temporada	Origen	Bloque	Parte de la planta	Identificación	Glucosinolatos ($\mu\text{moles/g}$ masa seca)							
					Total	PRO	GNA	GBN	GBS	GST	NGBS	otros
2014/15	Córdoba	2	Nabizas	BRS0427	35,11	2,27	27,45	1,20	0,47	2,44	0,13	1,17
2014/15	Córdoba	3	Nabizas	BRS0427	28,74	1,64	22,94	0,97	0,02	2,03	0,09	1,04
2014/15	Córdoba	1	Nabizas	BRS0496	26,45	1,74	20,10	1,32	0,40	1,97	0,26	0,67
2014/15	Córdoba	2	Nabizas	BRS0496	30,50	4,30	20,13	1,68	0,30	2,76	0,13	1,20
2014/15	Córdoba	3	Nabizas	BRS0496	24,81	1,34	19,63	1,46	0,32	1,38	0,16	0,51
2014/15	Córdoba	1	Nabizas	BRS0498	19,66	2,93	8,74	1,34	0,66	3,21	0,47	2,32
2014/15	Córdoba	2	Nabizas	BRS0498	35,29	5,99	20,55	2,39	0,35	4,06	0,17	1,77
2014/15	Córdoba	3	Nabizas	BRS0498	29,00	3,90	18,84	1,90	0,36	2,63	0,15	1,22
2014/15	Córdoba	1	Nabizas	BRS0504	29,35	2,50	20,38	1,78	0,54	2,54	0,56	1,05
2014/15	Córdoba	2	Nabizas	BRS0504	47,62	2,51	37,83	1,70	0,40	3,11	0,29	1,77
2014/15	Córdoba	3	Nabizas	BRS0504	36,53	2,07	27,37	1,40	0,38	2,81	0,22	2,29
2014/15	Córdoba	1	Nabizas	BRSin05-C2	30,80	1,71	23,18	1,88	0,69	1,64	0,46	1,23
2014/15	Córdoba	2	Nabizas	BRSin05-C2	35,19	1,83	25,96	3,31	0,82	1,87	0,29	1,10
2014/15	Córdoba	3	Nabizas	BRSin05-C2	42,15	2,75	33,40	1,39	0,46	2,14	0,15	1,86
				Media	31,91	2,56	23,25	1,69	0,39	2,40	0,24	1,38
				Mínimo	19,66	1,34	8,74	0,97	0,01	1,38	0,09	0,51
				Máximo	47,62	5,99	37,83	3,31	0,82	4,06	0,56	2,32
				Desviación estándar	6,70	1,19	6,42	0,54	0,22	0,64	0,13	0,50

Tabla IV.4. Contenido de glucosinolatos en grelos de Córdoba temporada 2014/15

Temporada	Origen	Bloque	Parte de la planta	Identificación	Glucosinolatos ($\mu\text{moles/g}$ masa seca)							
					Total	PRO	GNA	GBN	GBS	GST	NGBS	otros
2014/15	Córdoba	1	Grelos	BRS0143	26,80	0,01	22,28	2,27	0,17	0,12	0,38	1,57
2014/15	Córdoba	2	Grelos	BRS0143	36,93	1,05	33,18	1,04	0,13	0,11	0,35	1,06
2014/15	Córdoba	3	Grelos	BRS0143	15,67	0,45	12,10	1,00	0,09	0,13	0,36	1,55
2014/15	Córdoba	1	Grelos	BRS0427	20,86	1,55	16,97	0,49	0,12	0,16	0,50	1,07
2014/15	Córdoba	2	Grelos	BRS0427	20,98	1,33	17,87	0,24	0,13	0,15	0,37	0,89
2014/15	Córdoba	3	Grelos	BRS0427	21,81	1,27	18,64	0,44	0,12	0,15	0,40	0,77
2014/15	Córdoba	1	Grelos	BRS0496	27,36	1,72	21,11	1,92	0,18	1,39	0,50	0,56
2014/15	Córdoba	2	Grelos	BRS0496	19,33	1,75	15,84	0,22	0,16	0,51	0,41	0,43
2014/15	Córdoba	3	Grelos	BRS0496	27,87	1,51	21,76	1,95	0,14	1,36	0,40	0,74
2014/15	Córdoba	1	Grelos	BRS0498	14,73	2,08	10,00	0,18	0,00	1,21	0,39	0,88
2014/15	Córdoba	2	Grelos	BRS0498	18,80	2,95	12,84	0,90	0,11	1,04	0,36	0,60
2014/15	Córdoba	3	Grelos	BRS0498	9,93	1,40	6,44	0,00	0,08	1,09	0,42	0,50
2014/15	Córdoba	1	Grelos	BRS0504	22,21	5,09	13,39	0,93	0,10	1,46	0,43	0,82
2014/15	Córdoba	2	Grelos	BRS0504	32,24	3,41	23,17	2,74	0,09	1,49	0,52	0,82
2014/15	Córdoba	3	Grelos	BRS0504	35,41	3,67	28,36	0,81	0,00	1,65	0,43	0,50
2014/15	Córdoba	1	Grelos	BRSin05-C2	26,58	1,40	22,03	0,23	0,00	1,31	0,42	1,20
2014/15	Córdoba	2	Grelos	BRSin05-C2	20,31	1,86	15,89	0,31	0,00	1,29	0,44	0,51
2014/15	Córdoba	3	Grelos	BRSin05-C2	33,60	1,23	26,60	2,38	0,00	2,11	0,40	0,88
				Media	23,97	1,87	18,80	1,00	0,09	0,93	0,42	0,85
				Mínimo	9,93	0,01	6,44	0,00	0,00	0,11	0,35	0,43
				Máximo	36,93	5,09	33,18	2,74	0,18	2,11	0,52	1,57
				Desviación estándar	7,44	1,21	6,76	0,87	0,06	0,65	0,05	0,34

Tabla IV.5. Contenido de componentes inorgánicos en nabizas de Córdoba temporada 2013/14

Temporada	Origen	Bloque	Parte de la planta	Identificación	Componentes inorgánicos								
					Na	K	Mg	Ca	P	Fe	Mn	Cu	Zn
					mg/g	mg/g	mg/g	mg/g	mg/g	µg/g	µg/g	µg/g	µg/g
2013/14	Córdoba	1	Nabizas	BRS0143	1,38	10,61	2,02	16,80	4,73	131,76	23,48	1,86	35,10
2013/14	Córdoba	2	Nabizas	BRS0143	1,57	42,32	1,62	16,26	4,52	143,95	34,15	4,51	31,36
2013/14	Córdoba	3	Nabizas	BRS0143	1,47	10,37	1,74	13,52	4,71	146,01	22,59	1,62	28,48
2013/14	Córdoba	1	Nabizas	BRS0427	1,27	8,98	2,23	23,57	5,84	177,29	6,89	6,85	21,08
2013/14	Córdoba	2	Nabizas	BRS0427	1,30	10,60	2,08	18,86	5,39	223,76	23,70	7,65	36,87
2013/14	Córdoba	3	Nabizas	BRS0427	2,47	10,59	2,05	22,02	4,71	408,00	42,18	6,74	27,72
2013/14	Córdoba	1	Nabizas	BRS0458	1,43	11,10	2,10	18,12	5,77	358,78	28,52	5,67	35,03
2013/14	Córdoba	2	Nabizas	BRS0458	1,68	10,89	1,80	19,06	4,78	349,97	26,22	3,13	21,47
2013/14	Córdoba	3	Nabizas	BRS0458	0,88	10,66	1,98	13,79	5,95	293,48	26,25	3,10	30,56
2013/14	Córdoba	1	Nabizas	BRS0470	1,40	9,84	1,91	17,70	4,94	176,71	31,87	5,89	32,47
2013/14	Córdoba	2	Nabizas	BRS0470	0,89	9,16	1,44	14,93	4,37	219,10	34,85	6,34	31,66
2013/14	Córdoba	3	Nabizas	BRS0470	1,53	10,15	1,49	13,31	3,66	204,94	26,38	5,25	38,16
2013/14	Córdoba	1	Nabizas	BRS0496	1,90	9,08	1,68	17,35	3,81	159,70	27,05	4,42	34,20
2013/14	Córdoba	2	Nabizas	BRS0496	1,07	10,23	1,91	17,77	6,71	136,12	31,80	6,69	34,33
2013/14	Córdoba	3	Nabizas	BRS0496	1,16	10,47	2,14	16,27	4,46	82,25	19,17	5,04	21,65
2013/14	Córdoba	1	Nabizas	BRS0504	1,01	6,66	1,92	15,10	6,26	544,58	23,35	3,46	44,63
2013/14	Córdoba	2	Nabizas	BRS0504	1,05	9,18	2,29	15,75	6,42	1118,25	36,84	4,27	37,38
2013/14	Córdoba	3	Nabizas	BRS0504	0,80	8,50	1,76	11,97	7,12	347,63	22,19	4,10	35,24
2013/14	Córdoba	1	Nabizas	BRSin05-C2	1,38	10,35	1,82	17,56	5,69	234,37	30,93	2,22	35,30
2013/14	Córdoba	2	Nabizas	BRSin05-C2	1,15	9,52	1,74	13,11	3,61	172,93	20,97	1,69	23,08
2013/14	Córdoba	3	Nabizas	BRSin05-C2	1,63	10,70	1,96	18,45	7,47	278,88	37,08	3,43	29,33

Temporada	Origen	Bloque	Parte de la planta	Identificación	Componentes inorgánicos								
					Na	K	Mg	Ca	P	Fe	Mn	Cu	Zn
					mg/g	mg/g	mg/g	mg/g	mg/g	µg/g	µg/g	µg/g	µg/g
				Media	1,35	11,43	1,89	16,73	5,28	281,36	27,45	4,47	31,67
				Mínimo	0,80	6,66	1,44	11,97	3,61	82,25	6,89	1,62	21,08
				Máximo	2,47	42,32	2,29	23,57	7,47	1118,25	42,18	7,65	44,63
				Desviación estándar	0,38	7,15	0,23	2,88	1,11	221,91	7,70	1,84	6,15

Tabla IV.6. Contenido de componentes inorgánicos en grelos de Córdoba temporada 2013/14

Temporada	Origen	Bloque	Parte de la planta	Identificación	Componentes inorgánicos								
					Na	K	Mg	Ca	P	Fe	Mn	Cu	Zn
					mg/g	mg/g	mg/g	mg/g	mg/g	µg/g	µg/g	µg/g	µg/g
2013/14	Córdoba	1	Grelos	BRS0143	1,06	7,95	1,52	25,68	6,56	103,91	15,02	4,45	33,46
2013/14	Córdoba	2	Grelos	BRS0143	1,10	9,42	1,63	15,73	5,60	60,62	7,74	5,71	31,75
2013/14	Córdoba	3	Grelos	BRS0143	1,69	9,43	1,84	23,16	7,66	70,48	8,07	5,91	27,23
2013/14	Córdoba	1	Grelos	BRS0427	1,75	13,34	1,87	24,79	3,32	142,10	37,13	4,06	37,25
2013/14	Córdoba	2	Grelos	BRS0427	0,95	13,03	1,66	15,12	6,16	23,95	16,46	2,58	28,02
2013/14	Córdoba	3	Grelos	BRS0427	1,32	13,04	1,40	13,83	5,64	58,80	19,98	4,88	26,40
2013/14	Córdoba	1	Grelos	BRS0458	2,32	10,78	1,85	21,58	9,54	98,88	20,02	3,87	24,66
2013/14	Córdoba	2	Grelos	BRS0458	1,54	8,00	1,55	5,94	6,34	160,90	13,63	4,76	26,96
2013/14	Córdoba	3	Grelos	BRS0458	1,48	9,58	1,55	30,16	4,20	87,82	18,05	4,19	17,56
2013/14	Córdoba	1	Grelos	BRS0470	1,52	11,13	1,61	17,48	6,39	89,93	25,42	4,33	31,42
2013/14	Córdoba	2	Grelos	BRS0470	1,48	8,92	1,36	7,03	8,60	90,96	17,40	4,74	27,41

Temporada	Origen	Bloque	Parte de la planta	Identificación	Componentes inorgánicos								
					Na	K	Mg	Ca	P	Fe	Mn	Cu	Zn
					mg/g	mg/g	mg/g	mg/g	mg/g	µg/g	µg/g	µg/g	µg/g
2013/14	Córdoba	3	Grelos	BRS0470	1,48	10,14	1,37	4,63	5,06	64,17	10,29	3,28	24,16
2013/14	Córdoba	1	Grelos	BRS0496	1,37	13,37	1,72	17,91	6,39	51,18	23,42	3,68	33,90
2013/14	Córdoba	2	Grelos	BRS0496	1,17	11,98	1,37	7,07	10,07	52,80	11,53	4,61	32,59
2013/14	Córdoba	3	Grelos	BRS0496	1,40	10,74	1,52	9,84	8,07	65,40	12,60	4,33	47,46
2013/14	Córdoba	1	Grelos	BRS0504	0,94	9,08	1,72	16,22	8,20	92,43	12,63	6,90	37,70
2013/14	Córdoba	2	Grelos	BRS0504	1,13	5,73	1,63	14,87	6,37	70,30	8,77	5,12	25,48
2013/14	Córdoba	3	Grelos	BRS0504	1,66	9,73	1,80	20,15	8,29	62,57	7,28	4,34	30,38
2013/14	Córdoba	1	Grelos	BRSin05-C2	1,89	10,43	1,90	32,25	5,68	46,98	14,76	2,90	16,99
2013/14	Córdoba	2	Grelos	BRSin05-C2	1,13	8,90	1,76	20,64	4,81	63,27	7,35	3,45	22,66
2013/14	Córdoba	3	Grelos	BRSin05-C2	1,52	6,93	1,56	18,26	7,46	66,17	12,21	4,71	25,80
Media					1,42	10,08	1,63	17,26	6,69	77,32	15,23	4,42	29,01
Mínimo					0,94	5,73	1,36	4,63	3,32	23,95	7,28	2,58	16,99
Máximo					2,32	13,37	1,90	32,25	10,07	160,90	37,13	6,90	47,46
Desviación estándar					0,33	2,09	0,17	7,65	1,72	31,36	7,24	1,00	6,91

Tabla IV.7. Contenido de componentes inorgánicos en nabizas de Córdoba temporada 2014/15

Temporada	Origen	Bloque	Parte de la planta	Identificación	Componentes inorgánicos								
					Na	K	Mg	Ca	P	Fe	Mn	Cu	Zn
					mg/g	mg/g	mg/g	mg/g	mg/g	µg/g	µg/g	µg/g	µg/g
2014/15	Córdoba	1	Nabizas	BRS0143	1,98	29,47	1,40	12,84	5,14	105,04	23,84	4,87	24,85

Temporada	Origen	Bloque	Parte de la planta	Identificación	Componentes inorgánicos								
					Na	K	Mg	Ca	P	Fe	Mn	Cu	Zn
					mg/g	mg/g	mg/g	mg/g	mg/g	µg/g	µg/g	µg/g	µg/g
2014/15	Córdoba	2	Nabizas	BRS0143	2,07	29,05	1,38	8,61	4,61	84,30	21,75	5,29	28,48
2014/15	Córdoba	3	Nabizas	BRS0143	0,89	31,51	1,32	8,95	6,04	115,36	22,66	4,47	26,05
2014/15	Córdoba	1	Nabizas	BRS0427	1,78	26,41	1,21	11,77	3,68	68,06	23,64	4,59	22,03
2014/15	Córdoba	2	Nabizas	BRS0427	1,34	29,06	1,19	6,13	4,85	82,60	14,49	4,85	27,67
2014/15	Córdoba	3	Nabizas	BRS0427	1,47	39,55	1,27	13,33	4,72	103,71	32,69	5,11	25,85
2014/15	Córdoba	1	Nabizas	BRS0496	1,19	25,59	1,24	13,37	3,74	86,59	16,70	3,76	23,02
2014/15	Córdoba	2	Nabizas	BRS0496	0,97	27,17	1,26	11,87	5,79	82,95	17,54	4,24	30,67
2014/15	Córdoba	3	Nabizas	BRS0496	0,72	27,85	1,17	18,79	4,25	85,29	19,03	4,76	24,98
2014/15	Córdoba	1	Nabizas	BRS0498	1,46	28,63	1,51	16,61	6,22	119,18	23,38	6,47	34,77
2014/15	Córdoba	2	Nabizas	BRS0498	0,83	26,01	1,25	11,56	5,31	99,96	10,77	5,65	32,78
2014/15	Córdoba	3	Nabizas	BRS0498	0,65	28,36	1,45	16,23	5,38	96,89	22,01	6,28	32,60
2014/15	Córdoba	1	Nabizas	BRS0504	1,32	30,96	1,42	25,94	6,02	147,58	19,62	4,82	27,23
2014/15	Córdoba	2	Nabizas	BRS0504	0,93	30,05	1,52	21,29	5,60	124,40	16,74	6,16	38,68
2014/15	Córdoba	3	Nabizas	BRS0504	0,76	29,48	1,15	17,87	5,96	92,83	11,27	4,79	34,58
2014/15	Córdoba	1	Nabizas	BRSin05-C2	1,03	30,44	1,40	24,01	4,14	97,79	16,84	4,07	23,43
2014/15	Córdoba	2	Nabizas	BRSin05-C2	0,94	27,23	1,32	21,16	5,07	94,39	14,60	4,44	21,29
2014/15	Córdoba	3	Nabizas	BRSin05-C2	0,70	30,01	1,43	22,14	4,92	94,95	16,69	3,98	28,26
Media					1,17	29,27	1,33	15,69	5,08	98,99	19,12	4,92	28,18
Mínimo					0,65	25,59	1,15	6,13	3,68	68,06	10,77	3,76	21,29
Máximo					2,07	39,55	1,52	25,94	6,22	147,58	32,69	6,47	38,68
Desviación estándar					0,44	3,07	0,12	5,67	0,79	18,57	5,27	0,79	4,90

Tabla IV.8. Contenido de componentes inorgánicos en grelos de Córdoba temporada 2014/15

Temporada	Origen	Bloque	Parte de la planta	Identificación	Componentes inorgánicos								
					Na	K	Mg	Ca	P	Fe	Mn	Cu	Zn
					mg/g	mg/g	mg/g	mg/g	mg/g	µg/g	µg/g	µg/g	µg/g
2014/15	Córdoba	1	Grelos	BRS0143	2,27	20,08	1,50	20,66	3,58	122,03	28,79	2,81	16,90
2014/15	Córdoba	2	Grelos	BRS0143	1,01	18,84	1,33	15,53	3,55	137,73	22,75	3,53	17,24
2014/15	Córdoba	3	Grelos	BRS0143	0,86	22,64	1,73	20,72	3,80	89,39	23,34	3,45	16,32
2014/15	Córdoba	1	Grelos	BRS0427	0,73	22,37	1,10	12,97	4,56	100,66	27,66	7,99	17,91
2014/15	Córdoba	2	Grelos	BRS0427	1,60	25,27	1,33	14,05	3,33	128,03	26,24	3,83	19,93
2014/15	Córdoba	3	Grelos	BRS0427	1,51	23,84	1,31	15,87	3,84	114,83	32,58	7,80	20,73
2014/15	Córdoba	1	Grelos	BRS0496	1,16	19,33	1,35	14,81	4,16	140,85	31,43	4,30	17,25
2014/15	Córdoba	2	Grelos	BRS0496	0,76	15,87	1,22	17,90	3,25	172,28	29,35	3,95	15,97
2014/15	Córdoba	3	Grelos	BRS0496	1,10	24,75	1,51	20,02	4,21	113,46	38,16	5,09	21,59
2014/15	Córdoba	1	Grelos	BRS0498	2,30	25,08	1,96	22,87	5,09	168,73	32,11	6,28	23,11
2014/15	Córdoba	2	Grelos	BRS0498	0,95	25,00	1,74	16,53	3,75	642,72	37,54	5,77	23,26
2014/15	Córdoba	3	Grelos	BRS0498	1,62	29,05	2,03	21,25	4,88	138,16	32,72	5,47	21,54
2014/15	Córdoba	1	Grelos	BRS0504	1,16	34,25	1,81	20,70	4,90	144,10	39,94	16,53	22,81
2014/15	Córdoba	2	Grelos	BRS0504	1,27	28,26	1,64	17,06	4,05	120,95	28,85	7,02	25,40
2014/15	Córdoba	3	Grelos	BRS0504	1,22	27,37	1,48	13,72	5,05	104,19	33,56	6,18	25,01
2014/15	Córdoba	1	Grelos	BRSin05-C2	1,15	15,25	1,05	12,12	3,25	117,17	29,99	4,87	17,76
2014/15	Córdoba	2	Grelos	BRSin05-C2	1,35	21,19	1,22	13,37	3,75	147,30	29,96	5,92	17,10
2014/15	Córdoba	3	Grelos	BRSin05-C2	0,89	30,53	1,18	12,25	5,41	163,65	41,66	6,78	37,55
				Media	1,27	23,83	1,47	16,80	4,13	159,24	31,48	5,98	20,97
				Mínimo	0,73	15,25	1,05	12,12	3,25	89,39	22,75	2,81	15,97
				Máximo	2,30	34,25	2,03	22,87	5,41	642,72	41,66	16,53	37,55

Temporada	Origen	Bloque	Parte de la planta	Identificación	Componentes inorgánicos								
					Na	K	Mg	Ca	P	Fe	Mn	Cu	Zn
					mg/g	mg/g	mg/g	mg/g	mg/g	µg/g	µg/g	µg/g	µg/g
				Desviación estándar	0,45	5,00	0,29	3,48	0,69	122,87	5,27	3,04	5,15

Tabla IV.9. Contenido de fibra ácido detergente (FAD) en nabizas y grelos de Córdoba temporada 2013/14

Temporada	Origen	Bloque	Identificación	FAD (%)	
				Nabizas	Grelos
2013/14	Córdoba	1	BRS0140		16,06
2013/14	Córdoba	2	BRS0140		16,27
2013/14	Córdoba	3	BRS0140		15,08
2013/14	Córdoba	1	BRS0143	12,86	15,24
2013/14	Córdoba	2	BRS0143	11,25	17,79
2013/14	Córdoba	3	BRS0143	12,70	17,60
2013/14	Córdoba	1	BRS0427	15,27	18,09
2013/14	Córdoba	2	BRS0427	13,31	17,21
2013/14	Córdoba	3	BRS0427	11,98	16,56
2013/14	Córdoba	3	BRS0438	12,53	
2013/14	Córdoba	3	BRS0450	12,82	
2013/14	Córdoba	1	BRS0458	13,13	17,39
2013/14	Córdoba	2	BRS0458	12,93	17,17
2013/14	Córdoba	3	BRS0458	13,83	18,58
2013/14	Córdoba	1	BRS0463		16,30
2013/14	Córdoba	2	BRS0463		18,89
2013/14	Córdoba	3	BRS0463		17,20
2013/14	Córdoba	3	BRS0466	10,84	
2013/14	Córdoba	3	BRS0469	12,67	
2013/14	Córdoba	1	BRS0470	13,67	
2013/14	Córdoba	2	BRS0470	10,96	16,64
2013/14	Córdoba	3	BRS0470	13,07	17,06
2013/14	Córdoba	3	BRS0471	12,09	
2013/14	Córdoba	3	BRS0484	13,47	
2013/14	Córdoba	1	BRS0496	11,99	14,31
2013/14	Córdoba	2	BRS0496	12,42	12,61
2013/14	Córdoba	3	BRS0496	13,20	14,34
2013/14	Córdoba	1	BRS0498		17,43
2013/14	Córdoba	2	BRS0498		16,76
2013/14	Córdoba	3	BRS0498	12,77	17,87
2013/14	Córdoba	3	BRS0499	12,71	
2013/14	Córdoba	1	BRS0504	12,86	17,40
2013/14	Córdoba	2	BRS0504	11,37	17,04
2013/14	Córdoba	3	BRS0504	12,55	16,96
2013/14	Córdoba	1	BRS0507		17,46
2013/14	Córdoba	2	BRS0507		17,89
2013/14	Córdoba	3	BRS0507	13,23	20,02
2013/14	Córdoba	1	BRS0544		14,16
2013/14	Córdoba	2	BRS0544		16,21
2013/14	Córdoba	3	BRS0544	12,61	18,81

Temporada	Origen	Bloque	Identificación	FAD (%)	
				Nabizas	Grelos
2013/14	Córdoba	1	BRSin05-C2	13,91	15,62
2013/14	Córdoba	2	BRSin05-C2	11,81	18,13
2013/14	Córdoba	3	BRSin05-C2	13,56	17,61

Tabla IV.10. Contenido de fibra neutro detergente (FND) y fibra ácido detergente (FAD) en nabizas y grelos de Córdoba temporada 2014/15

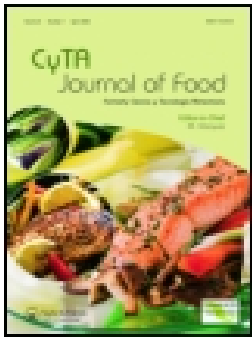
Temporada	Origen	Bloque	Identificación	FND (%)		FAD (%)	
				Nabizas	Grelos	Nabizas	Grelos
2014/15	Córdoba	1	BRS0143	16,41	17,65	8,75	14,60
2014/15	Córdoba	2	BRS0143	10,1	21,88	10,25	16,69
2014/15	Córdoba	3	BRS0143		22,79	10,03	19,07
2014/15	Córdoba	1	BRS0427	12,07	12,54	10,37	11,90
2014/15	Córdoba	2	BRS0427	12,25	12,42	10,90	12,85
2014/15	Córdoba	3	BRS0427	11,76		11,30	11,58
2014/15	Córdoba	1	BRS0496	11,91	12,41	10,70	10,41
2014/15	Córdoba	2	BRS0496	11,33	15,09	10,66	13,11
2014/15	Córdoba	3	BRS0496	12,09		10,45	10,91
2014/15	Córdoba	1	BRS0498			10,39	15,59
2014/15	Córdoba	2	BRS0498	12,66	16,34	10,70	15,38
2014/15	Córdoba	3	BRS0498	11,41	17,23	9,46	17,14
2014/15	Córdoba	1	BRS0504	11,88	17,12	10,29	16,85
2014/15	Córdoba	2	BRS0504	12,46	18,31	10,52	18,00
2014/15	Córdoba	3	BRS0504		15,7	10,57	14,14
2014/15	Córdoba	1	BRSin05-C2	11,85	14,16	10,18	11,86
2014/15	Córdoba	2	BRSin05-C2		15,79	10,47	14,30
2014/15	Córdoba	3	BRSin05-C2	11,7		9,70	12,05



ANEXO II

ANEXO II:

Artículos publicados y preparados para enviar a revistas



Análisis del contenido en minerales en nabizas y grelos (*Brassica rapa* L. var. *rapa*) mediante reflectancia en el infrarrojo cercano

S. Obregón-Cano, R. Moreno-Rojas, A.M. Jurado-Millán & A. De Haro-Bailón

To cite this article: S. Obregón-Cano, R. Moreno-Rojas, A.M. Jurado-Millán & A. De Haro-Bailón (2015): Análisis del contenido en minerales en nabizas y grelos (*Brassica rapa* L. var. *rapa*) mediante reflectancia en el infrarrojo cercano, *CyTA - Journal of Food*, DOI: [10.1080/19476337.2015.1114528](https://doi.org/10.1080/19476337.2015.1114528)

To link to this article: <http://dx.doi.org/10.1080/19476337.2015.1114528>



© 2015 The Author(s). Published by Taylor & Francis.



Published online: 23 Nov 2015.



Submit your article to this journal [↗](#)



View related articles [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)

FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY

Análisis del contenido en minerales en nabizas y grelos (*Brassica rapa* L. var. *rapa*) mediante reflectancia en el infrarrojo cercano

Analysis of mineral content in turnip greens and turnip tops (*Brassica rapa* L. var. *rapa*) by near-infrared reflectance spectroscopy

S. Obregón-Cano^{a*}, R. Moreno-Rojas^b, A.M. Jurado-Millán^a and A. De Haro-Bailón^a

^aDepartamento de Mejora Genética, Instituto de Agricultura Sostenible (CSIC), Alameda del Obispo s/n, C.P. 14004, Córdoba, España;

^bDepartamento de Bromatología, Universidad de Córdoba, Campus Universitario Rabanales, Carretera Nacional IV Km. 396, C.P. 14014, Córdoba, España

(Received 13 July 2015; final version received 23 October 2015)

The objective of this study was to evaluate the potential and accuracy of near-infrared reflectance spectroscopy (NIRS) for predicting the mineral content in lyophilized samples of turnip greens and turnip tops (*Brassica rapa* L. var. *rapa*). Mathematical treatments of the spectra and modified partial least squares regression (MPLS) were used for developing calibrations equations ($n = 298$). An independent set of samples ($n = 69$) was used to evaluate and validate the performance of the calibrations equations. The coefficients of determination obtained in the external validation (r^2_{cv}) and error of prediction (SEP) for the different minerals were K = 0.86 (SEP = 4,90), Ca = 0.91 (SEP = 1,66), P = 0.73 (SEP = 0,86), Mg = 0.85 (SEP = 0,32), Na = 0.87 (SEP = 0,21), Fe = 0.90 (SEP = 60,48), Zn = 0.80 (SEP = 5,83), Mn = 0.81 (SEP = 5,72) and Cu = 0.62 (SEP = 1,13). The calibration equations obtained for Ca and Fe showed the highest predictive ability. These results support the idea that NIRS technology is suitable for the fast, non-destructive, and accurate prediction of mineral content in turnip greens and turnip tops.

Keywords: *Brassica rapa*; NIRS; potassium; calcium; phosphorus; magnesium; sodium; iron; zinc; manganese; copper

El objetivo de este trabajo fue la evaluación del potencial de la espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS) para el análisis del contenido mineral en muestras liofilizadas de nabizas y grelos (*Brassica rapa* L. var. *rapa*). Se aplicó el método de mínimos cuadrados parciales modificados (MPLS) para desarrollar ecuaciones de calibración ($n=298$). Se evaluó la capacidad predictiva de las ecuaciones de calibración obtenidas mediante un lote de muestras ($n=69$) independientes del colectivo de calibración. Los coeficientes de determinación (r^2_{cv}) y errores de predicción (SEP) obtenidos en la validación externa para los distintos minerales fueron K=0,86(SEP=4,90); Ca=0,91 (SEP=1,66); P=0,73(SEP=0,86); Mg=0,85(SEP=0,32); Na=0,87(SEP=0,21); Fe=0,90(SEP=60,48); Zn=0,80(SEP=5,83); Mn=0,81 (SEP=5,72) y Cu=0,62(SEP=1,13). Las ecuaciones para Ca y Fe fueron las que mostraron mayor capacidad predictiva. Estos resultados demuestran el potencial del NIRS para el análisis rápido, no destructivo y preciso del contenido mineral en nabizas y grelos.

Palabras claves: *Brassica rapa*; NIRS; potasio; calcio; fósforo; magnesio; sodio; hierro; zinc; manganeso; cobre

Introducción

Las especies pertenecientes a la familia de las Crucíferas están consideradas como uno de los primeros grupos de plantas domesticadas por el hombre, y desde entonces el hombre ha sido capaz, mediante selección, de modificar casi todas las partes de la planta (raíces, tallos, hojas, inflorescencias y semillas) con vistas a su uso alimentario (hortícola, oleaginosa, condimento, pienso), industrial (fabricación de plásticos, lubricantes, combustibles) y ambiental (fitorremediación, biofumigación). El consumo de las especies hortícolas de esta familia de plantas ha experimentado un fuerte aumento en los países industrializados en los últimos años, debido al descubrimiento de las propiedades saludables de una serie de compuestos exclusivos que contienen, los glucosinolatos, capaces de proteger frente a la aparición de determinados tipos de cánceres (Farnham, Wilson, Stephenson, & Fahey, 2004; Traka & Mithen, 2009; Villatoro, Font, et al., 2012).

Brassica rapa fue la primera especie de *Brassica* domesticada por el hombre hace miles de años, apareciendo ya citada en la literatura sánscrita con el nombre de Siddharta, lo que prueba la antigüedad de su cultivo (Prakash, 1961). Existen numerosas

subespecies de *B. rapa* originadas en dos centros de origen independientes, uno en Europa para los tipos oleaginosos y otro en Asia que dio lugar a las formas hortícolas (Gómez & Prakash, 1999).

En el norte de España y Portugal los cultivos hortícolas de *Brassica rapa* tienen una gran tradición, distribución y consumo, tanto en fresco como envasado (De Haro, Del Río, Cartera, & Ordás, 2006). De la misma planta se cosechan los nabos, que son la raíz engrosada (hipocotilo), las nabizas, que son las hojas vegetativas, y los grelos que son los tallos junto con las hojas florales previas a la floración de la planta, formando parte de numerosos platos de la cocina tradicional (p. ej. 'Lacón con grelos'). Estos alimentos, al igual que los procedentes de otras especies hortícolas de *Brassica* se caracterizan por su bajo contenido en grasa y proteína y su alto contenido en fibras, minerales y vitaminas. Comparados con otras hortalizas destacan por su elevado contenido en vitaminas A, C, E, B6, K, luteína, carotenoides y folatos (Jahangir, Kim, Choi, & Verpoorte, 2009; Rosa, 1999; USDA, 2015). También son particularmente ricas en minerales potasio, cobre, magnesio, manganeso, hierro, zinc y calcio (Kopsell, Kopsell, Lefsrud, & Curran-Celentano, 2005).

*Corresponding author. Email: saraobregon@ias.csic.es

Los métodos tradicionales de análisis del contenido en minerales por vía húmeda, como por ejemplo la espectrometría de absorción atómica (AAS), la espectrometría de emisión atómica de plasma acoplado inductivamente (ICP-AES), o la espectrometría de masas de plasma acoplado inductivamente (ICP-MS) son caros, lentos, agresivos con el medio ambiente y necesitan mano de obra especializada para su aplicación. Como alternativa a estos métodos, desde los últimos 40 años se viene utilizando la espectroscopía por reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS) para el análisis de una gran diversidad de componentes de la calidad en los alimentos, así como de otras sustancias de interés para la industria farmacéutica (Chavez et al., 2015), química (Feng, Wu, & Zeng, 2015; Foster, Kakani, Ge, & Mosali, 2013), alimentaria, incluyendo frutas y verduras (Font, Del Río-Celestino, Carrea, & De Haro-Bailón, 2005; Guo, Ni, & Kokot, 2016; Martínez, Font, Gómez, Blanco, & Del Río, 2014; Schmitt, Garrigues, & De La Guardia, 2014) y agrícola (Cozzolino, Fassio, & Fernández, 2003; De Haro et al., 2006; Dimov, Suprianto, Hermann, & Möllers, 2012; Murray, 1986; Norris, Barnes, Moore, & Shenk, 1976; Shenk & Westerhaus., 1993; Van Maarschalkerweerd & Husted, 2015).

Aunque los minerales no poseen bandas de absorción en la región del infrarrojo pueden estar asociados a estructuras orgánicas en forma de óxidos, quelatos u otras moléculas que permitan poder ser estimados mediante ecuaciones de calibración desarrolladas para el NIRS, como se ha comprobado en trabajos publicados previamente en otras matrices vegetales (Cozzolino & Moron, 2004; García et al., 2012; González, Hernández, & González, 2007; Liao, Wu, Chen, Guo, & Shi, 2012; Martínez et al., 2014; Menesatti et al., 2010; Plans, Simó, Casañas, & Sabaté, 2012; Villatoro, Moreno, et al., 2012).

Teniendo en cuenta el creciente interés por este cultivo, y con vistas a su extensión a otras regiones de la Península Ibérica, desde los últimos años se están desarrollando programas de mejora genética que nos permitan obtener variedades de nabizas y grelos adaptadas a las condiciones edafoclimáticas mediterráneas y de alto valor nutracéutico, con especial énfasis en el estudio del contenido en minerales y glucosinolatos en sus partes consumibles.

El objetivo del presente trabajo fue estudiar las posibilidades del NIRS para el análisis rápido y preciso del contenido en potasio (K), calcio (Ca), fósforo (P), magnesio (Mg), sodio (Na), hierro (Fe), zinc (Zn), manganeso (Mn) y cobre (Cu) en muestras de nabizas y grelos.

Materiales y métodos

Material vegetal

Durante los años agrícolas 2010–2011, 2011–2012 y 2012–2013, un conjunto de 25 variedades de *Brassica rapa* L. var. *rapa* se cultivaron en la finca experimental del IAS de Córdoba, (37°51' N, 4°48'W, España) en un diseño de bloques al azar con 3 repeticiones. El clima es típico mediterráneo con un precipitación media de 650 mm, y el suelo es profundo, franco-arenoso, clasificado como Typic Xerofluvent.

Las variedades de *Brassica rapa* L. var. *rapa* procedían del Banco de Germoplasma de *Brassica* de la Misión Biológica de Galicia (CSIC), en donde habían sido evaluadas por sus características agronómicas y su aptitud para producción de nabizas y grelos. Durante cada año agrícola, y en el momento óptimo para consumo, se tomaron muestras de nabizas (4 a 5 hojas por planta) y de grelos (3 a 4 tallos florales por planta) de

las plantas seleccionadas para cada una de las variedades estudiadas. En total se cosecharon 373 muestras (228 de nabizas y 145 de grelos), de las cuales 135 se cosecharon en 2010–2011, 160 muestras procedían de la cosecha 2011–2012 y 78 muestras se cosecharon en 2012–2013. Todo el material vegetal se lavó a fondo con agua del grifo para eliminar la suciedad y el polvo de la superficie y se finalizó con un lavado en agua desionizada. A continuación se almacenaron a -80°C hasta el momento de su liofilización, que se realizó en un equipo Telstar® modelo Cryodos-50 (Telstar, Terrasa, Spain). Las muestras liofilizadas se molieron en un molino IKA-Labortechnik® modelo A10, durante 20 segundos y se almacenaron en desecador hasta el momento de ser analizadas por el método de referencia o por el equipo NIRS.

Análisis del contenido mineral por métodos de referencia

Los minerales analizados en las 373 muestras de nabizas y grelos fueron K, Ca, P, Mg, Na, Fe, Zn, Mn y Cu. La digestión de la muestra se realizó por vía húmeda con ácido nítrico y ácido perclórico (Isaac & Johnson, 1990). Los análisis de Ca, Mg, Fe, Mn, Zn y Cu se llevaron a cabo por espectrofotometría de absorción atómica y los de Na y K se hicieron por emisión atómica. El equipo utilizado fue un espectrofotómetro de absorción atómica Varian® modelo SpectrAA-50/55, con llama de aire-acetileno y lámparas de cátodo hueco de un solo elemento y corrección de fondo con lámpara de deuterio para el análisis de Mn. Para la determinación de Ca y Mg, se añadió cloruro de lantano a fin de evitar interferencias aniónicas. El análisis de P, como ácido molibdo-vanado-fosfórico, se hizo por colorimetría (Association of Official Analytical Chemists, 1991) en un espectrofotómetro UV-visible (Beckman® modelo DU640).

Desarrollo de ecuaciones NIRS

Se utilizó un espectrofotómetro de infrarrojo cercano modelo 6500 (Foss-NIRSystems®, Inc., Silver Spring, MD, EE.UU.) para llevar a cabo los registros de los espectros de las muestras en modo de reflectancia. Se registró un espectro por cada muestra. Las muestras se colocaron en una cápsula redonda de 3 cm de diámetro, compuesta de vidrio de cuarzo y aluminio anodizado para evitar interferencias en la absorción. De cada muestra se obtuvieron los espectros de reflectancia en el intervalo de longitudes de onda de 400 a 2500 nm, a intervalos de 2 nm. La recogida de los datos espectrales y el análisis quimiométrico de los mismos se llevó a cabo mediante el programa WinISI II v1.50 (Infrasoft International, Port Matilda, PA, USA).

La detección de anomalías espectrales se realizó mediante un análisis de componentes principales (PCA) aplicado a todo el conjunto de la población basado en el cálculo de la distancia de Mahalanobis (H) (Shenk & Westerhaus, 1991, 1996). Éste análisis además de ser una herramienta para la selección de muestras del colectivo de calibración, es una técnica de gran utilidad en el análisis para transformar los datos espectrales originales (valores de absorbancia) en nuevas variables (componentes principales) ortogonales, eliminando con ello la colinealidad (información redundante) (Martens & Naes, 1989). Se utilizó el algoritmo CENTER incluido en el programa WinISI II (versión 1.50 Infrasoft International, Port Matilda, PA, USA) para el cálculo de las distancias H entre los espectros de las distintas muestras respecto al espectro medio. De acuerdo con

Shenk and Westerhaus (1991), las muestras con un valor del estadístico H superior a 3 unidades se definieron como espectros atípicos y se eliminaron para el desarrollo de las ecuaciones. Se encontraron un total de 6 espectros con valores de H comprendidos entre 3,045 y 21,33 que fueron eliminados del conjunto de muestras utilizado en el trabajo. El número final de muestras seleccionadas fue de 367 que fueron divididas en dos grupos: el conjunto de calibración compuesto por 298 muestras y fue usado para el desarrollo de las diferentes ecuaciones de calibración, y el grupo de validación externa formado por 69 muestras (20% del total) y fue usado para evaluar la capacidad predictiva de cada una de las ecuaciones desarrolladas. La selección de las muestras del grupo de validación externa se realizó a partir del listado de muestras ordenadas en base a sus valores de H, eligiendo 1 de cada 5 muestras del listado ordenado (Shenk & Westerhaus, 1991). De esta manera, las muestras de validación externa seleccionadas representan todo el intervalo de variabilidad del conjunto de la población (Hruschka, 2001). Para el desarrollo de las ecuaciones de calibración se aplicó el método de regresión por mínimos cuadrados parciales modificados (MPLS), del que se ha mostrado su utilidad para la evaluación de los minerales, utilizando todo el intervalo espectral (400–2500 nm) (Cozzolino & Moron, 2004; Font, Del Río-Celestino, & De Haro-Bailón, 2006; González et al., 2007; Martínez et al., 2014; Ward, Nielsen, & Møller, 2011).

Se aplicó el procedimiento de corrección de espectros SNV+DT que proporciona el programa WinISI para eliminar la dispersión debida a los efectos causados por las diferencias en tamaño de partícula o la variación de longitud de camino entre la dispersión de las muestras y ajustar la línea base (Barnes, Dhanoa, & Lister, 1989). Los tratamientos matemáticos seleccionados aplicado a los espectros fueron (1, 4, 4, 1) y (2, 5, 5, 2), donde el primer número indica el orden de derivada (primera o segunda derivada del logaritmo de 1/R), el segundo número es la amplitud o distancia entre los segmentos a sustraer, el tercer número es la longitud del segmento a ser suavizado y el cuarto número indica un segundo suavizado (Shenk, Workman, & Westerhaus, 1992). Los estadísticos que definen las ecuaciones de calibración obtenidas son el coeficiente de determinación (R^2) que muestra el porcentaje de la variabilidad existente en las concentraciones de minerales explicado por la ecuación de regresión, y el error estándar de la calibración (SEC) que es el error estándar de los residuales para el colectivo de calibración. Hay que destacar que el error estándar de la calibración solamente nos indica el ajuste de los valores de referencia a la línea de regresión, por lo que no puede considerarse un estadístico adecuado para evaluar la validez de la ecuación de calibración obtenida (Shenk & Westerhaus, 1996).

Validación de las ecuaciones

Para evaluar la capacidad predictiva de las ecuaciones de calibración se utilizaron dos modelos de validación que permiten establecer una comparación (mediante diferentes criterios estadísticos) entre el valor verdadero (valor obtenido por método de referencia) y el valor estimado (valor obtenido por NIRS). En primer lugar se realizó una validación cruzada, basada únicamente en los datos empleados en la etapa de calibración, para calcular el número óptimo de términos de la regresión. El algoritmo selecciona diferentes colectivos de calibración y validación dentro del total de la población considerada,

realizando con cada selección una simulación del algoritmo de regresión (Martens & Naes, 1989; Shenk & Westerhaus, 1991). Finalmente el programa de cálculo seleccionó la ecuación que hace mínimo el error estándar de validación cruzada (SECV). Los estadísticos resultantes de la validación cruzada fueron el coeficiente de determinación de la validación cruzada (r^2_{vc}), el error estándar de la validación cruzada (SECV), que representa el error estándar de los residuales para el colectivo de validación cruzada, y el estadístico (RPD) (Williams & Sobering, 1996) que es la relación entre la desviación estándar y el error estándar de la validación cruzada (SD/SECV). El RPD_{vc} es un estadístico que permite la evaluación del SECV en función de la desviación estándar de los datos de referencia para la población en estudio (Williams, 2001).

En segundo lugar se realizó una evaluación de las ecuaciones de calibración seleccionadas con muestras que no intervinieron en la calibración (colectivo de validación, $n = 69$ en nuestro trabajo), proceso que se denomina validación externa (Bagchi, Sharma, & Chattopadhyay, 2016; Font, Del Río, Fernández, & De Haro, 2003; Kim, Lee, Shin, & Shin, 2014; Lee, Hwang, Lee, & Choung, 2014; Martínez et al., 2014; Sánchez, Garrido-Varo, Guerrero, & Pérez-Marín, 2013; Shenk & Westerhaus, 1991). Las estadísticas de la validación externa incluyen el coeficiente de determinación de la validación (r^2_{ve}), el error estándar de predicción (SEP), el RPD_{ve} (que es la relación SD/SEP) y el RER (Williams & Sobering, 1996) que es la relación entre el intervalo de los datos de cada mineral y el error estándar de la predicción. Los estadísticos RPD y RER permiten la comparación del rendimiento del modelo a través de poblaciones con diferentes desviaciones estándar (Cozzolino & Moron, 2004).

Las mejores ecuaciones de calibración para cada mineral se seleccionaron considerando la combinación óptima de los siguientes estadísticos de la validación externa: altos valores de los coeficientes de determinación (r^2_{ve}) y altos valores de RPD_{ve} y de RER. Aquellas ecuaciones cuyo RPD es superior a 3 se consideran con excelente capacidad de predicción, las que tienen RPD entre 2 y 3 permiten realizar predicciones aproximadas, y aquellas cuyo RPD está entre 1,5 y 2 sólo pueden utilizarse con fines de clasificación en grupos de alto-medio-bajo contenido. Igualmente, los valores de RER obtenidos con las distintas ecuaciones de calibración con buena capacidad predictiva deben ser mayores de 10 (Williams & Sobering, 1996; Williams, 2001).

El error estándar de laboratorio (SEL) para el análisis de minerales se determinó y se comparó con el SEP para todas las ecuaciones. Se seleccionaron 10 muestras y se analizaron por duplicado en diferentes momentos y por diferentes analistas, para obtener una estimación del error total del método de referencia. La relación SEP/SEL también fue calculada, este estadístico permite relacionar el error de NIRS con el error en el método de referencia.

Resultados y discusión

Análisis de referencia de minerales en Brassica rapa

El contenido en minerales de las muestras de nabizas y grelos analizadas por el método de referencia (vía húmeda) se muestra en la *Tabla 1*. Estos resultados confirman que *Brassica rapa* es una buena fuente de minerales con concentraciones muy altas en K (valor medio de 34,27 g/kg), Ca (13,38 g/kg) y P (4,93 g/kg) y concentraciones más bajas de Na (1,18 g/kg), Mg (1,95 g/kg),

Tabla 1. Contenido en minerales de las muestras (n = 373) de *Brassica rapa*, analizadas según el método de referencia.Table 1. Mineral content of *Brassica rapa* samples (n = 373) analysed by reference method.

Mineral	Intervalo	Media	SD ^a
K (g/kg)	13,39–142,85	34,27	20,68
Ca (g/kg)	5,23–31,27	13,38	5,68
P (g/kg)	1,23–20,26	4,93	1,84
Mg (g/kg)	0,75–6,32	1,95	0,87
Na (g/kg)	0,16–5,89	1,18	1,37
Fe (mg/kg)	50–1727	269,19	290,19
Zn (mg/kg)	15,43–111,53	39,20	14,71
Mn (mg/kg)	7,34–219,51	33,15	19,68
Cu (mg/kg)	2,91–11,49	6,84	1,85

Nota: ^aDesviación estándar.Note: ^aStandard deviation.

Mn (33,15 mg/kg), Fe (269,19 mg/kg), Zn (39,2 mg/kg) y Cu (6,84 mg/kg). Estos valores superan a los encontrados en otras hortalizas como el calabacín (de 800 a 5100 mg/kg en la pulpa y de 100 a 5900 mg/kg en la piel) (Martínez et al., 2014). El intervalo de contenido en K encontrado en las muestras de nabizas y grelos (de 13,39 a 142,85 g/kg) también es alto y mayor que el encontrado en brócoli para este mineral (de 321,58 a 521,78 mg/100 g muestra fresca) (Dos Santos et al., 2013).

Calibración y validación

Las muestras fueron divididas en el grupo de calibración (n = 298) y grupo de validación externa (n = 69). En la Tabla 2 se muestran el intervalo, la media, la desviación estándar y el coeficiente de variación del contenido en minerales de las muestras pertenecientes a estos grupos. Los resultados de las ecuaciones de calibración obtenidas por regresión MPLS se muestran en la Tabla 3. Para el desarrollo de las ecuaciones NIRS de los minerales Na, Ca, P, Fe, Cu, Zn, se obtuvieron los mejores resultados aplicando la segunda derivada a los datos espectrales (2, 5, 5, 2; SNV + DT). En el caso de K, Mn y Mg los mejores resultados se obtuvieron tras aplicar la primera derivada a los datos espectrales (1, 4, 4, 1; SNV + DT). Todas las ecuaciones obtenidas presentaron unos valores altos en el

coeficiente de determinación de la calibración, superiores a 0,9 para Ca (0,94), Fe (0,93), Na (0,93), K (0,92), Mg (0,9) y Mn (0,9), siendo inferiores para P (0,88), Zn (0,85) y Cu (0,72) (Tabla 3). Un coeficiente de determinación mayor de 0,9 indica que más del 90% de la varianza en los datos puede ser explicada por el modelo desarrollado, el 10% restante es atribuible a otros factores como la preparación de la muestra o los análisis de referencia (Williams, 2001). Los R² obtenidos para cada uno de los minerales resultaron más altos que los obtenidos en otras verduras como *Eruca vesicaria* Na = 0,66, Cu = 0,52, Fe = 0,78, Mn = 0,41, K = 0,79, Ca = 0,39, Mg = 0,44 y Zn = 0,71 (Villatoro, Moreno, et al., 2012).

Las ecuaciones de calibración finales para cada mineral fueron seleccionadas en base a maximizar el r²_{vc} y a minimizar el SECV. Los valores de estos estadísticos obtenidos para las ecuaciones de calibración de los diferentes minerales fueron, de mayor a menor: Ca = 0,92 (SECV = 1,5); K = 0,9 (4,07); Na = 0,89 (0,19); Fe = 0,89 (57,56); Mg = 0,87 (0,29); Mn = 0,87 (4,43); P = 0,82 (0,7); Zn = 0,8 (5,69) y Cu = 0,66 (1,08). El intervalo de los valores del coeficiente de variación (CV) de la validación cruzada está comprendido entre 11,56% para el Ca y 28,79% para el Na; en la validación externa el intervalo del CV para los distintos minerales está comprendido entre el 12,57% para el Ca y el 31,34% para el Na. Estos valores son similares a los obtenidos por otros autores en calabacín, en donde el intervalo del CV de la validación cruzada está comprendido entre el 12,22% del Zn y 45,71% del Cu, y en la validación externa el intervalo del CV está comprendido entre 13,73% de Mg al 65,38% del Cu (Martínez et al., 2014). Los valores de RPD_{vc} de la validación cruzada para cada mineral varían entre 3,47 para el Ca y 1,73 para el Cu (Tabla 3). En algunos casos (Ca, Mg), estos valores superan a los descritos en la bibliografía para los mismos minerales contenidos en otras matrices vegetales: en alfalfa Ca = 3,10 (González et al., 2007); en hojas de naranja Ca = 1,5 y Mg = 2 (Menesatti et al., 2010); en *Eruca vesicaria* Ca = 0,78 y Mg = 1,1 (Villatoro, Moreno, et al., 2012) y en tomate Ca = 2,73 y Mg = 2,51 (García et al., 2012); y en otros minerales los valores obtenidos en este trabajo también superan a otros descritos en cidra: K = 1,2, P = 1,4 y Fe = 1,7 (Liao et al., 2012). Merece la pena destacar el RPD_{vc} obtenido para la ecuación de calibración del Ca (3,47) ya que está considerado un micronutriente esencial que, en el norte de España y Portugal, es aportado a la dieta fundamentalmente a través del consumo de plantas de *Brassica* como las nabizas y

Tabla 2. Contenido en minerales del grupo de calibración y del grupo de validación externa de las muestras (n = 373) de *Brassica rapa*, analizadas según el método de referencia.Table 2. Mineral content of calibration and validation sets of *Brassica rapa* samples (n = 373) analyzed by the reference method.

Componente	grupo calibración (n = 298)			grupo validación (n = 69)		
	Intervalo	Media	SD ^a	Intervalo	Media	SD ^a
K (g/kg)	13,39–95,97	30,79	12,83	14,96–83,2	31,08	12,23
Ca (g/kg)	5,24–27,08	12,98	5,21	5,69–30,14	13,21	5,42
P (g/kg)	1,29–9,94	4,87	1,65	1,74–9,59	4,80	1,60
Mg (g/kg)	0,75–3,98	1,89	0,81	0,78–4,05	1,93	0,82
Na (g/kg)	0,16–2,8	0,66	0,59	0,17–2,64	0,67	0,57
Fe (mg/kg)	50–980	206,47	177,53	55–917	217,56	193,01
Zn (mg/kg)	15,44–78,58	37,85	12,91	16,57–71,57	36,84	11,59
Mn (mg/kg)	7,34–64,75	29,54	12,33	9–67,27	29,88	13,01
Cu (mg/kg)	2,91–12,48	6,85	1,86	3,32–11,18	6,79	1,81

Nota: ^aDesviación estándar.Note: ^aStandard deviation.

Tabla 3. Estadísticos de calibración y de validación cruzada para contenido en minerales en muestras de *Brassica rapa* utilizando SNVD+DT y primera o segunda derivadas.Table 3. Calibration and cross-validation statistics for mineral content in samples of *Brassica rapa* using SNVD+DT and first or second derivatives.

Componente	Calibración (n = 298)								Validación cruzada			
	TM ^a	Muestras	Intervalo	Media	SD ^b	SEL ^c	SEC ^d	R ^{2e}	SECV ^f	RPD _{vc} ^g	CV ^h	r ² _{vc} ⁱ
K (g/kg)	1,4,4,1	279	13,39–95,97	30,79	12,83	2,97	3,51	0,92	4,07	3,15	13,22	0,90
Ca (g/kg)	2,5,5,2	270	5,24–27,08	12,98	5,21	1,12	1,23	0,94	1,50	3,47	11,56	0,92
P (g/kg)	2,5,5,2	276	1,29–9,94	4,87	1,65	0,24	0,57	0,88	0,70	2,35	14,37	0,82
Mg (g/kg)	1,4,4,1	277	0,75–3,98	1,89	0,81	0,14	0,25	0,90	0,29	2,84	15,34	0,87
Na (g/kg)	2,5,5,2	260	0,16–2,8	0,66	0,59	0,04	0,16	0,93	0,19	3,02	28,79	0,89
Fe (mg/kg)	2,5,5,2	264	50–980	206,47	177,53	22,30	45,95	0,93	57,56	3,08	27,88	0,89
Zn (mg/kg)	2,5,5,2	274	15,44–78,58	37,85	12,91	4,23	5,03	0,85	5,69	2,27	15,03	0,80
Mn (mg/kg)	1,4,4,1	277	7,34–64,75	29,54	12,33	2,42	3,80	0,90	4,43	2,78	15,00	0,87
Cu (mg/kg)	2,5,5,2	279	2,91–12,48	6,85	1,86	0,63	0,98	0,72	1,08	1,73	15,77	0,66

Notas:

^aTratamiento matemático de los espectros.^bDesviación estándar.^cError estándar de laboratorio.^dError estándar de la calibración.^eCoefficiente de determinación de la calibración.^fError estándar de la validación cruzada.^gRelación entre la desviación estándar y el error estándar de la validación cruzada.^hCoefficiente de variación (%): relación entre el SECV y el valor medio.ⁱCoefficiente de determinación de la validación cruzada.

Notes:

^aMathematical treatment of spectra.^bStandard deviation.^cStandard error of laboratory.^dStandard error of calibration.^eCoefficient of determination of the calibration.^fStandard error of cross validation.^gRatio Performance Deviation: Ratio of the standard deviation to standard error of cross validation.^hCoefficient of variation (%): Ratio of SECV to mean.ⁱCoefficient of determination in the cross validation.

los grelos. Los valores de RPD_{vc} superiores a 3 que se obtuvieron para Ca, K, Na y Fe son indicativos de que las ecuaciones de calibración pueden utilizarse con fines de diagnóstico e investigación. Las ecuaciones para el resto de los minerales, con una RPD_{vc} inferior a 3, solamente permiten realizar una predicción aproximada del contenido en dichos minerales (Williams & Sobering, 1996). En la Figura 1 se representan los valores de laboratorio frente a los de predicción de NIRS para los minerales objeto de nuestro estudio en el grupo de muestras de la validación cruzada.

Una vez seleccionadas las ecuaciones de calibración para cada mineral, se procedió a su evaluación mediante el empleo de las mismas para la predicción del colectivo de validación, que contenía espectros de 69 muestras de nabizas y grelos, no incluidas en la calibración. En la Tabla 4, presentamos los estadísticos de la validación externa obtenidos para las ecuaciones de cada uno de los minerales estudiados. En general se obtuvieron elevados valores para los coeficientes de determinación de la predicción (r²_{vc}) de las ecuaciones de la mayoría de los minerales: Ca (0,91), Fe (0,9), Na (0,87), K (0,86), Mg (0,85), Mn (0,81) y Zn (0,8), siendo los más bajos los del P (0,73) y del Cu (0,62). Los valores de RPD_{vc} más altos se obtuvieron para Fe (3,11), Ca (3,10), Na (2,71) y K (2,68), confirmando los resultados de RPD_{vc} obtenidos en la validación cruzada, así como su utilidad para predecir el contenido de estos minerales en muestras independientes a las utilizadas en la calibración. Comparados con la bibliografía (Martínez et al., 2014; Plans, Simó, Casañas, & Sabaté, 2012) los valores de RPD_{vc} obtenidos en nuestro trabajo para los minerales K (2,68), Mg (2,50), Na (2,71), Fe (3,11), Mn (2,18), P (1,83), Ca (3,10), Zn (1,76) y Cu (1,35) son los más altos descritos hasta

ahora, del mismo orden respecto al Ca, e inferiores a los valores descritos en otras matrices vegetales respecto al Zn y Cu.

Se obtuvieron valores de RER superiores a 10 en los siguientes minerales: Ca (RER = 14,73), Fe (14,25), K (13,93), Na (RER = 11,76), Mg (RER = 10,22) y Mn (10,19), lo que es una prueba adicional de la elevada capacidad predictiva de los modelos de calibración desarrollados para estos minerales (Williams & Sobering, 1996; Williams, 2001).

Para evaluar la capacidad de precisión de las ecuaciones en relación al error del método de referencia se calculó el SEL para cada mineral y se relacionó con el SEP (SEP/SEL). En base a los valores de la relación SEP/SEL se puede decir que la precisión de las ecuaciones para los distintos minerales se puede clasificar como de excelente exactitud para K (SEP/SEL = 1,65), Ca (SEP/SEL = 1,48), Zn (SEP/SEL = 1,38) y Cu (SEP/SEL = 1,79); de buena exactitud para P (SEP/SEL = 3,58), Mg (SEP/SEL = 2,29), Fe (SEP/SEL = 2,71) y Mn (SEP/SEL = 2,36); y de baja exactitud para Na (SEP/SEL = 5,25) (Font et al., 2003). Los resultados obtenidos tanto en la validación cruzada como en la validación externa confirman la fiabilidad y capacidad de las ecuaciones de calibración desarrolladas para predecir de forma exacta y precisa el contenido en Ca y Fe en muestras de nabizas y grelos a partir de sus espectros de reflectancia en el infrarrojo cercano. Estas ecuaciones permiten utilizar la técnica NIRS para el análisis del contenido en Ca y Fe con fines de investigación, de control de calidad y cribado en *Brassica rapa*, lo que tiene especial importancia si se considera que los cultivos de esta especie son básicos en la dieta de las poblaciones del norte de España y Portugal, así como la importancia de estos minerales en la nutrición humana. Cabe señalar que las nabizas y los grelos tienen una alta concentración

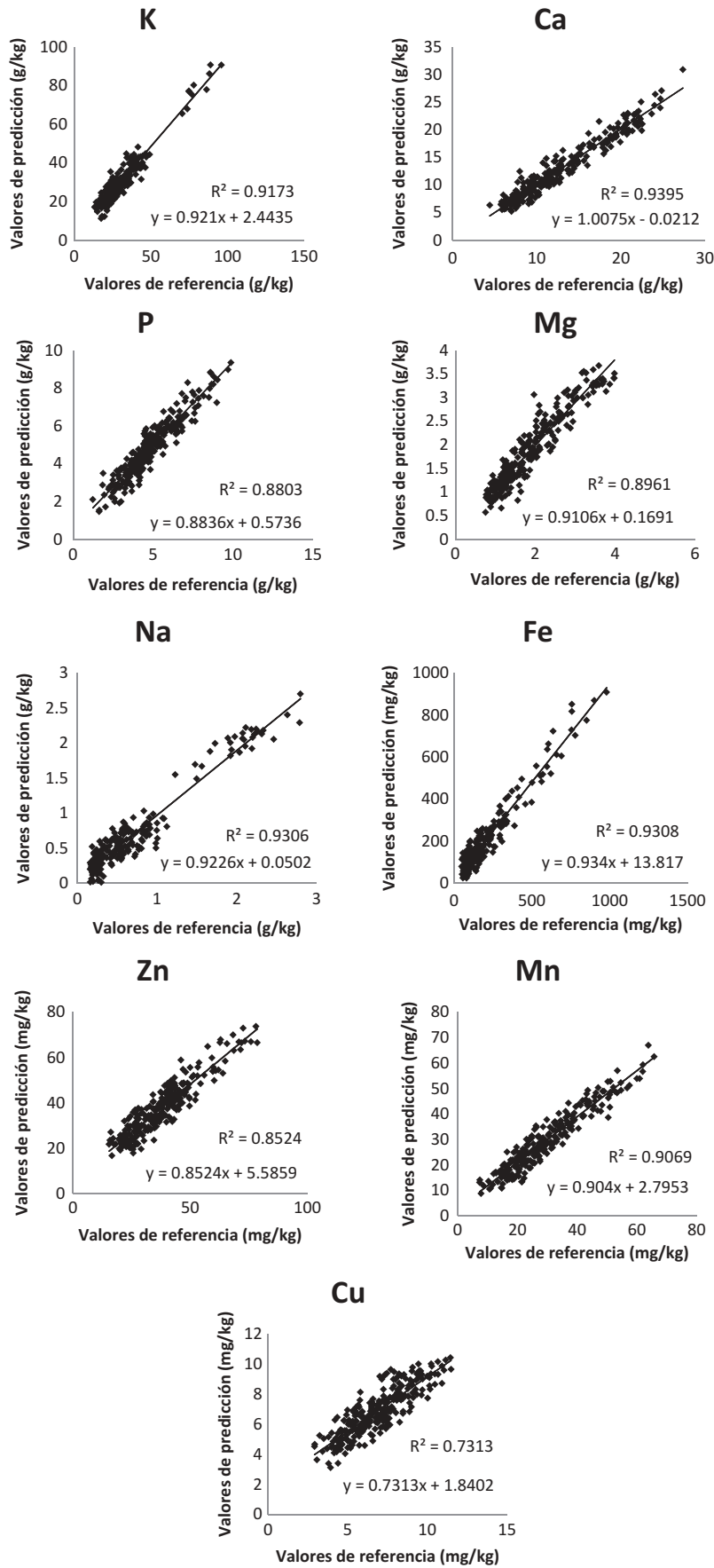


Figura 1. Representación gráfica de los valores de referencia frente a los valores de predicción en validación cruzada respecto al contenido en minerales de *Brassica rapa*.

Figure 1. Scatter plot of reference data vs. predicted values by NIRS of mineral content in *Brassica rapa*.

Tabla 4. Estadísticos de la validación externa (n = 69) aplicados a las ecuaciones de calibración del contenido mineral de *Brassica rapa*.Table 4. Statistics of external validation (n = 69) applied to the calibration equations of mineral content in *Brassica rapa*.

Componente	Intervalo	Media	SD ^a	SEP ^b	r ² _{ve} ^c	RPD _{ve} ^d	RER ^e	CV ^f
K (g/kg)	14,96–83,2	31,08	12,23	4,90	0,86	2,68	13,93	15,77
Ca (g/kg)	5,69–30,14	13,21	5,42	1,66	0,91	3,10	14,73	12,57
P (g/kg)	1,74–9,59	4,80	1,60	0,86	0,73	1,83	9,13	17,92
Mg (g/kg)	0,78–4,05	1,93	0,82	0,32	0,85	2,50	10,22	16,58
Na (g/kg)	0,17–2,64	0,67	0,57	0,21	0,87	2,71	11,76	31,34
Fe (mg/kg)	55–917	217,56	193,01	60,48	0,90	3,11	14,25	27,80
Zn (mg/kg)	16,57–71,57	36,84	11,59	5,83	0,80	1,76	9,43	15,83
Mn (mg/kg)	9–67,27	29,88	13,01	5,72	0,81	2,18	10,19	19,14
Cu (mg/kg)	3,32–11,18	6,79	1,81	1,13	0,62	1,35	6,96	16,64

Notas:

^aDesviación estándar de los datos de referencia del colectivo de validación externa.^bError estándar de la predicción.^cCoefficiente de determinación de la validación externa.^dRelación entre la desviación estándar y el error estándar de la predicción.^eRelación entre el intervalo de datos y el error estándar de la predicción.^fCoefficiente de variación (%): Relación entre el SEP y valor medio.

Notes:

^aStandard deviation of the reference data of external validation.^bStandard error of prediction.^cCoefficient of determination in the external validation.^dRatio Performance Deviation: Ratio of the standard deviation to standard error of prediction.^eRatio of the range to standard error of prediction.^fCoefficient of variation (%): Ratio of SEP to mean.

en calcio que es altamente biodisponible debido a estar asociado con bajos niveles de los ácidos oxálico y fítico (Lucarini, Canali, Cappelloni, Di Lullo, & Lombardi-Boccia, 1999).

En el caso de K, Na y Mg se obtuvieron valores de RPD_{ve} iguales o superiores a 2,5 y valores de RER superiores a 10, lo que las define como calibraciones aceptables para la predicción de estos minerales. El modelo desarrollado para el Mn obtuvo un valor de RPD_{ve} de 2,18 y de RER superior a 10, indicando que la ecuación de calibración solamente es utilizable para realizar predicciones cuantitativas aproximadas del contenido mineral. Los estadísticos obtenidos en la validación externa de las ecuaciones de P y Zn nos indican que solamente pueden ser utilizadas para asignar las muestras analizadas a grupos de alto, medio y bajo contenido para estos minerales. Finalmente, la ecuación obtenida para Cu no permite predecir de forma fiable el contenido de este mineral a partir de sus espectros NIRS, como ya había sido puesto en evidencia para este mismo mineral en trabajos previos de Cozzolino y Moron (2004) y de Martínez et al. (2014). Por lo tanto, sería necesario aumentar el colectivo de muestras de calibración con nuevas muestras que aumenten el intervalo de variabilidad respecto al contenido en este mineral, con vistas a seguir estudiando el potencial de la técnica NIRS para predecir este mineral.

Conclusiones

Se han desarrollado por primera vez ecuaciones de calibración que permiten la utilización de la espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS) para el análisis rápido, simultáneo y preciso del contenido en Ca, Fe, K, Na y Mg en muestras de nabizas y grelos, al mismo tiempo que se puede obtener también una estimación aproximada del contenido en Mn, P y Zn.

Estos resultados demuestran la utilidad de la técnica NIRS como una herramienta fundamental tanto en los programas de mejora genética de la calidad de *Brassica rapa* L. var. *rapa*, (facilitando y abaratando las tareas de cribado,

caracterización y selección de genotipos), como en los trabajos de control de la calidad nutritiva de los productos obtenidos.

Agradecimientos

Agradecimiento al Ministerio de Economía y Competitividad del gobierno español por la financiación del proyecto: *Genética y Mejora de Brasicas hortícolas: papel de los metabolitos secundarios*. Referencia AGL2012-35539.

Declaración de divulgación

No hay posible conflicto de intereses por los autores.

Referencias

- Association of Official Analytical Chemists. (1991). Official Methods 991.25. Second supplement. In K. Helrich (Eds.), *Official methods of analysis* (15th ed.). Arlington, VA: Author.
- Bagchi, T. B., Sharma, S., & Chattopadhyay, K. (2016). Development of NIRS models to predict protein and amylose content of brown rice and proximate compositions of rice bran. *Food Chemistry*, *191*, 21–27. doi:10.1016/j.foodchem.2015.05.038
- Barnes, R. J., Dhanoa, M. S., & Lister, S. J. (1989). Standard Normal Variate Transformation and De-trending of Near-infrared Diffuse Reflectance Spectra. *Applied Spectroscopy*, *43*, 772–777. doi:10.1366/0003702894202201
- Chavez, P.-F., Sacré, P.-Y., De Bleye, C., Netchacovitch, L., Mantanus, J., Motte, H. . . . Ziemons, E. (2015). Active content determination of pharmaceutical tablets using near infrared spectroscopy as process analytical technology tool. *Talanta*, TALD1501660. doi:10.1016/j.talanta.2015.08.018
- Cozzolino, D., Fassio, A., & Fernández, E. (2003). Uso de la Espectroscopía de Reflectancia en el Infrarrojo Cercano para el análisis de calidad de ensilaje de maíz. *Agricultura Técnica*, *63*(4), 387–393. doi:10.4067/s0365-28072003000400007
- Cozzolino, D., & Moron, A. (2004). Exploring the use of Near Infrared Reflectance Spectroscopy (NIRS) to predict trace minerals in legumes. *Animal Feed Science and Technology*, *111*, 161–173. doi:10.1016/j.anifeedsci.2003.08.001

- De Haro, A., Del Río, M., Cartea, E., & Ordás, A. (2006). Mejora de la calidad en especies de *Brassica*. In G. Llácer, M. J. Díez, J. M. Carrillo, & M. Badenes (Eds.), *Mejora genética de la calidad* (pp. 415–447). España: Editorial Universidad de Valencia.
- Dimov, Z., Suprianto, E., Hermann, F., & Möllers, C. (2012). Genetic variation for seed hull and fibre content in a collection of European winter oilseed rape material (*Brassica napus* L.) and development of NIRS calibrations. *Plant Breeding*, 131, 361–368. doi:10.1111/pbr.2012.131.issue-3
- Dos Santos, A. M. P., Lima, J. S., Anunciação, D. S., Souza, A. S., Dos Santos, D. C. M. B., & Matos, G. D. (2013). Determination and Evaluation Employing Multivariate Analysis of the Mineral Composition of Broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *Italica*). *Food Analytical Methods*, 6, 745–752. doi:10.1007/s12161-012-9475-6
- Farnham, M. W., Wilson, P. E., Stephenson, K. K., & Fahey, J. W. (2004). Genetic and environmental effects on glucosinolate content and chemoprotective potency of broccoli. *Plant Breeding*, 123, 60–65. doi:10.1046/j.0179-9541.2003.00912.x
- Feng, F., Wu, Q., & Zeng, L. (2015). Rapid analysis of diesel fuel properties by Near Infrared Reflectance Spectra. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 149, 271–278. doi:10.1016/j.saa.2015.04.095
- Font, R., Del Río, M., Fernández, J. M., & De Haro, A. (2003). Acid Detergent Fiber Analysis in oilseed Brassicas by Near-infrared Spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 2917–2922.
- Font, R., Del Río-Celestino, M., Cartea, E., & De Haro-Bailón, A. (2005). Quantification of glucosinolates in leaves of leaf rape (*Brassica napus* ssp. *pabularia*) by near-infrared spectroscopy. *Phytochemistry*, 66(2), 175–185. doi:10.1016/j.phytochem.2004.11.011
- Font, R., Del Río-Celestino, M., & De Haro-Bailón, A. (2006). The use of near-infrared spectroscopy (NIRS) in the study of seed quality components in plant breeding programs. *Industrial Crops and Products*, 24, 307–313. doi:10.1016/j.indcrop.2006.06.012
- Foster, A. J., Kakani, V. G., Ge, J., & Mosali, J. (2013). Rapid assessment of bioenergy feedstock quality by near infrared reflectance spectroscopy. *Agronomy Journal*, 105(6), 1487–1497. doi:10.2134/agronj2013.0100
- García, S., Gálvez, L. N., Alonso, A., Agulló, E., Rubio, F., Ruiza, J. J., & Moral, R. (2012). Quality assessment of tomato landraces and virus-resistant breeding lines: Quick estimation by near infrared reflectance spectroscopy. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92, 1178–1185. doi:10.1002/jsfa.4661
- Gómez, C., & Prakash, S. (1999). Origin and domestication. In C. Gómez-Campo (Ed.), *Biology of Brassica coenospecies* (pp. pp. 33–58). Amsterdam: Elsevier Science B.V.
- González, I., Hernández, J. M., & González, J. M. (2007). Use of NIRS technology with a remote reflectance fibre-optic probe for predicting mineral composition (Ca, K, P, Fe, Mn, Na, Zn), protein and moisture in alfalfa. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 387, 2199–2205. doi:10.1007/s00216-006-1039-4
- Guo, Y., Ni, Y., & Kokot, S. (2016). Evaluation of chemical components and properties of the jujube fruit using near infrared spectroscopy and chemometrics. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 153, 79–86. doi:10.1016/j.saa.2015.08.006
- Hruschka, W. R. (2001). Data Analysis Wavelength Selection Methods. In P. C. Williams & K. H. Norris (Eds.), *Near infrared technology in the agricultural, food industries* (pp. 35–55). St. Paul, MN: American Association of Cereal Chemist.
- Isaac, R. A., & Johnson, W. C. (1990). Collaborative study of wet and dry ashing techniques for the elemental analysis of plant tissue by atomic absorption spectrophotometry. *Journal of AOAC International*, 58 (3), 436–440.
- Jahangir, M., Kim, H. K., Choi, Y. H., & Verpoorte, R. (2009). Health-Affecting Compounds in Brassicaceae. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 8(2), 31–43. doi:10.1111/j.1541-4337.2008.00065.x
- Kim, Y.-J., Lee, H. J., Shin, H.-S., & Shin, Y. (2014). Near-infrared Reflectance Spectroscopy as a Rapid and Non-destructive Analysis Tool for Curcuminoids in Turmeric. *Phytochemical Analysis*, 25, 445–452. doi:10.1002/pca.v25.5
- Kopsell, D. E., Kopsell, D. A., Lefsrud, M. G., & Curran-Celentano, J. (2005). Variability in elemental accumulations among leafy *Brassica oleracea* cultivars and selections. *Journal of Plant Nutrition*, 27(10), 1813–1826. doi:10.1081/PLN-200026431
- Lee, M.-S., Hwang, Y.-S., Lee, J., & Choung, M.-G. (2014). The characterization of caffeine and nine individual catechins in the leaves of green tea (*Camellia sinensis* L.) by near-infrared reflectance spectroscopy. *Food Chemistry*, 158, 351–357. doi:10.1016/j.foodchem.2014.02.127
- Liao, H., Wu, J., Chen, W., Guo, W., & Shi, C. (2012). Rapid diagnosis of nutrient elements in fingered citron leaf using near infrared reflectance spectroscopy. *Journal of Plant Nutrition*, 35(11), 1725–1734. doi:10.1080/01904167.2012.698352
- Lucarini, M., Canali, R., Cappelloni, M., Di Lullo, G., & Lombardi-Boccia, G. (1999). In vitro calcium availability from Brassica vegetables (*Brassica oleracea* L.) and as consumed in composite dishes. *Food Chemistry*, 64, 519–523. doi:10.1016/S0308-8146(98)00159-9
- Martens, H., & Naes, T. (1989). *Multivariate calibration*. Chichester: John Wiley and Sons.
- Martínez, D., Font, R., Gómez, P., Blanco, T., & Del Río, M. (2014). Determining the mineral composition in *Cucurbita pepo* fruit using near infrared reflectance spectroscopy. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(15), 3171–3180. doi:10.1002/jsfa.6667
- Menesatti, P., Antonucci, F., Pallottino, F., Rocuzzo, G., Allegra, M., Stagno, F., & Intrigliolo, F. (2010). Estimation of plant nutritional status by Vis-NIR spectrophotometric analysis on orange leaves [*Citrus sinensis* (L) osbeck cv. tarocco]. *Biosystems Engineering*, 105, 448–454. doi:10.1016/j.biosystemseng.2010.01.003
- Murray, I. (1986). Near infrared analysis of forages. In W. Haresign & D. J. A. Cole (Eds.), *Recent advances in animal nutrition. Studies in the agricultural and food sciences* (pp. 141–156). London: Butterworths, Reading.
- Norris, K. H., Barnes, R. F., Moore, J. E., & Shenk, J. S. (1976). Predicting forage quality by infrared reflectance spectroscopy. *Journal of Animal Science*, 43, 889–897.
- Plans, M., Simó, J., Casañas, F., & Sabaté, J. (2012). Near-Infrared Spectroscopy Analysis of Seed Coats of Common Beans (*Phaseolus vulgaris* L.): A Potential Tool for Breeding and Quality Evaluation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 706–712. doi:10.1021/jf204110k
- Prakash, O. (1961). *Food and drinks in ancient India* (pp. 165–168). Delhi: Munshi Ram Manohar Lal.
- Rosa, E. A. S. (1999). Chemical composition. In C. Gómez-Campo (Eds.), *Biology of Brassica Coenospecies* (pp. 315–357). Amsterdam: Elsevier Science B.V.
- Sánchez, M.-T., Garrido-Varo, A., Guerrero, J.-E., & Pérez-Marín, D. (2013). NIRS technology for fast authentication of green asparagus grown under organic and conventional production systems. *Postharvest Biology and Technology*, 85, 116–123. doi:10.1016/j.postharvbio.2013.05.008
- Schmitt, S., Garrigues, S., & De La Guardia, M. (2014). Determination of the mineral composition of foods by infrared spectroscopy: A review of a green alternative. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 44(2), 186–197. doi:10.1080/10408347.2013.835695
- Shenk, J. S., & Westerhaus, M. O. (1991). Population definition, sample selection, and calibration procedures for Near Infrared Reflectance Spectroscopy. *Crop Science*, 31, 469–474. doi:10.2135/cropsci1991.0011183X003100020049x
- Shenk, J. S., & Westerhaus, M. O. (1996). Calibration the ISI way. In A. M. C. Davies & P. Williams (Eds.), *Near infrared spectroscopy: The future waves* (pp. pp. 198–202). Chichester: NIR Publications.
- Shenk, J. S., & Westerhaus, M. O. (1993). *Analysis of agriculture and food products by near infrared reflectance spectroscopy*. [Monograph]. p116. Port Matilda, PA: Infrasoftware International.
- Shenk, J. S., Workman, J. J., Jr., & Westerhaus, M. O. (1992). Application of NIR spectroscopy to agricultural products. In D. A. Burns & E. W. Ciurczak (Eds.), *Handbook of Near-Infrared Analysis* (pp. 383–431). New York, NY: Dekker.
- Traka, M., & Mithen, R. (2009). Glucosinolates, isothiocyanates and human health. *Phytochemistry Reviews*, 8, 269–282. doi:10.1007/s11101-008-9103-7
- US Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Nutrient Data Laboratory. (2015, May). USDA National Nutrient Database for

- Standard Reference, Release 27 (revised). Version Current. Retrieved from <http://www.ars.usda.gov/bahnrc/ndf>
- Van Maarschalkerweerd, M., & Husted, S. (2015). Recent developments in fast spectroscopy for plant mineral analysis. *Frontiers in Plant Science*, 6, 169. doi:10.3389/fpls.2015.00169
- Villatoro, M., Font, R., Saha, S., Obregón, S., Anter, J., Muñoz, A. . . . Del Río, M. (2012). In vivo biological activity of rocket extracts (*Eruca vesicaria* subsp. *sativa* (Miller) Thell) and sulforaphane. *Food and Chemical Toxicology*, 50(5), 1384–1392. doi:10.1016/j.fct.2012.02.017
- Villatoro, M., Moreno, R., Muñoz, A., Cardeñosa, V., Amaro, M. Á., Font, R., & Del Río, M. (2012). Characterization and prediction by near-infrared reflectance of mineral composition of rocket (*Eruca vesicaria* subsp. *sativa* and *Eruca vesicaria* subsp. *vesicaria*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92(7), 1331–1340. doi:10.1002/jsfa.v92.7
- Ward, A., Nielsen, A. L., & Møller, H. (2011). Rapid Assessment of Mineral Concentration in Meadow Grasses by Near Infrared Reflectance Spectroscopy. *Sensors*, 11, 4830–4839. doi:10.3390/s110504830
- Williams, P. C. (2001). Implementation of Near-Infrared technology. In P. C. Williams & K. H. Norris (Eds.), *Near infrared technology in the agricultural, food industries* (pp. 145–169). St. Paul, MN: American Association of Cereal Chemist.
- Williams, P. C., & Sobering, D. C. (1996). How do we do it: A brief summary of the methods we use in developing near infrared calibrations. In A. M. C. Davies & P. C. Williams (Eds.), *Near Infrared Spectroscopy: The Future Waves* (pp. 185–188). Chichester: NIR Publications.

1 **Analysis of total and individual glucosinolates in turnip greens and turnip tops**
2 **(*Brassica rapa* L. subsp. *rapa*) by reflectance in near-infrared spectroscopy.**

3

4 ***S. Obregón-Cano*^{1,*}, *R. Moreno-Rojas*², *M.E. Cartea-González*³ and *A. De Haro-*
5 ***Bailón*¹****

6 ¹ Department of Plant Breeding, Institute for Sustainable Agriculture, Spanish Council
7 for Scientific Research, (CSIC), Alameda del Obispo s / n, CP 14004. Córdoba,
8 Spain.

9 ² Bromatology and Food Technology Department, Faculty of Veterinary, University of
10 Córdoba, Campus Rabanales, Edif. Darwin-Anexo, Córdoba, Spain.

11 ³ Department of Plant Genetics, Biology Mission of Galicia, Spanish Council for
12 Scientific Research, (CSIC), CP 36080 Pontevedra, Spain.

13

14 **Abstract**

15 This work presents the study of a fast, non-destructive method for the analysis of the
16 total (tGSL) and individual contents of glucosinolates in freeze-dried samples of turnip
17 greens and turnip tops (*Brassica rapa* subsp. *rapa*) using Near Infrared Reflectance
18 spectroscopy (NIRS). The NIR spectra of the samples (n=351) were recorded and
19 spectral pretreatments (SNV+DT) used. The modified partial least square method and
20 the principal components analysis developing calibration equations were applied. The
21 resulting models were satisfactory, with calibration coefficient values from 0.72 (GBN)
22 to 0.98 (tGSL). The prediction capacity of the calibration equations obtained was
23 assessed by means of a batch of independent samples (n=70) from the calibration group.
24 The determination coefficients (r^2_{ve}) and prediction errors (SEP) obtained in the external
25 validation for the different glucosinolates were: GNA=0.94 (SEP=3.49); PRO=0.41
26 (SEP=1.08); GBN=0.55 (SEP=0.60); tGSL=0.96 (SEP=3.28). The calibration equations
27 obtained were accurate enough for a fast, non destructive and reliable analysis of the
28 content in GNA and tGSL directly from NIR spectra. The equations for PRO and GBN
29 can be employed to identify samples with high, medium and low contents.

30

31 **Key words:** NIRS, glucosinolates, turnip greens, turnip tops, *Brassica rapa*.

32

33

34 **Introduction**

35 Green vegetables have become indispensable components in a balanced diet. Plants
36 belonging to different species of *Brassica* are consumed world-wide, their chief
37 consumers being China, India, Russia, Korea and Japan¹. The importance of these
38 greens lies in their high content of general antioxidant components (vitamin C,
39 carotenoids and phenolic compounds) and other specific compounds of the
40 *Brassicaceae* family (glucosinolates), which promote good health². *Brassica rapa* was
41 the first *Brassica* species domesticated by humans thousands of years ago, appearing
42 already in sanskrit literature under the name Siddharta, which proves the antiquity of the
43 crop³. Numerous subspecies of *B. rapa* originated in two independent centers, one in
44 Europe for the oleaginous types and another in Asia, which triggered the horticultural
45 forms⁴.

46 In northern Spain and Portugal, horticultural crops of *Brassica rapa* have a great
47 tradition, distribution and consumption, both fresh and conserved⁵. From the same plant
48 are harvested turnips, which are the thickened root (hypocotyl), turnip greens which are
49 the vegetative leaves, and turnip tops which are the stems together with the floral leaves
50 prior to the plant's flowering⁶.

51 Currently, the consumption of foods of a vegetable origin, rich in phytochemicals, is
52 one of the vital factors for our well-being and the promotion of good health by
53 preventing various complaints like cancer, inflammations, cardiovascular and
54 neurodegenerative diseases (Alzheimer's, Parkinson's, cataracts) and depression⁷. In
55 particular, potential protection against degenerative diseases by glucosinolates and their
56 enzymatic degradation products has been studied for nearly 30 years and has been
57 exhaustively reviewed⁸⁻¹². Considering that the chemoprotective effects of *Brassica*

58 genes have been directly related to their content in glucosinolates, the determination of
59 the glucosinolate profiles in a *Brassica* vegetable continue to be a necessary step in the
60 study of their chemoprotective, antimutagenic and anticancerigenous activity.

61 Glucosinolates are β -thioglucoside-N-hydroxysulfates (*cis-N*-hydroximosulfate esters)
62 and sulphur rich. They are anionic secondary metabolites found almost exclusively in
63 *Brassica* plants¹³. At present, over 120 structures of individual glucosinolates are
64 known, mainly differing in their lateral chains, and they are classified as being aliphatic,
65 aromatic and indolic, based on the amino acids from which they are derived¹⁴.
66 Methionine and cysteine are natural donors and L-tryptophan gives rise to indolic
67 glucosinolates¹⁵. Glucosinolates are hydrolized by an endogenous thioglucoside called
68 myrosinase in order to produce a wide range of degradation products (isothiocyanates,
69 nitriles, epithionitriles, oxazolidine-2-thione, and thiocyanates) with diverse biological
70 activities¹⁶. Among its degradation products, isothiocyanates are extremely powerful
71 and have shown a notable capacity for acting in the carcinogenesis process because they
72 affect the three stages: the initiation of the tumor, promotion and progression stages and
73 also in the suppression of the final steps of carcinogenesis, i.e. angiogenesis and
74 metastasis¹².

75 A reference analysis of glucosinolates is a complex task and involves a high cost and
76 specialized workers. It consists of a double extraction and a desulfatation carried out by
77 physical and chemical methods and, as a final step, the glucosinolate extract is analyzed
78 by high performance liquid chromatography (HPLC)¹⁷. Among innovatory methods,
79 near infrared spectroscopy (NIRS) is a fast, accurate, easy-to-operate, non destructive
80 and non contaminant technique^{18,19}. It is employed to predict different groups of
81 compounds in *Brassica* sp.: fatty acids, glucosinolates, and fiber²⁰⁻²⁴. NIR spectroscopy
82 is considered to be the most advanced technique out of those non destructive methods

83 used in quality evaluation with respect to its instrumentation, application, accessories
84 and the chemometric software available.

85 Likewise, most research on glucosinolate content in greens of *Brassica* genus crops
86 have been centered on *Brassica oleracea*²⁵⁻²⁷, and there is relatively little information on
87 glucosinolate patterns in the different crops and different parts of *Brassica rapa* subsp.
88 *rapa*. plants. Consequently, with the increasing interest in this species and its effects on
89 human health, information is required on the profiles and levels of its glucosinolates, as
90 well as modern analytical methods to identify and assess rapidly and reliably their
91 content in the eatable parts of turnip greens and turnip tops.

92 The main objective of this work was to study the possibilities of NIRS for a rapid and
93 accurate analysis of the total and individual content of glucosinolates in turnip greens
94 and turnip top samples.

95 **Material and Methods**

96 **Plant material**

97 In this work, a set of 351 samples of *Brassica rapa* L. ssp. *rapa* from 25 different
98 accessions were used. These accessions came from the Germplasm Bank of *Brassica* at
99 the Biology Mission of Galicia (CSIC, Spain). This material was sown during the
100 seasons 2010-2011, 2011-2012 and 2012-2013 in Córdoba, in a typical Xerofluvents
101 soil (37°51 'N, 4°48'W, Spain), in a random block design with 3 replications and under
102 semiarid climate conditions in Andalusia.

103 The turnip greens and turnip tops were harvested three and four months after their
104 transplantation in the field at the optimal consumption time. Both the turnip greens (4 to
105 5 leaves per plant) and the turnip tops (3 to 4 flower stems per plant) were thoroughly
106 washed with tap water to remove dirt and dust and, finally, they were rinsed with

107 deionized water. Next, they were stored at -80°C until their lyophilization, which was
108 done in Telstar® model Cryodos-50 equipment (Telstar, Terrasa, Spain). The freeze-
109 dried samples were ground in a model A10 IKA-Labortechnik® mill for 20 seconds and
110 stored in a desiccator up to their analysis by the reference method, or scanned by the
111 NIRS instrument. The samples totaled 351 (207 turnip greens and 144 turnip tops), 122
112 of which were harvested in 2010-2011, 154 samples came from the harvest of 2011-
113 2012 and 75 from that of 2012-2013.

114 *Glucosinolate reference analysis method*

115 The glucosinolates were analyzed by High Performance Liquid Chromatography
116 (HPLC) in accordance with protocol ISO 9167-1¹⁷. They were extracted in two stages.
117 First, 100 mg of lyophilized material was weighed and extraction was done in a bath of
118 water at 75°C to deactivate the enzyme myrosinase. The sample was heated for 15 min.
119 in a solution of 2.5 ml aqueous methanol (70%) with the addition of 100 µl of 10 mM
120 glucotropaeolin as an internal pattern. The second extraction stage was performed after
121 a centrifugation process by a new addition of the solution of 2.5 ml of 70% aqueous
122 methanol. One millimeter of an extract of glucosinolates was passed through an ion
123 exchange column containing 1 ml of Sephadex (DEAE-A25, Sigma). Desulfatation was
124 done by the addition of 75 µl of a solution of purified sulfatase (de *Helix pomatia*,
125 Sigma). The desulfatated glucosinolates were eluted with 2.5 ml of Milli-Q (Millipore)
126 ultra pure water, and then analyzed in a Waters HPLC model 600 apparatus, equipped
127 with a model 486 detector of ultraviolet-visible absorbance at a wavelength of 229 nm
128 (Waters). The glucosinolates were separated using a Lichrospher 100 RP-18 column
129 with LiChroCART 125-4 of 5 micron particle size (Merck). The HPLC solvents and
130 gradient were established in accordance with protocol ISO¹⁷. The amount of each
131 individual glucosinolate present in the sample was calculated through the internal

132 pattern and expressed as micromoles per gram of dry weight of material. The HPLC
133 chromatogram was compared with the profile of desulfo-glucosinolates of certified
134 reference materials according to that recommended by the EU and ISO (CRMs 366, 190
135 and 367)²⁸. The total content of glucosinolates was calculated as the sum of all the
136 individual glucosinolates present in the sample. The results of the data were analyzed
137 using the Waters Millennium 32 work computer program.

138 *Development of NIRS equations*

139 The spectra of the samples were recorded with a model 6500 (Foss-NIRSystems®, Inc.,
140 Silver Spring, MD, EE.UU.) near infrared spectrophotometer in the reflectance mode.
141 For each sample, one spectrum was obtained. The samples were placed in a capsule 3
142 cm in diameter made of quartz glass and anodized aluminium to prevent interferences in
143 their absorption. The reflectance spectra of each sample were scanned in the wavelength
144 range of 400 to 2500 nm, at 2 nm intervals. Spectral data and their chemometric
145 analysis were collected with the computer program WinISI II v1.50 (Infrasoft
146 International, Port Matilda, PA, EE.UU.).

147 The atypical spectral values were detected by a Principal Component Analysis (PCA),
148 which was applied to the whole population based on the calculation of the Mahalanobis
149 distance (H)^{29,30}. In addition to being a tool for the selection of samples from the
150 calibration set, it is also very useful in the analysis for the conversion of the original
151 spectra data (absorbance values) into new orthogonal variables (principal components),
152 thus eliminating collinearity (redundant information)³¹. The distances between the
153 spectra of the different samples with respect to the mean of the spectrum were
154 calculated. The algorithm CENTER included in the program WinISI II (versión 1.50
155 Infrasoft International, Port Matilda, PA, EE.UU.) was employed to calculate the H
156 distances between the spectra of the different samples with respect to the mean of the

157 spectrum. In agreement with the work of Shenk and Westerhaus²⁹, the samples with an
158 H value of over 3 units were defined as being atypical spectra and they were removed
159 for the development of the equations. A total of 4 spectra were eliminated from the set
160 of samples used in the work. The final number of samples selected was 347, the
161 calibration set was composed of 277 samples and it was employed to constitute the
162 different calibration equations; the external validation set was formed by 20% of the
163 total samples (n=70) and was used to assess the prediction capacity of each of the
164 equations developed. The external validation samples were selected by means of their
165 ranking in terms of their H values, selecting 1 sample from each 5 on the list²⁹. Thus,
166 the samples selected represented all the variability in the whole of the population³². In
167 order to set up the calibration equations, regression by the minimum partial least
168 squares method (MPLS) was applied. This method's usefulness has been demonstrated
169 in other works for the evaluation of glucosinolate content, employing the whole
170 spectrum range (400 - 2500 nm)^{33,21,23}.

171 The spectrum correction procedure SNV + DT was used. The latter was provided by the
172 WinISI program for the elimination of dispersion due to the effects caused by the
173 differences in particle size or variations in length halfway between the dispersion of the
174 samples and fitting the baseline³⁴. The treatment selected for a parameter in a data set is
175 not always the best option for the same parameter in any other set of samples³⁵; this
176 confirms the importance of optimizing the treatment for each parameter and data set. In
177 this regard, the mathematical treatments selected and applied to the spectra in our work
178 were (1, 4, 4, 1) and (2, 5, 5, 2), in which: the first number indicates the order of the
179 derivative (first and second derivative of the logarithm of 1 / R); the second number is
180 the breadth or distance between the segments to be subtracted, the third number is the
181 length of the segment to be smoothed, and the fourth number indicates a second

182 smoothing³⁶. The statistics defining the calibration equations obtained are the
183 coefficient of determination (R^2), which shows the variability percentage existing in the
184 glucosinolates concentrations and which is explained by the regression equation, and
185 the standard error of calibration (SEC) which is the standard error of the residuals for
186 the calibration set. It should be noted that the standard calibration error only indicates
187 the fitting of the reference values to the regression line, so that it cannot be considered
188 to be an adequate statistic for assessing the validity of the calibration equation
189 obtained³⁰.

190 The spectrum of the gluconapin standard pattern (3-butenylglucosinolate, Phytoplan
191 Diehm and Neuberger GmbH, Germany) was also recorded in the reflectance mode in
192 the wavelength range of 400 to 2500 nm, at 2 nm intervals.

193 *Equation validation*

194 To evaluate the prediction capacity of the calibration equations two validation models
195 were used, thus permitting a comparison (through different statistics criteria) between
196 the true value (obtained by the reference method) and the estimated value (obtained by
197 NIRS).

198 Cross validation

199 First, a cross validation was made based only on data employed in the calibration stage,
200 with the aim of calculating the optimal number of loading in the regression. The
201 algorithm selects different calibration and validation sets within the population
202 considered, making with each selection a simulation of the regression algorithm^{31,29}.
203 Finally, the calculation program selected the equation which made the smallest standard
204 error of cross validation (SECV). The resulting cross validation statistics were: the
205 coefficient of determination of the cross validation (r^2_{vc}); the standard error of the cross
206 validation (SECV), which represents the standard error of the residuals for the cross

207 validation set; and the RPD (Formula 1) statistic, which is the ratio between the
208 standard deviation and the standard error of cross validation (SD/SECV). RPD_{vc} is a
209 statistic which permits the evaluation of the SECV in terms of the standard deviation of
210 the reference data for the population studied¹⁹.

$$RPD = SD\{[(\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2)(n - k - 1)^{-1}]^{0.5}\}^{-1} \quad (1)$$

211 where y_i = laboratory reference value for the sample; \hat{y}_i = mean NIR value; n = number of
212 samples, k = number of wavelengths used in an equation; SD = standard deviation of
213 chemical data.

214 External validation

215 Second, the calibration equations selected were evaluated with samples which did not
216 participate in the calibration (validation set, n = 70, in our work). The external
217 validation statistics include the coefficient of determination of external validation (r_{ve}^2),
218 the standard error of prediction (SEP), the RPD (which is the ratio SD/SEP), and the
219 RER statistic (Formula 2), which is the ratio between the range of glucosinolate values
220 in the validation set and the standard error of prediction.

$$RER = range\{[(\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2)(n - k - 1)^{-1}]^{0.5}\}^{-1} \quad (2)$$

221 where y_i = laboratory reference value for the sample; \hat{y}_i = mean NIR value; n = number of
222 samples, k = number of wavelengths used in an equation; SD = standard deviation of
223 the chemical data.

224 RPD and RER statistics allow a comparison of the model's performance through
225 populations with different standard deviations³⁷. The best calibration equations for the
226 analysis of glucosinolates were selected taking into account the optimal combination of
227 the following external validation statistics: high determination coefficient values (r_{ve}^2)

228 and high RPD_{ve} and RER values. Those equations in which RPD is over 3 are
229 considered to have an excellent prediction capacity, those with RPD of between 2 and 3
230 permit approximate predictions to be made, and those whose RPD was between 1.5 and
231 2 could only be used as equations classifying groups with a medium-high-low content.
232 Similarly, the RER values obtained with the different calibration equations with a good
233 prediction capacity should be over 10^{38,19}.

234 Other statistics were the bias, or mean of the difference between the reference data and
235 the NIR reflectance data, which is a measurement of the global accuracy of the
236 calibration, and the slope, which indicates the degree at which the predicted NIR
237 reflectance values change in relation to the reference values. A slope of 1 is excellent
238 since it shows that the rate of change in the data set is identical¹⁹.

239 The standard laboratory error (SEL) was determined for the analysis of the
240 glucosinolates and it was compared with the SEP for all the equations. To obtain the
241 total error of the reference method (SEL), 10 samples of turnip greens and turnip tops
242 were selected and analyzed in duplicate at different times and by different analysts. The
243 statistic ratio SEP/SEL related the NIR error to the reference method error.

244 **Results**

245 *Reference analysis of the glucosinolates in the samples.*

246 The glucosinolate concentrations: gluconapin (GNA), glucobrassicinapin (GBN),
247 progoitrin (PRO) and total glucosinolates (t-GSL) were determined in 351 samples of
248 *Brassica rapa* obtained in consecutive years. The result, expressed in micromoles of
249 glucosinolates per gram of dry weight are presented in Table 1, which shows the
250 descriptive statistics, the mean, the range, standard deviation (SD) and the coefficient of
251 variation (CV) for the glucosinolates measured.

252 The glucosinolates were identified by a comparison of the retention times with those of
253 certified standards. Gluconapin showed a wide range (0.42-72), whereas progoitrin and
254 glucobrasicanapin showed narrow ranges. A high CV was observed for individual and
255 total glucosinolates (> 50%), possibly due to the differences between the accessions of
256 *Brassica rapa*.

257 Figure 1 shows the distribution of frequencies of the individual content and total
258 glucosinolates in the samples (n = 351) used in this work.

259 *NIRS calibration and cross validation of glucosinolates.*

260 A PCA was made to detect and eliminate any possible samples whose spectra differed
261 from the whole²⁹. Figure 2 (a) shows the raw spectra (log 1/R) of the lyophilized
262 samples of *Brassica rapa* used in the calibration set. Figure 2 (b) shows the second
263 derivative of the spectra (2, 5, 5, 2; SNV-DT) in the range of 400 to 2500 nm, which
264 was obtained with the aim of identifying and relating the different absorption bands of
265 the spectrum to specific groups influencing the MPLS. The peaks and troughs in Figure
266 2(b) indicate the maximum curvature in the raw spectrum (Figure 2a). The spectrum
267 showed a conspicuous band in the visible region at 674 nm, corresponding to the
268 electronic transitions in the red one, which has been associated with chlorophyll
269 absorption³⁹. Figure 2 (c) shows the second derivative of the mean spectrum of the
270 gluconapin pattern. This is a good way to identify some of the absorbers related directly
271 to gluconapin, which is present in 99% of the *Brassica rapa* samples and which are
272 mainly used in the modeling of the equations. This is of special interest in cases in
273 which the low concentration in the samples of the analyte(s) studied does not explain by
274 itself the high concentrations found⁴⁰. Figure 2 (b) and Figure 2 (c) present considerable

275 spectral similarities over a 1400 to 2316 nm wavelength range. This range could be
276 expected to be useful for quantitative gluconapin studies.

277 Table 2 shows the descriptive statistics, including range, mean and standard deviation
278 (SD), for the glucosinolates measured in the calibration and validation sets established.
279 The range of the sample validation set was included within the range of the sample
280 calibration set; this is a requirement for the generation of a calibration model for a
281 reliable prediction capacity⁴¹.

282 The calibration and cross validation statistics for the equations developed using SNV +
283 DT and the first or second treatment derived are displayed in Table 3. The treatments
284 (1,4,4,1; SNV + DT) and (2,5,5,2; SNV + DT) were applied to the entire spectrum of
285 the calibration set samples. The smallest standard error in the calibration (SEC) and the
286 highest coefficient of determination in the calibration (R^2) were obtained with the
287 transformation into the second derivative (2,5,5,2) of the raw optical data for all the
288 equations constituted. The results in the different statistics, using the first derivative of
289 the spectra, were more deficient and presented lower R^2 and SEC values than those
290 obtained for the second derivative.

291 The calibration equations were estimated by an internal cross validation with the
292 calibration set. They showed values of r^2_{vc} in the cross variation which varied from 0.60
293 for glucobrassicinapin to 0.96 in gluconapin, which also gave lower (1.57) and higher
294 (5.11) of RPD_{vc} , respectively (Table 3).

295 In addition, Figure 3 presents the prediction scatter plots for the glucosinolate
296 concentrations in *Brassica rapa* in the cross validation of the calibration equations
297 constituted. These results probably reflect the different individual components

298 contributing most in the NIRS calibration models. Higher R^2_{vc} values are considered to
299 be better and more accurate for calibrations.

300 *Modified Least Minimum Squares loadings*

301 The scatter plots of the first three loadings of the equation in the second derivative
302 (2,5,5,2) of the gluconapin obtained by MPLS (Figure 4) illustrate the coefficients of
303 regression of each wavelength and indicate which of them principally determines the
304 calibration equation. In the second derivative, peaks pointing downward reflect the
305 positive influence of groups and bonds in the development of the equations, whereas the
306 peaks pointing upward indicate negative correlations. The identification of specific
307 chemical compounds and groups for different wavelengths by the program revealed an
308 association of the MPLS loading for gluconapin with several functional groups. The
309 spectral regions around 1442, 1700, 2052, 2168 and 2300 nm show important
310 contributions to the MPLS model. These could be related to the groups CH-CH₂ (1442
311 nm); to groups CH₃ and groups SH (1700 nm); to protein groups N-H (2052 nm); bonds
312 CH-CH (2168 nm) and to second overtones of groups CH also related proteins (2300
313 nm). Other minor contributions in the development of this factor were the wavelengths
314 related to groups OH relative to water and peaks related to second overtones of groups
315 C = O (1920 nm).

316 *External validations of calibration equations*

317 The calibration equations were evaluated by external validation using data of the
318 validation set, composed of independent external data (Table 2). The validation
319 statistics for the glucosinolates measured in *Brassica rapa* are shown in Table 4.

320 For these mathematical models, r^2_{ve} in the first derivative gave lower values than those
321 obtained for the second one with all the equations. The best predictions were obtained

322 for gluconapin (SEP: 3.49; RPD_{ve}: 4.26) and total glucosinolates (SEP: 3.28; RPD_{ve}:
323 4.93), whereas for the other glucosinolates, progoitrin and glucobrassicinapin, a worse
324 combination of the statistics was obtained, with lower r^2_{ve} , RPD_{ve} and RER. Small
325 differences were found in the biases and the slopes of the equations of the first and
326 second derivative, values close to 0.00 and 1.00, respectively.

327 **Discussion**

328 The individual and total quantification of glucosinolates in samples of eatable green
329 parts of *Brassica rapa* exhibited a wide range due to the harvesting of samples
330 throughout three seasons in different phenological states (greens and tops), which
331 contributed to increasing their overall chemical variability. The glucosinolates found the
332 eatable freeze-dried parts of *Brassica rapa* analyzed in an HPLC were mainly GNA,
333 PRO and GBN. The predominant glucosinolate in all the samples was GNA, and these
334 results are in agreement with those found in the literature, in which a high concentration
335 of this component in this species of *Brassica* was cited⁴²⁻⁴⁴. The low concentrations
336 found in PRO and GBN in the samples analyzed had already demonstrated that the
337 correlation with the spectral information could not be very high. The first and second
338 derivatives were applied for the constitution of the equations, and the statistics for the
339 selection of the most robust and efficient equations for predicting the glucosinolate
340 content were evaluated. The robustness of the method was verified by the application of
341 an external validation of 70 samples outside the calibration set. The calibration
342 equations`performance was assessed using r^2_{ve} and RPD_{ve} and the statistic RER, which
343 was calculated to confirm the accuracy of the calibration. Following the considerations
344 reported by Williams¹⁹ on the estimation of the accuracy of a calibration equation from
345 an external validation, the r^2_{ve} obtained for t-GSL (0,96) and also for GNA (0.94) were
346 indicative of equations with excellent quantitative information, and the RPD values

347 (4.93 and 4.26, respectively) were over 3, which meant that the calibrations developed
348 by MPLS could be used for the screening and be excellent models for the prediction of
349 these glucosinolates in material of *Brassica rapa*¹⁹. However, PRO and GBN gave r^2_{ve}
350 values of (0.41 and 0.55, respectively), which makes them useful for a good
351 classification of samples into groups with high and low contents.

352 Some previous studies have been made on NIRS glucosinolate calibrations in other
353 *Brassica* species due to the commercial interest triggered in this species. Those authors
354 demonstrated the validity of this technique in this type of approach, providing high
355 values in the validation statistics. In *Brassica napus* leaves, r^2_{ve} : values of 0.73 for
356 GNA, 0.78 for PRO, 0.81 for GBN and 0.88 for tGSL in cross validations have been
357 reported²⁰, and other authors have attributed r^2_{ve} : values of 0.74 for tGSL⁴⁵. In intact *B.*
358 *napus* seeds, the r^2_{ve} value cited was tGSL (0.83) for the external validation²². *Brassica*
359 *oleracea* leaves provided the following r^2_{ve} : values: GNA (0.70) and tGSL (0.83) in the
360 cross validation²¹ and r^2_{ve} values in tGSL (0.73) in the external validation⁴⁶. In a freeze-
361 dried *Brassica albograbra* plant, the r^2_{ve} values published were: PRO (0.69), GNA
362 (0.87) and tGSL (0.92), r^2_{ve} : values in PRO (0.34), GNA (0.82) and tGSL (0.91)²⁴. In
363 intact *Brassica juncea* seeds, the r^2_{ve} value published in GNA was of 0.95 and that in
364 tGSL 0.82^{47,21}. In intact *Brassica carinata* seeds, the r^2_{ve} values reported were: in tGSL
365 of 0.93²¹ and 0.88²².

366 In this work, for the first time, calibration equations have been constituted for the
367 analysis of glucosinolates in eatable green parts of *Brassica rapa*. The highest r^2_{ve} and
368 r^2_{ve} values presented were those for GNA (0.96 and 0.94, respectively), and in tGSL
369 (0.97 and 0.96, respectively) they were similar to those published by other authors up to
370 now.

371 NIR calibration for GNA in *Brassica rapa* has been successful thanks to, as well as the
372 study of the wavelengths observed in the second derivative of the spectra in the 400 to
373 2500 nm range of gluconapin (Figure 2c), the study of the principal wavelengths used in
374 the first three loadings of the calibration equation for GNA (Figure 4). Based on the
375 similarities, it would seem that the absorbent groups of the GNA molecule directly
376 participate in the equation. However, the spectra contain all the information on the
377 sample, including its chemical composition and the interactions between the
378 constituents which are responsible for the sample possessing its unique physical and
379 functionality properties¹⁹. Thus, other components (protein, starch, etc.) are also present
380 in freeze-dried *Brassica rapa* which makes it difficult to come to a conclusion about the
381 level of participation of the former in GNA calibration. The principal absorption bands
382 in the spectra (Figure 2b y 2c), which are related to plant pigment absorptions, were
383 seen at 674 nm in the visible region. The NIRS regions showed absorptions at
384 wavelengths 1436 and 1730 nm related to groups CH and C-H₂; at 1920 nm which was
385 attributed to vibrations of OH groups of water; at 2052 it was related to N-H of amide
386 groups; and at 2310 and 2348 nm to stretchings of CH groups and combination bands of
387 methylene groups⁴⁸. Some of these wavelengths were highly participative in the
388 modeling of the first three loadings of the GNA equation in *Brassica rapa* (Figure 4),
389 and they were similar to those cited in the literature in works on other species of
390 *Brassicac*^{46,47,20,21}, although with differences in some specific absorptions as they were
391 other species with a different composition.

392 A rapid analysis which does not need to destroy the sample is one of the main
393 advantages of applying NIR spectroscopy. The results supplied in this work show that
394 Near Infrared spectroscopy is capable of predicting the GNA and tGSL content in
395 greens parts of *Brassica rapa*, with sufficient accuracy for selection and prediction

396 purposes. The inclusion of the different phenological states (turnip greens and turnip
397 tops) collected during three years of *Brassica rapa* samples have increased the
398 robustness of the GNA and tGSL equations in the calibration model, because their inter-
399 specific variability was increased. The equations for GBN and PRO can be used to
400 correctly classify the sample groups in terms of their concentrations into “high” and
401 “low”. Thus, this promising tool which predicts glucosinolate content in *Brassica rapa*
402 subsp. *rapa* represents an advance in the quality management of a product, and an
403 improvement in other acceptance criteria. Similarly, the calibration models constituted
404 in this work can be optimized using sets of additional independent data of subsequent
405 harvests, with the aim of improving their accuracy.

406 ***Abbreviations used***

407 tGSL, total glucosinolates; GNA, gluconapin; GBN, glucobrassicinapin; PRO,
408 progoitrin; H, Mahalanobis distance; MPLS, modified partial least squares; NIRS, near
409 infra-red spectroscopy; PCA, principal component analysis; RER, ratio of the range to
410 standard error of prediction; RPD, ratio of the standard deviation to standard error of
411 prediction; SEC, standard error of calibration; SECV, standard error of cross validation;
412 SEL, standard error of laboratory; SEP, standard error of prediction; SNV-DT, standard
413 normal variate-detrending; R^2 , coefficient of determination in the calibration; r^2_{ev} ,
414 coefficient of determination in the external validation; r^2_{cv} , coefficient of determination
415 in the cross validation.

416

417 **Acknowledgement**

418 We are grateful to the Ministry of Economy and Competitiveness of the Spanish
419 Government for funding the project “*Genética y Mejora de Brassicas hortícolas: papel*
420 *de los metabolitos secundarios*”. Reference AGL2012-35539.

421 **References**

- 422 (1) Faostat, 2013. (<http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/S>)
- 423 (2) D'Antuono, L. F.; Elementi, S. and Neri, R. Exploring new potential health-
424 promoting vegetables: glucosinolates and sensory attributes of rocket salads and
425 related *Diplotaxis* and *Eruca* species. *J. Sci. Food Agr.* **2009**, 89(4): 713-722).
- 426 (3) Prakash, O. Food and drinks in ancient India. *Munshi Ram Manohar Lal*. Delhi,
427 **1961**, pp. 165-168.
- 428 (4) Gómez-Campo, C.; Prakash, S. Origin and domestication. In Biology of *Brassica*
429 coenospecies. C. B. Gómez-Campo Eds.; Elsevier Science B.V.: Amsterdam, **1999**,
430 pp. 33–52.
- 431 (5) De Haro, A.; Del Río, M.; Carrea E.; Ordás, A. In Mejora de la calidad en especies
432 de *Brassica*. *Mejora genética de la calidad*. G. Llácer y M.J. Díez, J.M. Carrillo y
433 M. Badenes, Eds.; Editorial Universidad de Valencia: Valencia, España, **2006**, pp.
434 415-447.
- 435 (6) Baladrón, J.J. (1991). Taxonomía, distribución y estudio agronómico de los cultivos
436 del género *Brassica* en Galicia. Tesis doctoral. Universidad de Santiago de
437 Compostela. España.
- 438 (7) Khalaj, L.; Nejad, S.C.; Mohammadi, M.; Zadeh, S.S.; Pour, M.H.; Ashabi, G., *et al.*
439 Assessing competence of broccoli consumption on inflammatory and antioxidant
440 pathways in restraint-induced models: Estimation in rat hippocampus and prefrontal
441 cortex. *BioMed Res Int.* **2013**, 1–13.

- 442 (8) Verhoeven, D.T.; Goldbohm, R.A.; Van Poppel, G.; Verhagen, H. and Van den
443 Brandt, P.A. Epidemiological studies on *Brassica* vegetables and cancer risk.
444 *Cancer. Epidemiol Biomarkers Prev.* **1996**, *5*, 733–748.
- 445 (9) Fahey, J.W.; Zhang, Y. and Talalay, P.. Broccoli sprouts: an exceptionally rich
446 source of inducers of enzymes that protect against chemical carcinogens. *Proc Natl*
447 *Acad Sci USA* **1997**, *94*,10367–10372.
- 448 (10) Mithen, R.F.; Dekker, M.; Verkerk, R.; Rabot, S. and Johnson, I.T. The nutritional
449 significance, biosynthesis and bioavailability of glucosinolates in human foods. *J*
450 *Sci Food Agric.* **2000**, *80*, 967–984.
- 451 (11) Johnson, I.T. Glucosinolates in the human diet: bioavailability and implications for
452 health. *Phytochem Rev.* **2002**, *1*,183–188.
- 453 (12) Traka, M. and R. Mithen. Glucosinolates, isothiocyanates and human health.
454 *Phytochem. Rev.* **2009**, *8*(1): 269-282.
- 455 (13) Clarke, D. B. Glucosinolates, structures and analysis in food. *Anal. Methods.*
456 **2010**.2(4): 310-325.
- 457 (14) Rosa, E.A.S. Chemical composition. Biology of *Brassica* coenospecies, C. Gómez-
458 Campo (Ed.); Elsevier Science B.V., Amsterdam, **1999**, pp. 315–357.
- 459 (15) Zukalová, H. and J. Vašák. The role and effects of glucosinolates of *Brassica*
460 species - A review. *Rostlinna Vyroba.* **2002**, *48*(4): 175-180.
- 461 (16) Kliebenstein, D.J.; Kroymann, J.; Brown, P.; Figuth, A.; Pedersen, D.; Gershenzon,
462 J.; Mitchell-Olds, T. Genetic control of natural variation in *Arabidopsis*
463 glucosinolate accumulation. *Plant Physiol*, **2001**, *126*, 811–825.
- 464 (17) ISO norm 9167. Rapessed-Determination of glucosinolates content- Part 1: Method
465 using high-performance liquid chromatography. *ISO.* **1992**, 9167-1, 1–9.

- 466 (18) Osborne, B.G. In *Near Infrared Spectroscopy in Food Analysis*. Longman
467 Scientific and Technical, New York, **1986**.
- 468 (19) Williams, P.C. Implementation of Near-Infrared technology. In *Near infrared*
469 *technology in the agricultural, food industries*. Williams, P.C., Norris, K.H. Eds;
470 American Association of Cereal Chemist: St. Paul, Minnesota, USA, **2001**, pp.
471 145–169.
- 472 (20) Font, R.; Del Río-Celestino, M.; Cartea, E.; De Haro-Bailón, A. Quantification of
473 glucosinolates in leaves of leaf rape (*Brassica napus* subsp. *pabularia*) by near-
474 infrared spectroscopy. *Phytochemistry*. **2005**, *66*, 175–185.
- 475 (21) Font, R.; Del Río, M.; De Haro-Bailón, A. The use of near-infrared spectroscopy
476 (NIRS) in the study of seed quality components in plant breeding programs. *Ind.*
477 *Crop. Prod.* **2006**, *24*, 307–313.
- 478 (22) Petisco, C.; García-Criado, B.; Vázquez de Aldana, B.R.; De Haro, A.; García-
479 Ciudad, A. Measurement of quality parameters in intact seeds of *Brassica* species
480 using visible and near-infrared spectroscopy. *Ind. Crop. Prod.* **2010**, *32*, 139–146.
- 481 (23) Wittkop, B.; Snowdon, R.; Friedt, W. New NIRS Calibrations for Fiber Fractions
482 Reveal Broad Genetic Variation in *Brassica napus* Seed Quality. *J. Agric. Food*
483 *Chem.* **2012**, *60*, 2248–2256.
- 484 (24) Chen, J.; Li, L.; Wang, S.; Tao, X.; Wang, Y.; Sun, A.; He, H. Assessment of
485 glucosinolates in chinese kale by near-infrared spectroscopy. *Int. J. Food Prop.*
486 **2014**, *17*, 1668–1679.
- 487 (25) Bachiega, P.; Salgado, J.M.; De Carvalho, J.E.; Ruiz, A.L.T.G.; Schwarz, K.;
488 Tezotto, T.; Morzelle, M.C. Antioxidant and antiproliferative activities in different
489 maturation stages of broccoli (*Brassica oleracea italica*) biofortified with selenium
490 *Food Chem.* **2016**, *190*, 771-776.

- 491 (26) Tian, M.; Xu, X.; Liu, Y.; Xie, L.; Pan, S. Effect of Se treatment on glucosinolate
492 metabolism and health-promoting compounds in the broccoli sprouts of three
493 cultivars. *Food Chem.*, **2016**, *190*, pp. 374-380.
- 494 (27) Øvsthus, I.; Breland, T.A.; Hagen, S.F.; Brandt, K.; Wold, A.B.; Bengtsson, G.B.;
495 Seljåsen, R. Effects of Organic and Waste-Derived Fertilizers on Yield, Nitrogen
496 and Glucosinolate Contents, and Sensory Quality of Broccoli (*Brassica oleracea* L.
497 var. *italica*). *J. Agric. Food Chem.* **2015**, *63* (50), 10757-10767.
- 498 (28) Wathelet, J.P.; Wagstaffe, P.; Boenke, A. The certification of the total glucosinolate
499 and sulphur contents of three rapeseeds (colza), CRMs 190, 366 and 367.
500 Commission of the European Communities, report EUR 13339 EN, **1991**, 1–75.
- 501 (29) Shenk, J.S.; Westerhaus, M.O. Population definition, sample selection, and
502 calibration procedures for near infrared reflectance spectroscopy. *Crop Sci.* **1991**,
503 *31*, 469-474.
- 504 (30) Shenk, J.S.; Westerhaus, M.O. Calibration the ISI way. In: *Near Infrared*
505 *Spectroscopy: The Future Waves*. Davies, A. M. C., Williams, P. C., Eds.; NIR
506 Publications: Chichester, U.K., **1996**, pp 198-202.
- 507 (31) Martens, H.; Naes, T. In *Multivariate calibration*. John Wiley and Sons Eds.;
508 Chichester, UK: **1989**.
- 509 (32) Hruschka, W.R. Data Analysis Wavelength Selection Methods. In *Near infrared*
510 *technology in the agricultural, food industries*. Williams, P.C., Norris, K.H. Eds;
511 American Association of Cereal Chemist; St. Paul, Minnesota, USA: **2001**, pp35-
512 55.
- 513 (33) Font, R.; Del Río, M.; Fernández, J.M.; De Haro-Bailón, A. Acid Detergent Fiber
514 Analysis in Oilseed *Brassicas* by Near-Infrared Spectroscopy. *J. Agric. Food*
515 *Chem.* **2003**, *51*, 2917-2922.

- 516 (34) Barnes, R.J.; Dhanoa, M.S.; Lister, S.J. Standard normal variate transformation and
517 de-trending of near-infrared diffuse reflectance spectra. *Appl. Spectrosc.* **1989** *43*,
518 772–777.
- 519 (35) Núñez-Sánchez, N.; Martínez-Marín, A.L.; Polvillo O.; Fernández-Cabanás V.M.;
520 Carrizosa J.; Urrutia B.; Serradilla J.M. Near Infrared Spectroscopy (NIRS) for the
521 determination of the milk fat fatty acid profile of goats. *Food Chem.*, **2016**, *190*,
522 244-252.
- 523 (36) Shenk, J.S.; Workman, Jr. J.J.; Westerhaus, M.O. Application of NIR spectroscopy
524 to agricultural products. In: *Handbook of Near-Infrared Analysis*. Burns, D.A.,
525 Ciurczak, E.W., Eds.; Dekker Inc., NY, **1992**, pp. 383–431.
- 526 (37) Cozzolino, D.; Moron, A. Exploring the use of near infrared reflectance
527 spectroscopy (NIRS) to predict trace minerals in legumes. *Anim. Feed Sci.Tech.*,
528 **2004** *111*, 161–173.
- 529 (38) Williams, P.C.; Sobering, D.C. How do we do it: a brief summary of the methods
530 we use in developing near infrared calibrations. In *Near Infrared Spectroscopy: The*
531 *Future Waves*. Davies, A.M.C., Williams, P.C., Eds.; NIR Publications: Chichester,
532 U.K. **1996**, pp. 185–188.
- 533 (39) Tkachuk. R.; Kuzina F.D. Chlorophyll analysis of whole rapeseed kernels by near
534 infrared reflectance. *Can. J. Plant Sci.* **1982**, *62*, 875–884.
- 535 (40) Font, R.; Del Río-Celestino, M.; Rosa, E.; Aires A.; and De Haro-Bailón A.
536 Glucosinolate assessment in *Brassica oleracea* leaves by near-infrared
537 spectroscopy. *J. Agr. Sci.* **2005**, *143*(01), 65-73.
- 538 (41) Petisco, C.; García-Criado, B.; Vázquez de Aldana, B.R.; Zabalgogazcoa, I.;
539 Mediavilla, S.; García-Ciudad A. Use of near-infrared reflectance spectroscopy in

540 predicting nitrogen, phosphorus and calcium contents in heterogeneous woody
541 plant species. *Anal Bioanal Chem.* **2005**, 382, 458–465.

542 (42) Cartea, M.E.; De Haro, A.; Obregón, S.; Soengas, P.; Velasco, P. Glucosinolate
543 Variation in Leaves of *Brassica rapa* Crops. *Plant Foods Hum Nutr*, **2012**, 67,283–
544 288.

545 (43) Francisco, M.; Moreno, D.A.; Cartea, M.E.; Ferreres, F.; García-Viguera, C.;
546 Velasco, P. Simultaneous identification of glucosinolates and phenolic compounds
547 in a representative collection of vegetable *Brassica rapa*. *J. Chromatogr.* **2009**,
548 1216, 6611–661.

549 (44) Padilla, G.; Cartea, M.E.; Velasco, P.; De Haro, A.; Ordas, A. Variation of
550 glucosinolates in vegetable crops of *Brassica rapa*. *Phytochemistry.* **2007**, 68,
551 4536- 4545.

552 (45) Míka, V.; Tillmann, P.; Korprna, R.; Nerusil, P.; Kucera, V. Fast prediction of
553 quality parameters in whole seeds of oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Plant soil*
554 *environ* **2003**, 49(4), 141-145.

555 (46) Hernández-Hierro, J.M.; Valverde, J.; Villacreces, S.; Reilly, K.; Gaffney, M.;
556 González-Miret, M.L.; Heredia, F.J.; Downey, J. Feasibility Study on the Use of
557 Visible–Near-Infrared Spectroscopy for the Screening of Individual and Total
558 Glucosinolate Contents in Broccoli. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, 60, 7352–7358.

559 (47) Font, R.; Del Río, M.; Fernández, J.M.; De Haro-Bailón, A. Use of near-infrared
560 spectroscopy for screening the individual and total glucosinolate contents in Indian
561 mustard seed (*Brassica juncea* L. Czern. & Coss.). *J. Agric. Food Chem.* **2004**, 52,
562 3563–3569.

563 (48) Murray, I.; Williams, P.C. Chemical principles of near-infrared technology. In:
564 *Near infrared technology in the agricultural, food industries.* Williams, P.C.,

565 Norris, K.H., Eds.; American Association of Cereal Chemist, St. Paul, Minnesota,
566 USA, **1987**, pp. 17–34.

Tables

Table 1. Summary for glucosinolates of *Brassica rapa* ($\mu\text{mol g}^{-1} \text{dw}^{\text{a}}$).

Component	N ^b	Range	Mean	SD ^c	CV ^d
GNA ^e	351	0.42-72	22.61	14.01	61.96
PRO ^f	351	0.06-11.14	1.84	1.77	96.19
GBN ^g	351	0.01-7.32	1.43	1.11	77.62
t-GSL ^h	351	0.45-76.28	25.58	15.04	58.79

^a Dry weight. ^b Standard deviation of the reference data.

^e Gluconapin. ^f Progoitrin. ^g Glucobrassicinapin.

^h Total glucosinolates.

Table 2. Calibration set and Validation set statistic in *Brassica rapa* ($\mu\text{mol g}^{-1} \text{dw}^{\text{a}}$).

Component	Calibration set (n=277)			Validation set (n=70)		
	Range	Mean	SD ^b	Range	Mean	SD ^b
GNA ^c	0.65-72	22.47	13.82	0.42-64.26	22.49	14.21
PRO ^d	0.06-11.14	1.90	1.85	0.11-5.51	1.67	1.40
GBN ^e	0.04-6.73	1.45	1.08	0.01-7.32	1.29	1.23
t-GSL ^f	0.89-76.28	25.52	14.79	0.45-73.48	25.15	15.46

^a Dry weight. ^b Standard deviation of the reference data. ^c Gluconapin. ^d Progoitrin.

^e Glucobrassicinapin. ^f Total glucosinolates.

Table 3. Calibration and Cross-Validation statistic in *Brassica rapa*.

Component ^a	Calibration						Cross-validation		
	MT ^b	Range	Mean	SD ^c	SEC ^d	R ^{2e}	RPD _{cv} ^f	r _{cv} ^{2g}	SECV ^h
GNA ⁱ	1,4,4,1	0.65-60.97	22.05	13.49	2.85	0.95	3.80	0.93	3.55
PRO ^j	1,4,4,1	0.06-8.32	1.66	1.55	0.70	0.79	1.80	0.68	0.86
GBN ^k	1,4,4,1	0.04-4.08	1.35	0.92	0.55	0.64	1.39	0.49	0.66
t-GSL ^l	1,4,4,1	0.89-76.28	25.36	14.87	2.92	0.96	4.25	0.94	3.50
GNA ⁱ	2,5,5,2	0.65-72	22.09	13.81	2.01	0.98	5.11	0.96	2.70
PRO ^j	2,5,5,2	0.06-7.55	1.67	1.50	0.71	0.78	1.67	0.64	0.90
GBN ^k	2,5,5,2	0.04-4.08	1.35	0.94	0.49	0.72	1.57	0.60	0.60
t-GSL ^l	2,5,5,2	0.89-76.28	25.28	14.82	1.96	0.98	5.61	0.97	2.64

^a Glucosinolates concentration expressed as μmol of glucosinolate per g dry weight basis. ^b Mathematic treatment. ^c Standard deviation. ^d Standard error of calibration. ^e Coefficient of determination in the

calibration. ^f Ratio of the standard deviation of the reference data to standard error of cross-validation. ^g Coefficient of determination in the cross-validation. ^h Standard error in the cross-validation. ⁱ Gluconapin. ^j Progoitrin. ^k Glucobrassicinapin. ^l Total glucosinolates.

Table 4. External Validation statistic for equations of different component developed over *Brassica rapa* (n=70).

Component ^a	MT ^b	Range ^c	Mean ^d	SD ^e	SEP ^f	r _{ev} ^{2g}	Slope ^h	Bias ⁱ	RPD ^j	RER ^k
GNA ^l	1,4,4,1	0.42-64.26	21.91	13.63	3.76	0.92	0.98	-0.01	3.57	16.98
PRO ^m	1,4,4,1	0.11-5.51	1.51	1.31	1.05	0.38	0.77	-0.08	1.00	5.14
GBN ⁿ	1,4,4,1	0.01-2.99	1.10	0.85	0.63	0.51	0.73	-0.05	1.33	4.73
t-GSL ^ñ	1,4,4,1	0.45-73.48	24.64	14.94	4.01	0.93	0.97	-0.27	3.71	18.21
GNA	2,5,5,2	0.42-64.26	22.49	14.21	3.49	0.94	0.93	0.14	4.26	18.29
PRO	2,5,5,2	0.11-5.51	1.60	1.38	1.08	0.41	0.81	-0.09	1.00	5.00
GBN	2,5,5,2	0.01-2.99	1.10	0.85	0.60	0.55	0.78	-0.10	1.33	4.97
t-GSL	2,5,5,2	0.45-73.48	25.26	15.55	3.28	0.96	0.94	-0.35	4.93	22.27

^a Glucosinolates concentration expressed as μmol of glucosinolate per g dry weight basis. ^b Mathematic treatment. ^c Range of the reference data in the external validation set. ^d Mean value of the reference data in the external validation. ^e Standard deviation of the reference data in the external validation set. ^f Standard error of the prediction. ^g Coefficient of determination in the external validation. ^h Slope. ⁱ The difference between the mean real value and the mean estimated value for the validation set samples. ^j Ratio of the standard deviation to SEP. ^k Ratio of the range to SEP. ^l Gluconapin. ^m Progoitrin. ⁿ Glucobrassicinapin. ^ñ Total glucosinolates.

Figures

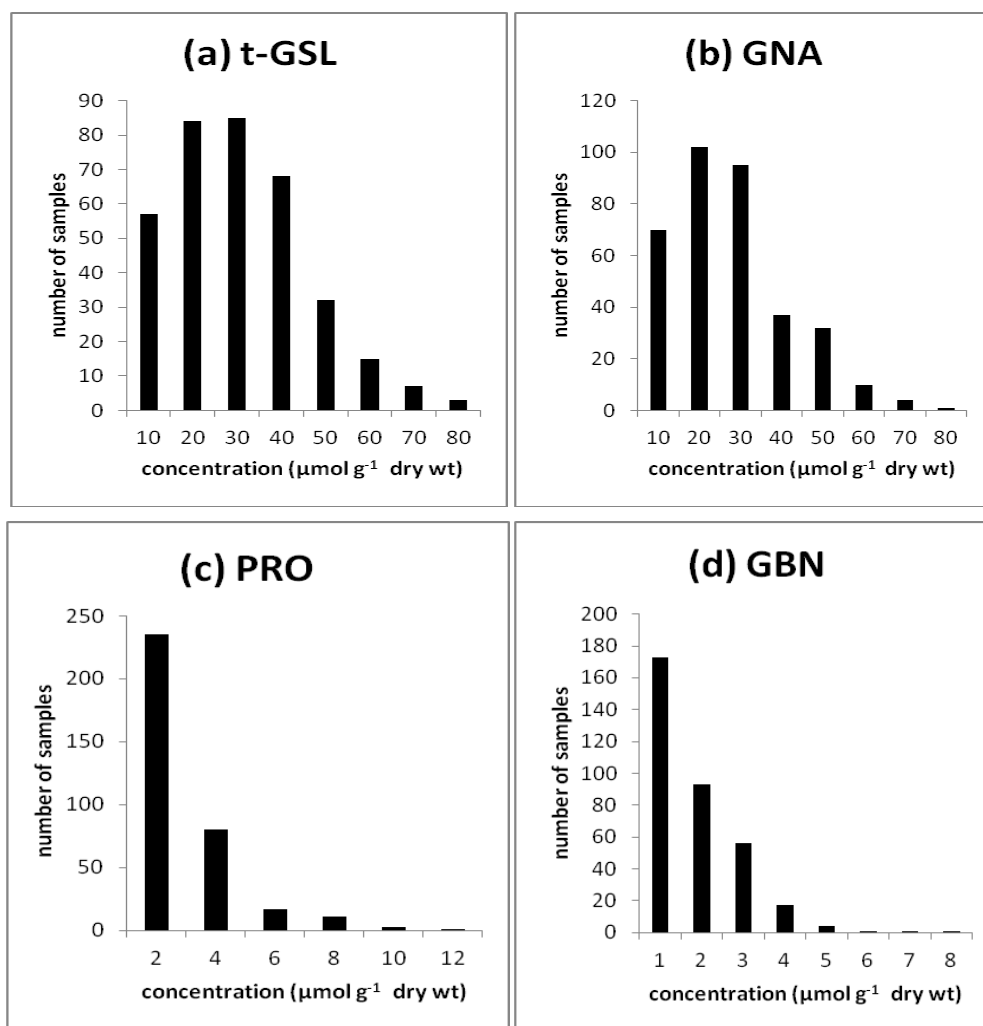
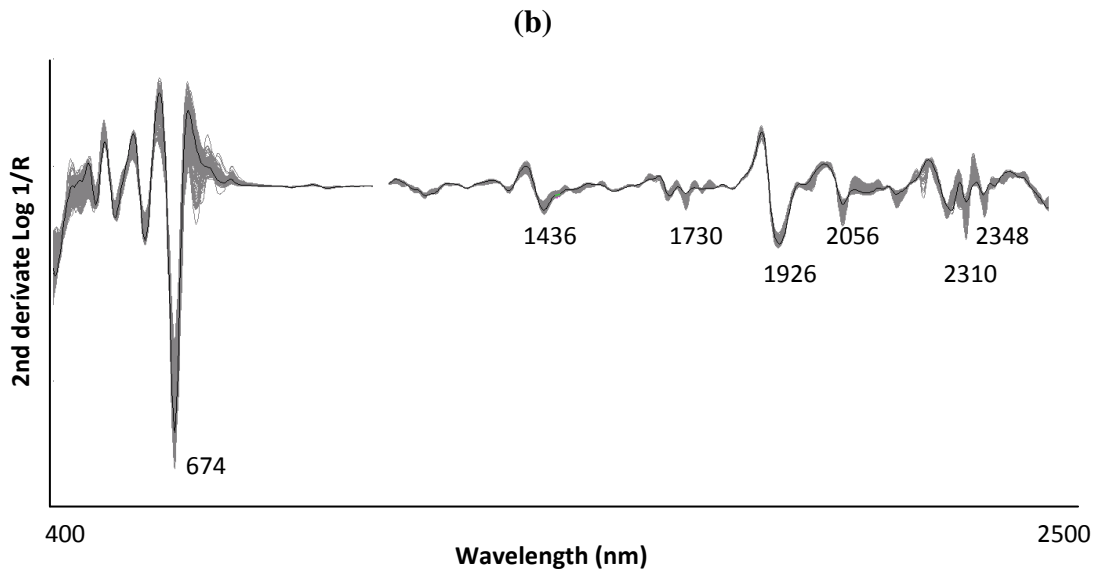
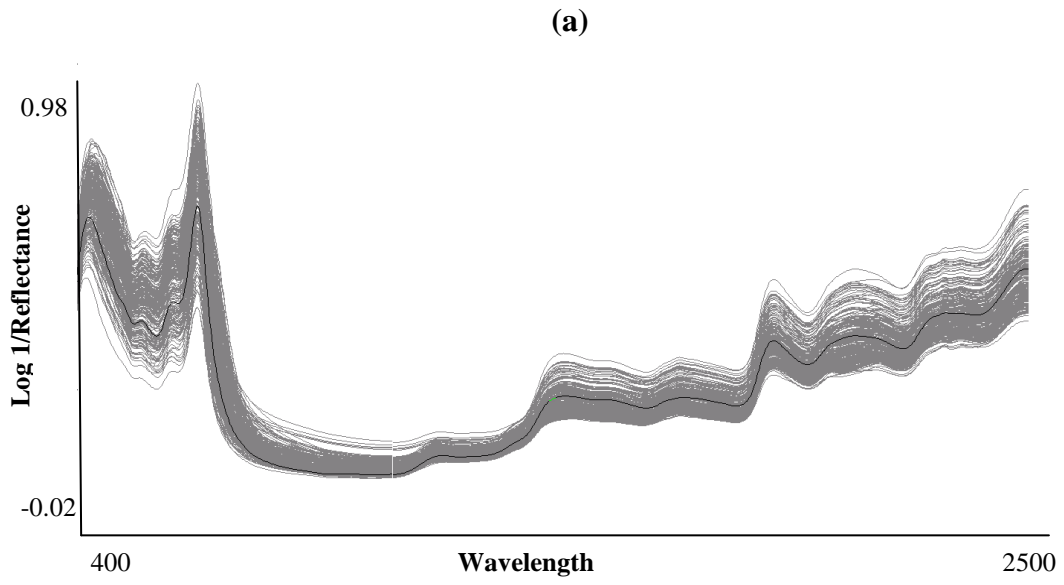


Figure 1. Frequency distribution plots of (a) Total glucosinolates, (b) gluconapin, (c) progoitrin and (d) glucobrassicinapin.



(c)

GNA

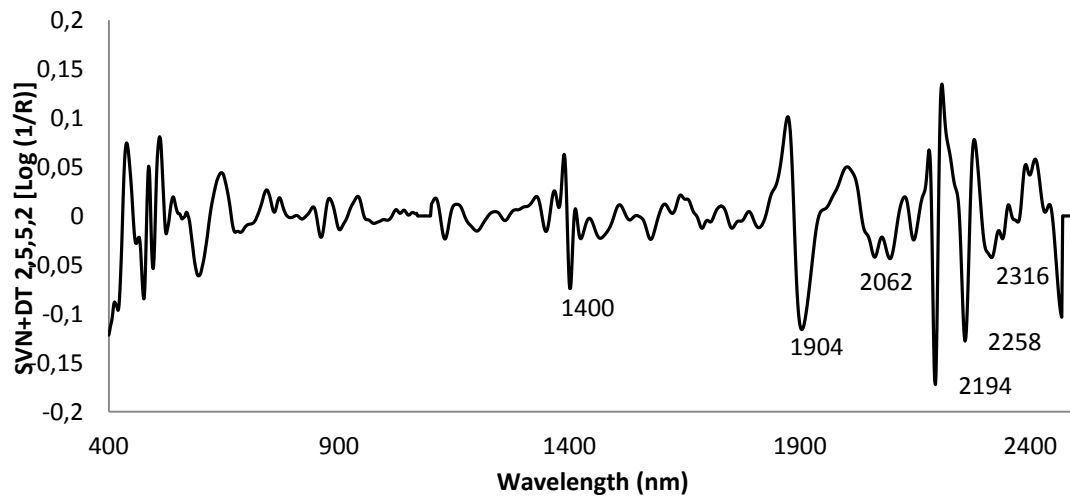
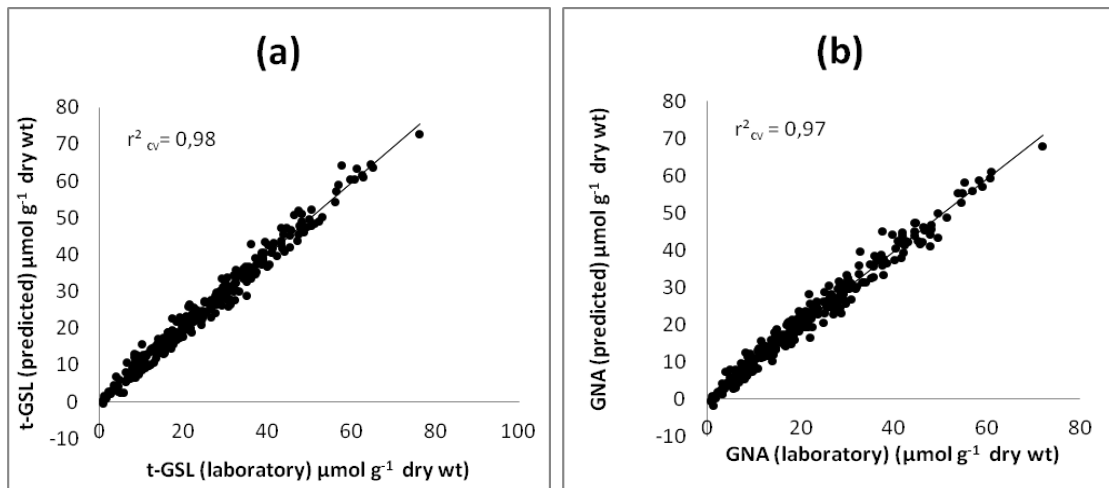


Figure 2. (a) Raw spectra ($\log 1/R$) of the samples of *Brassica rapa* used in the calibration set ($n=277$), in the range from 400 to 2500 nm. (b) Second derivative spectra (2, 5, 5, 2; SNV+DT) of the raw optical data in the range from 400 to 2500 nm of *Brassica rapa*. (c) Second derivative spectra (2, 5, 5, 2; SNV+DT) of the raw optical data in the range from 400 to 2500 nm of gluconapin powder.



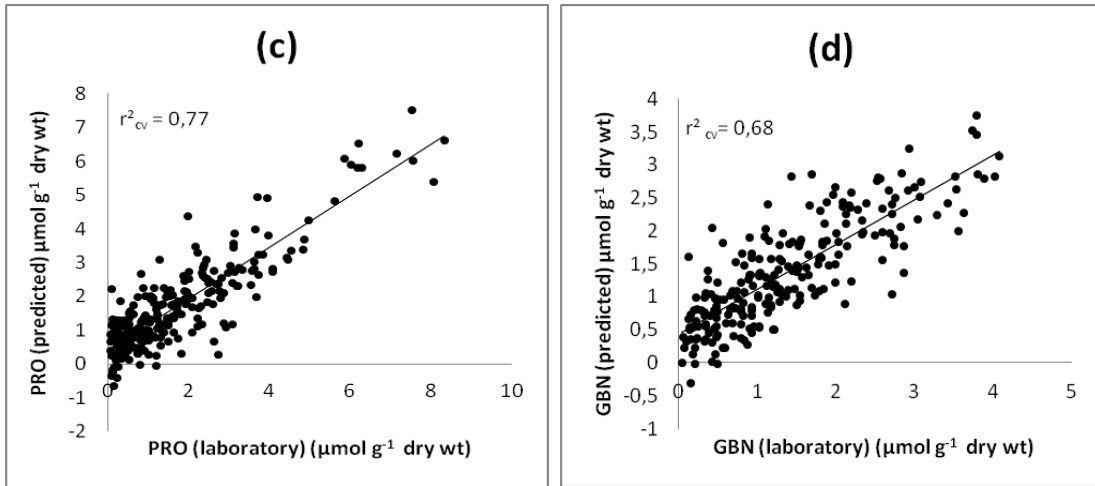
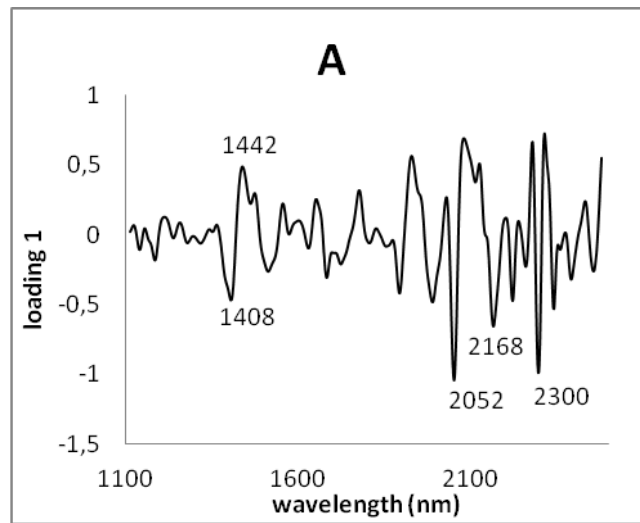


Figure 3. Cross-validation scatter plots of laboratory vs. predicted values by NIRS for total glucosinolates (a), gluconapin (b), progoitrin (c) and glucobrassicinapin (d) (n=277) ($\mu\text{mol g}^{-1}$ dry wt).



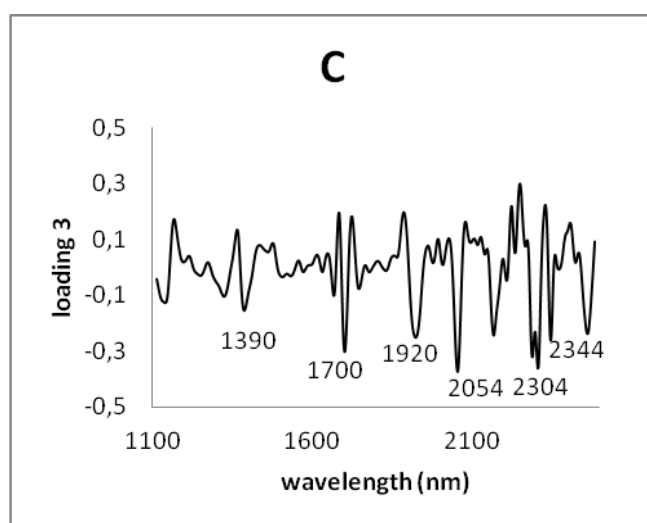
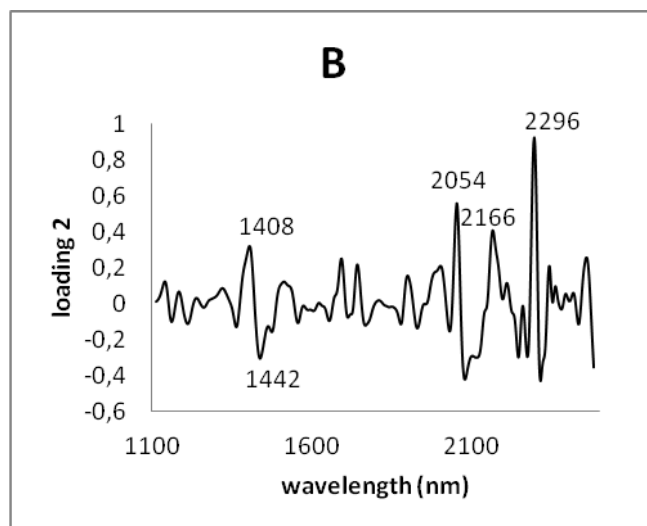
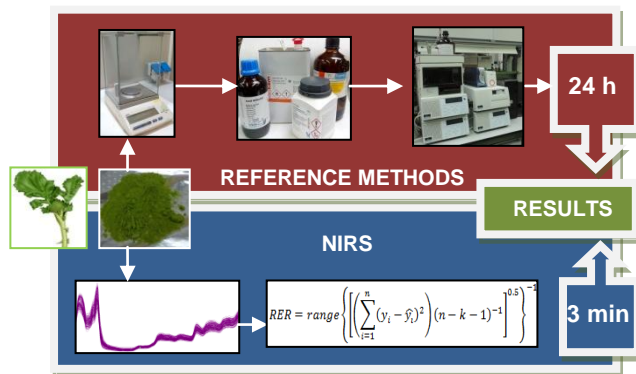


Figure 4. MPLS loadings spectra for gluconapin in the *Brassica rapa* freeze-dried in the second derivative (2, 5, 5, 2) transformation. Figures A, B y C represent loading for factor 1, 2 and 3, respectively.

Table of Contents (TOC) Graphic



1 **Analysis of the acid detergent fiber content in turnip greens and turnip tops**
2 **(*Brassica rapa* L. subsp. *rapa*) by means of near-infrared reflectance**

3

4 S. Obregón-Cano^{a*}, R. Moreno-Rojas^b, A.M. Jurado-Millán^a, M.E. Cartea-González^c y
5 A. De Haro-Bailón^a.

6 *^aDepartment of Plant Breeding, Institute for Sustainable Agriculture (CSIC), Córdoba,*
7 *Spain; ^b Department of Food Science and Technology, University of Córdoba,*
8 *Rabanales Campus, Córdoba, Spain ^c Department of Plant Genetics. Biological Mission*
9 *of Galicia (CSIC), Pontevedra, Spain*

10 **Corresponding author: Sara Obregón Cano, email: saraobregon@ias.csic.es;*

11 *Rafael Moreno Rojas, email: rafael.moreno@uco.es;*

12 *Ana María Jurado Millán, email: ana.jurmil@yahoo.com;*

13 *María Elena Cartea González, email: ecartea@mbg.csic.es;*

14 *Antonio De Haro Bailón, email: adeharobailon@ias.csic.es;*

15

16 **Abstract**

17 The potential of near-infrared reflectance spectroscopy (NIRS) to analyze the contents
18 of acid detergent fiber (ADF) in two parts of the turnip, turnip greens and turnip tops,
19 highly appreciated of northern Spain and Portugal, was assessed. A set of 134 samples
20 were analyzed spectrally using NIRS equipment and calibration models by the method
21 of regression by modified minimum partial least squares were applied. Three calibration
22 equations were developed: in equation without mathematical treatment of data (0,0,1,1)
23 the value of coefficient of determination was $R^2 = 0.91$, in the equation first derivative
24 treatment (1,4,4,1) the value was of 0.95 and the second derivate treatment (2,5,5,2) a
25 value was of 0.96. The estimation accuracy was based on parameters such as RPD (ratio
26 between the standard deviation and the standard error of validation) and RER (ratio
27 between the range of ADF of the validation as a whole and the standard error of
28 prediction) of the external validation, were obtained values of 2.75 and 9.00 for the
29 treatment without derivate, 3.41 and 11.79 with first-derivate, 3.10 and 11.03 with
30 second-derivate. With the acid detergent residue spectrum the wavelengths were
31 identified and associate spectrum bands with the ADF contained in the sample. The
32 results showed the great potential of NIRS for predictive analyzing of the content of
33 ADF in turnip greens and turnip tops and its use as quick tool in breeding programs of
34 *Brassica rapa*.

35 **Keywords:** *Brassica rapa*, turnip greens, turnip tops, acid detergent fiber, NIRS.

36 **Introduction**

37 The plants of the genus *Brassica* constitute one of the economically most important
38 plant groups in the world. They are valuable sources of roots, stems, leaves, shoots and
39 inflorescences, as well as of oils, condiments and forage for nutrition or industrial use
40 (Gómez-Campo 1980). Depending on the part of the plant used, these crops are

41 classified as being oleaginous, forage, horticultural products and condiments. The
42 growing scientific interest in this botanical group has increased in parallel to its
43 economic importance and its achievements in investigation. The consumption of
44 vegetables of the genus *Brassica* has been related to human health with regard to the
45 reduction in the risk of suffering from certain types of chronic diseases, such as
46 cardiovascular problems and different types of cancer (Cartea et al 2008; Traka and
47 Mithen, 2009). Within the genus *Brassica*, four species, *B. oleracea*, *B. rapa*, *B. napus*
48 and *B. juncea*, are the crops with a horticultural use. *Brassica rapa* L. subsp. *rapa*,
49 commonly known as turnip is one of the oldest crops used for human consumption. It
50 was the first species of *Brassica* domesticated by humans thousands of years ago, and it
51 was already cited in Sanskrit literature under the name of Siddharta, which proves the
52 antiqueness of its cultivation (Prakash 1961). In the north of Spain and Portugal turnip
53 greens and turnip tops are rising in value and they occupy a prominent place in
54 traditional Galician and Portuguese agriculture. Turnip greens are the young leaves of
55 turnips harvested in their vegetative period, whereas turnip tops are the floral stalks
56 collected just before the flower opens. In the case of turnip tops, the diversification of
57 this product is acquiring special importance, and the number of firms packing and
58 freezing it are on the increase, not only in Galicia but also in other parts of Spain. An
59 important factor to be taken into account in the nutritional composition of both turnip
60 tops and turnip greens is their fiber, in addition to the presence of other components like
61 some vitamins and minerals which partly complement the daily demands of a diet. The
62 fiber content in vegetables is essential to the digestibility of the food. It has been
63 recognized that the ingestion of fiber is of great benefit to human health, contributing to
64 the prevention of cancer of the colon and reducing the risk of developing cardiovascular
65 diseases, cerebral infarction, hypertension, diabetes, obesity and certain gastrointestinal

66 complaints (Anderson et al 2009). Traditionally, the structural carbohydrates of
67 foodstuffs have been estimated via an analysis of their content in crude fiber. Crude
68 fiber can be defined as being the residue resulting from submitting the food to a double
69 hydrolysis: acid (with sulphuric acid) and alkaline (with potassium hydroxide), with the
70 protocol developed by the Weende method (AOAC 1995). One drawback of double
71 hydrolysis is that it solubilizes part of the hemicellulose and of the lignin of the cell
72 wall, so that the result obtained of the crude fiber content is lower than the real content
73 in structural carbohydrates. This problem is avoided by using detergent solutions for the
74 fiber analysis, following the method proposed by Goering and Van Soest (1970).
75 Neutral detergent fiber (NDF) estimates the content in cellulose, hemicellulose, lignin,
76 cutine and insoluble minerals in the cell wall, and it is determined as being the residue
77 remaining after extraction with the neutral detergent solution (made up of sodium lauryl
78 sulphate and EDTA). Acid detergent fiber (ADF) is an estimator of the content in
79 cellulose, lignin, cutine and insoluble minerals in the cell wall and it is determined as
80 the residue remaining after the digestion of the sample with an acid- detergent solution
81 (made up of diluted sulphuric acid and cetyl-trimethyl-ammonium bromide). The
82 difference between NDF and ADF is the fraction of hemicellulose. With the ADF
83 method the hemicellulose is hydrolyzed so that the determination of ADF is more
84 associated with degradability and digestibility, whereas the NDF content is only related
85 to ingestion or to a fraction still highly usable by the organism (Van Soest et al 1967).
86 Several authors have documented the negative correlation existing between the content
87 of NDF and of ADF with the digestibility of vegetable products (Oh et al 1966; Archer
88 and Decker 1977; Hovin et al 1976). In the same sense, the high negative correlation
89 between the ADF content and digestibility *in vitro* has been demonstrated, so that,
90 therefore, the ADF content in a vegetable could be considered as being a good indicator

91 of its digestibility and quality (Hill and Barnes 1977; Soh et al 1984; Van Soest and
92 Robertson 1985).

93 The methods for the analysis of fiber content and its components described above are
94 costly, slow, aggressive to the environment and they need specialized workers for their
95 application. During the last 40 years technology based on near-infrared reflectance
96 spectroscopy (NIRS) has been developed as a rapid, consistent and economic tool
97 compared to component analyses in the laboratory which are time-consuming, costly
98 and involve the handling of dangerous reagents (Scotter 1990; Bochereau et al 1992;
99 Font et al 2005, 2006; Cozzolino and Moron 2004; Sinelli et al 2008; Davey et al 2009).
100 Nowadays, NIRS technology is applied routinely in genetic improvement programs for
101 many vegetable species to determine their content in fiber, moisture, oil, protein,
102 minerals, glucosinolates and fatty acid composition of their edible parts (Helgerud et al
103 2015; Hell et al 2016; Guo et al 2016; Núñez et al 2016). The first calibrations for the
104 crude fiber content in seeds in the genus *Brassica* were carried out by Panford et al
105 (1988) and Michalski et al (1992). More recently, calibrations for ADF in seeds of
106 different *Brassica* species have been performed by Font et al (2003), Font et al (2005),
107 Dimov et al (2012) and Wittkop et al (2012). Lately, the NIRS technique has been used
108 for the rapid determination of the quality of crude matter starting from the study of fiber
109 as a component of biomass (Foster et al 2013), in order to determine the digestibility of
110 cane sugar (Daniel et al 2014), or for the study of fiber content in food for ruminants
111 (Krizsan et al 2015).

112 This work has aimed to develop and validate NIRS calibration equations for the
113 determination of acid detergent fiber (ADF) in aerial edible parts of *Brassica rapa*
114 (turnip greens and turnip tops), with a view to employing them as a tool for a fast and

115 non destructive analysis in the screening of germplasm and in the selection of genotypes
116 of the highest quality with respect to this component.

117

118 **Material and Methods**

119 *Plant material*

120 During the seasons 2013-2014 and 2014-2015, a set of 5 varieties of *Brassica rapa* L.
121 subsp. *rapa* were grown on the Institute for Sustainable Agriculture experimental farm
122 in Córdoba, (37°51' N, 4°48'W, Spain) in a random block design with 3 replications. The
123 climate is a typical Mediterranean one with a mean rainfall of 650 mm and deep loamy-
124 sandy soil classified as Typic Xerofluent.

125 The *Brassica rapa* L. subsp. *rapa* varieties came from the *Brassica* Germplasm Bank at
126 the Biological Mission of Galicia (Pontevedra), where they had been characterized by
127 their agronomic characteristics and their aptitude for the production of turnip greens and
128 turnip tops. During each agricultural season, and at the optimal consumption moment,
129 samples of turnip greens (4 to 5 leaves per plant) and of turnip tops (3 to 4 flower stalks
130 per plant) from the plants selected for each of the varieties studied. In all, 134 samples
131 were harvested, 78 in the 2013-14 season (34 turnip greens and 44 turnip tops) and 56
132 samples in the 2014-2015 season (29 turnip greens and 27 turnip tops). All the
133 vegetable material was thoroughly washed with tap water to remove dirt and dust from
134 its surface and, finally, it was rinsed with deionized water. Next, it was stored at -80°C
135 until its lyophilization, which was done in Telstar® model Cryodos-50 (Telstar, Terrasa,
136 Spain) equipment. The lyophilized samples were ground in an IKA-Labortechnik®
137 model A10 mill for 20 seconds and stored in a desiccators up to the moment of being
138 analyzed by the reference method or scanned in the NIRS equipment.

139

140 *Analysis of acid detergent fiber*

141 The ADF content was determined following the procedures described by Goering and
142 Van Soest (1970) in a Dosi-Fiber (Selecta®, Spain) machine. 0.5 g of lyophilized
143 sample was weighed in glass filtering crucibles (porosity 2). This was digested for one
144 hour in 100 ml of hot cetyl-methyl-ammonium bromide in an acid medium (sulphuric
145 acid) and then filtered to obtain the residue considered as being the acid detergent fiber
146 of the sample. Next, the residue was washed with hot water and acetone and dried in a
147 stove at 110°C for 90 minutes. Then it was stored in desiccators for 30 min to temper
148 the crucibles and prevent the sample from becoming moist, after which the sample was
149 weighed. The acid detergent residue (ADR) remaining after digestion was removed
150 from the crucibles and stored to obtain the NIRS spectrum from the pure residue.

151 The acid detergent fiber of the sample was calculated according to formula 1:

$$(1) \quad \text{ADF (\%)} = \frac{P3 - P1}{P2 - P1} * 100$$

152 Where P1 is the crucible weight, P2 is the weight of the crucible with the sample and P3
153 is the weight of the crucible with the acid detergent residue after digestion. Each sample
154 was analyzed in duplicate.

155

156 *Development of NIRS equations*

157 Sample spectra were recorded with a Model 6500 (Foss-NIRSystems®, Inc., Silver
158 Spring, MD, EE.UU) near infrared spectrophotometer in the reflectance mode. One
159 spectrum was recorded for each sample. The samples were placed in a round capsule 3
160 cm in diameter made of quartz glass and anodized aluminum to prevent interferences in
161 their absorption. From each sample, reflectance spectra in the wavelength range of 400
162 to 2500 nm, at 2 nm intervals, were obtained. Collection of spectral data and their

163 chemiometric analysis was conducted with the WinISI II v1,50 (Infrasoft International,
164 Port Matilda, PA, USA) software.

165 The spectral outliers were detected by a principal component analysis (PCA) applied to
166 the whole set of the population based on the calculation of the Mahalanobis distance (H)
167 (Shenk and Westerhaus 1991, 1996). In addition to being a tool for the selection of
168 samples from the calibration set, this is a highly useful technique in the analysis for
169 converting original spectra data (absorbance values) into new orthogonal variables
170 (principal components) thus eliminating collinearity (redundant information) (Martens
171 and Næs 1989). The CENTER algorithm included in the WinISI II software (version
172 1.50 Infrasoft International, Port Matilda, PA, USA) was used to calculate the H
173 distances between the spectra of the different samples with respect to the mean
174 spectrum. In agreement with the work of Shenk and Westerhaus (1991), samples with a
175 statistical H value of over 3 units were defined as being atypical spectra and they were
176 eliminated for the establishment of the equations. A total of 4 spectra found were
177 eliminated from the set of samples employed in the work. The final number of samples
178 selected was of 130, the calibration set was composed of 104 samples and was used for
179 the development of the different calibration equations; the external validation set was
180 formed by 20% of the total samples (n=26) and was used to evaluate the prediction
181 capacity of each of the equations developed. The external validation set samples were
182 selected by taking the list of samples ordered on the basis of their H values, choosing 1
183 of each of the 5 samples on the list (Shenk and Westerhaus, 1991). In this way, the
184 samples selected represented all the variability in the whole of the population (Hruschka
185 2001). To develop the calibration equations, the method of regression by modified
186 minimum partial least squares (MPLS) was applied. The usefulness of this method has

187 been demonstrated for the evaluation of fiber content, using the whole spectrum range
188 (400 – 2500 nm) (Font et al 2003, 2006).

189 The spectrum correction procedure SNV-DT was applied. The latter provides the
190 WinISI software for the elimination of dispersion due to the effects caused by the
191 differences in particle size or the variation in length, halfway between the dispersion of
192 the samples and fitting the baseline (Barnes et al 1989). The treatment selected for one
193 parameter in a dataset is not always the best option for the same parameter in any other
194 set of samples (Núñez et al 2016); this confirms the importance of optimizing the
195 treatment for each parameter and dataset. In this sense, the mathematical treatments
196 selected and applied to the spectra in our work were (0,0,1,1), (1, 4, 4, 1) and (2, 5, 5,
197 2), in which: the first number indicates the order of the derivative (first or second
198 derivative of the logarithm of 1/R); the second number is the amplitude or distance
199 between the segments to be subtracted; the third number is the length of the segment to
200 be smoothed; and the fourth number indicates a second smoothing (Shenk et al 1992).
201 The statistics defining the calibration equations obtained are the Coefficient of
202 Determination (R^2) which shows the percentage of the variability in the ADF
203 concentrations explained by the regression equation, and the Standard Error of
204 Calibration (SEC), which is the standard error in the residuals for the calibration set. It
205 should be noted that the standard error in the calibration only advises one of the fitting
206 of the reference values to the regression line, so that it cannot be considered as being an
207 adequate statistic for assessing the validity of the calibration equation obtained (Shenk
208 and Westerhaus, 1996).

209

210 ***Equation validation***

211 To evaluate the prediction capacity of the calibration equations, two validation models
212 were used, permitting the establishment of a comparison (through different statistical
213 criteria) between the true value (obtained by the reference method) and the estimated
214 one (obtained by NIRS).

215 Cross validation

216 A cross validation was made based solely on the data employed at the calibration stage,
217 in order to calculate the optimal number of terms in the regression. The algorithm
218 selects different calibration and validation sets within the whole population considered,
219 making with each selection a simulation of the regression algorithm (Martens and Næs
220 1989; Shenk and Westerhaus 1991). Finally, the calculation software chose the equation
221 which made the minimum Standard Error of Cross Validation (SECV). The statistics
222 resulting from the cross validation were: the Coefficient of Determination of Cross
223 Validation (r_{cv}^2), the Standard Error of Cross Validation (SECV), which represents the
224 standard error of the residuals for the cross validation set; and the statistic (RPD)
225 (Formula 2) which is the ratio between the standard deviation and the standard error of
226 cross validation (SD/SECV). The RPD_{cv} is a statistic which permits the evaluation of
227 the SECV in terms of the standard deviation of the reference data for the population
228 being studied (Williams 2001).

$$(2) \quad RPD = SD \left\{ \left[\left(\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2 \right) (n - k - 1)^{-1} \right]^{0.5} \right\}^{-1}$$

229

230 Where y_i = laboratory reference value for the sample; \hat{y}_i = NIR mean value; n = number
231 of samples, k = number of wavelengths used in an equation; SD = standard deviation of
232 the chemical data.

233 External validation

234 The calibration equations selected with samples which did not intervene in the
 235 calibration (validation set, n=26 in our work) were evaluated. The external validation
 236 statistics include: the Coefficient of Determination of Validation (r^2_{ev}), the Standard
 237 Error of Prediction (SEP), the RPD_{ev} (which is the ratio SD/SEP), and the RER
 238 (Formula 3), which is the ratio between the range of ADF of the validation as a whole
 239 and the standard error of prediction.

$$(3) \quad RER = \text{range} \left\{ \left[\left(\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2 \right) (n - k - 1)^{-1} \right]^{0.5} \right\}^{-1}$$

240

241 Where y_i = laboratory reference value for the sample; \hat{y}_i = NIR mean value; n = number
 242 of samples, k = number of wavelengths used in an equation; SD = standard deviation of
 243 the chemical data.

244 The RPD and RER statistics permitted a comparison of the performance of the model
 245 through populations with different standard deviations (Cozzolino and Moron, 2004).
 246 The best calibration equations for the ADF analysis were selected by considering the
 247 optimal combination of the following external validation statistics: high values of
 248 coefficients of determination (r^2_{ev}) and high RPD_{ev} and RER values. Those equations in
 249 which RPD is higher than 3 were considered to have an excellent prediction ability,
 250 those with RPDs of between 2 and 3 allowed approximate predictions to be made, and
 251 those whose RPD was between 1.5 and 2 could only be used for classification purposes
 252 in groups with a high-medium-low content. Similarly, the RER values obtained with the
 253 different calibration equations with a good prediction capacity should be over 10
 254 (Williams and Sobering 1996; Williams 2001).

255 The standard error of laboratory (SEL) for the ADF analysis was determined and
 256 compared with the SEP for all the equations. To obtain the total error of the reference

257 method (SEL), 10 samples of turnip tops and turnip greens were selected and analyzed
258 in duplicate at different times and by different analysts. The statistical ratio SEP/SEL
259 permitted the NIRS error to be related to the error in the reference method.

260

261 **Results and Discussion**

262 *ADF reference analysis in samples of turnip tops and turnip greens*

263 A collection of 134 samples of *Brassica rapa* were analyzed (63 turnip greens and 71
264 turnip tops) by the Goering and Van Soest method (1970). The mean ADF content in
265 was of 11.53 % in turnip greens and of 15.98% in turnip tops. Using the t-test, the
266 means were evaluated exhibiting significant differences between them ($P < 0.001$). The
267 mean total content of ADF in the 134 samples analyzed was of 13.89% (Table 1). The
268 differences in the ADF content of the turnip greens samples with respect to the turnip
269 tops was explained by the turnip greens being formed by young leaves and the turnip
270 tops by flower stems with a higher content of fiber. Arzani et al (2001) also reported
271 that with progress of plant growth, ratios of protector and firmness tissues, which
272 mostly consist of structural carbohydrates such as celluloses, hemicelluloses and lignin,
273 are increased. Therefore, maturity of plants and an increase in structural carbohydrates
274 cause higher fiber amounts in turnip tops than turnip greens. These results confirmed
275 that *Brassica rapa* was a good source of fiber with high concentrations in some samples
276 (21.91 %) and lower concentrations in others (8.55 %). Figure 1 shows the distribution
277 of the frequency of fiber content in turnip greens and turnip tops from the samples
278 studied.

279 The variability in the ADF content in the samples analyzed in this work was similar to
280 that published in others, in which ADF values presented in leaves of *Brassica rapa* were
281 of 23.50% (Türk et al 2009); in crude fiber of 12.9 % and in ADF of 23.5 % (Francisco

282 et al 2011). In works on the turnip (a thickened hypocotyl of *Brassica rapa* widely used
283 in human nutrition), we find mean ADF contents of 14.68 % (Azam et al 2013), of
284 28.28% (Saeed et al 2012) and of 11.20 % (Türk et al 2009). In rapeseed flour the ADF
285 content values were comprised between 9.5 and 15.2 % (Daszykowski et al 2008); and
286 in seeds of other *Brassica* its values ranged between 5.33% (*B. carinata*) and 16.31%
287 (*B. juncea*) (Font et al 2003).

288 The statistical data describing the calibration and validation sets are shown in Table 2.
289 The range of values of the set of validation samples were included within the range of
290 the values of the calibration samples as a whole, which were required to generate a
291 calibration model with a reliable prediction capacity (Petisco et al 2005).

292

293 ***Calibration and Validation***

294 The principal component analysis was carried out to locate any possible spectral outliers
295 from the calibration set (Shenk et al 1991). Figure 2(a) shows the mean spectrum of the
296 *Brassica rapa* samples in the range of 400 to 2500 nm; Figure 2(b) depicts the first
297 derivative spectrum (1,4,4,1; SNV-DT) and Figure 2(c) the second derivative spectrum
298 (2,5,5,2; SNV-DT), both derived with the application of a spectra correction treatment.

299 With the aim of identifying wavelengths and associate spectrum bands with the ADF
300 contained in the sample, the acid detergent residue spectrum (ADR), Figure 3, was
301 compared with the spectrum of the green parts of *Brassica rapa*, Figure 2, with a view
302 to identifying the NIRS spectrum regions which might be more related to the ADF
303 content in the sample. In the spectra of *Brassica rapa* and ADR, Figures 2 and 3,
304 absorption similarities were found in certain wavelengths. It is worth noting the
305 wavelengths of 1420 related to aromatic groups, 1906 nm related to groups OH, C=O
306 and CO₂H and 2278 nm related to groups CH and CH₂ associated with the structural

307 polysaccharides of the plants, 2468 nm related to groups CH, CH₂ and C-N-C
308 associated with proteins (Osborne 1986) (WinISI II v1,50 software). Those wavelengths
309 would participate more highly in the development of robust calibrations for the ADF
310 content.

311 The results of the calibration equations obtained by MPLS regression with the three
312 mathematical treatments is shown in Table 3. In the evaluation of the treatments applied
313 in the development of those equations, a clear difference was found between the
314 statistics values obtained in the equations without treatment (0,0,1,1) ($R^2=0.91$) and the
315 equations with treatments with derivative the value of $R^2= 0.95$ in the first derivative
316 (1,4,4,1; SNV+DT) and a value of $R^2= 0.96$ in the second one (2, 5, 5, 2; SNV + DT),
317 with both values being very similar to each other (Table 3).

318 Cross validation

319 On the basis of the statistics obtained in the cross validation, the final calibration
320 equations for the ADF content were selected on the premise of maximizing the r^2_{vc} and
321 minimizing the SECV. The values of RPD_{cv} of the cross validation for ADF obtained
322 were 3.36 (for the treatment 1,4,4,1) and 3.33 (for the treatment 2,5,5,2). In both
323 equations the RPD_{cv} values were higher than 3, and were indicative of the capacity of
324 the calibration equations to be used for diagnosis and investigation purposes (Williams
325 and Sobering 1996).

326 The two derivatization treatments (1,4,4,1 and 2,5,5,2) performed to optimize the model
327 provided some optimal results in the statistics values, with the two models being valid
328 for calibration. In the study of the profile of fatty acids in milk calibration equations
329 they were developed with the first derivative and the second derivative, (1,5,5,1) and
330 (2,5,5,1), and both treatments were well valid for use in the characterization of the fat
331 content in milk (Núñez et al 2016). Other authors investigated the evaluation of protein

332 and amylose in brown rice and rice bran, where five treatments were tested including
333 first and second derivatives, and two of the treatments (1,6,6,1 and 1,4,4,1) were equally
334 valid for the development of equations to calibrate amylose (Bagchi et al 2016).

335 Figure 4 depicts the laboratory values compared to NIRS prediction ones of the cross
336 validation as a whole for ADF content.

337 External validation

338 Once the equations were obtained and the cross validation performed, a second
339 evaluation of the equations was made by using the samples not included in the
340 calibration (external validation set) for the prediction of the ADF content. In Table 4
341 the statistics of the external validation obtained for the ADF equations developed with
342 the three mathematical treatments are presented. In treatment 0,0,1,1, a value of
343 $r^2_{ev}=0.87$ was obtained, giving rise to lower RPD_{ev} and RER values than those of the
344 treatments with derivatives. In treatments (1,4,4,1) and (2,5,5,2) the same high value in
345 the coefficients of determination of the prediction, ($r^2_{ev}=0.91$) was obtained. The RPD_{ev}
346 values were very similar to each other, 3.41 in the first derivative and 3.10 in the second
347 one. Those results were very similar to those of RPD_{cv} obtained in the cross validation
348 (values of over 3) and they confirmed their excellent capacity to predict ADF content
349 independently to those used in the calibration (Williams and Sobering 1996; Williams
350 2001). Finally, the RER statistic was calculated and values of over 10 were obtained in
351 both cases: 11.79 (1,4,4,1) and 11.03 (2,5,5,2). This was an additional proof of the high
352 prediction capacity of the calibration models developed for ADF (Williams and
353 Sobering 1996; Williams 2001).

354 No calibration equations of the ADF content in green parts of *Brassica rapa* have been
355 described in the bibliography up to now. However, some equations developed for the
356 ADF content in leaves of woody species have been reported with higher values than

357 those described ($RPD_{cv} = 5.3$), possibly due to the heterogeneity in the samples selected
358 for the development of the calibration, in which different woody species collected on
359 different dates were included (Petisco et al 2006). ADF calibration in corn plants gave
360 RPD_{ve} values of 2.9 (Campo et al 2013), and other works investigating grasses leaves
361 and red clover presented $RPD = 3.4$ values in NDF, which were similar to those found in
362 this work with ADF (Nordheim et al 2007).

363 Regarding calibrations within the genus *Brassica*, the values obtained in the calibration
364 equations in our work are the highest described up to now for ADF content, compared
365 to the equations evolved for ADF content in seeds found in the literature. Thus,
366 calibrations in intact *Brassica napus* seed were described, with RPD_{cv} values of: 2.13
367 and 2.20 (in a volume of 10 ml of seed) and values of 1.91 and 2.34 (in a volume of 1
368 ml of seed) (Font et al 2005; Wittkop et al 2012); these results coincide with those of
369 other authors who also gave values of 1.92 in seed of the same species (Dimov et al
370 2012). As for the external validation results, those obtained in our work were also
371 higher than those found in the literature in *Brassica napus* seed, with RPD_{cv} of 2.2 and
372 RER of 10.03 (Dimov et al 2012).

373 To evaluate the precision of the equations the reference method error (SEL) was
374 calculated and was related to the SEP. The SEL value obtained was of 0.25. The
375 SEP/SEL ratio shown in the ADF was of 4.56 in the treatment 0,0,1,1, which indicates a
376 poor precision, and values of 3.48 and 3.72 were obtained for the treatments of 1,4,4,1
377 and 2,5,5,2, respectively, which reveals a good precision; those values agree with the
378 ones obtained by other authors in other *Brassica* species (Font et al 2003).

379

380 ***Modified Partial Least Squares Loadings of the lyophilized green parts model.***

381 Panels a, b, and c of Figure 5 represent MPLS loading spectra for factors 1, 2, and 3,
382 respectively. These plots show the regression coefficients of each wavelength to ADF
383 for each factor. Wavelengths represented here as participating more highly in the
384 development of each factor are those of a greater variation and that are better correlated
385 with ADF in the calibration set. In the second derivative, peaks pointing downwards
386 indicate the positive influence of absorbers on the development of the equations, while
387 peaks pointing upwards evidence negative correlations. Factors 1 and 3 of the
388 lyophilized green parts model showed those most highly correlated with ADF,
389 presenting a loading with major positive correlations at 1404, 2308, and 2348 nm,
390 associated with the absorbance of C-H and C-O groups of lipids (Figure 5a) (Osborne
391 1986; Font 2003; Wittkop et al 2012). Factor 1 was also influenced by groups N-H at
392 1996 nm. Factor 2 was the one most highly correlated with amide groups in the protein
393 region at 2052 and 2300 nm. Factor 3 was also influenced by water, as indicated by the
394 band at 1932 nm. Wavelengths for specific absorbance of oil functional groups are
395 known as being major contributors to NIRS calibrations for ADF in *Brassica* species
396 and for dietary fiber in high-fat cereal products (Wittkop et al 2012).

397 On the basis of the similarities between the second-derivative transformation of the
398 ADR spectrum (Figure 3c) and the third MPLS loading for *Brassica rapa* (Figure 5), it
399 seems that absorbers of the ADR participated directly in the modeling this factor,
400 specifically, 1874 and 2278 nm related to groups CH and CH₂ associated with the
401 structural polysaccharides of the plants.

402 The results obtained both in the cross validation and in the external validation confirm
403 the reliability and capacity of the calibration equations established to predict accurately
404 and precisely ADF content in turnip greens and turnip tops by means of their reflectance
405 spectra in NIRS.

406 The results obtained both in the cross-validation and in the external validation confirm
407 the reliability and capacity of the calibration equations developed with treatments
408 (1,4,4,1) and (2,5,5,2), which were not observed significant differences among them.
409 Both equations obtained the same ability prediction in samples turnip greens and turnip
410 tops in FAD content from their reflectance spectra in the near infrared.

411 ***Conclusions***

412 Turnip greens and turnip tops constitute an important source of fiber, minerals and
413 vitamins and they form part of the diet in extensive regions of Spain and Portugal.
414 Society is currently demanding a greater knowledge of the quality and nutritional
415 properties of the foods consumed (particularly their content in fiber). In this paper were
416 obtained for the first time, two calibration equations with two mathematical treatments
417 (1,4,4,1) and (2,5,5,2), both equally valid, permitting the use of near infrared reflectance
418 spectroscopy (NIRS) for a fast, simultaneous and precise analysis of the acid detergent
419 fiber (ADF) content in turnip greens and turnip tops samples. These results allow NIRS
420 technology to be contemplated as a fundamental tool in programmes for species quality
421 improvement (by facilitating and lowering the costs of screening, characterization and
422 genotype selection tasks), and in the nutritional quality control of ready-to-consume
423 products obtained.

424 ***Acknowledgements***

425 We are grateful to the Ministry of Economy and Competitiveness of the Spanish
426 Government for financing the project *Genética y Mejora de Brasicas hortícolas: papel*
427 *de los metabolitos secundarios*. Reference AGL2012-35539.

428 ***Conflict of interest***

429 The authors declare no competing financial interest.

430

431 **References**

432

433 Anderson JW, Baird P, Davis JrRH, Ferreri S, Knudtson M, Koraym A, Waters V,

434 Williams CL (2009) Health benefits of dietary fiber. *Nutr Rev* 67:188–205.

435 AOAC. Official Method 978.10. (1995) Fiber (Crude) in animal feed- Fritted glass

436 crucible method. In AOAC Official methods of analysis, 16th edn, Eds.;

437 Association of Official Analytical Chemists, Inc.: Arlington, Virginia (USA), 1:

438 20-21.

439 Archer KA, Decker AM (1997) Relationship between Fibrous Components and In vitro

440 Dry Matter Digestibility of Autumn-saved Grasses. *Agron J*.69:610-612.

441 Azam A, Khan I, Mahmood A, Hameed A. (2013) Yield, chemical composition and

442 nutritional quality responses of carrot, radish and turnip to elevated atmospheric

443 carbon dioxide. *J Sci Food Agric* 93: 3237–3244.

444 Arzani H, Torkan J, Jafari M and Nikkhah A (2001) Investigation on effects of

445 phenological stages and environmental factors (soil and climate) on forage

446 quality of some important range species. *J Agr Sci* 32:385–397.

447 Bagchi TB, Sharma S, Chattopadhyay K (2016) Development of NIRS models to

448 predict protein and amylose content of brown rice and proximate compositions

449 of rice bran, *Food Chem*, 191: 21-27.

450 Barnes RJ, Dhanoa MS, Lister SJ (1989) Standard normal variate transformation and

451 de-trending of near-infrared diffuse reflectance spectra. *Appl Spectrosc*, 43:

452 772–777.

453 Bochereau L, Bourguine P, Palagos BA (1992) Method for prediction by combining data

454 analysis and neural networks: Application to prediction of apple quality using

455 near infra-red spectra. *J. agric Engng Res.* 51: 207–216.

456 Campo L, Monteagudo AB, Salleres B, Castro P, Moreno-Gonzalez J (2013) NIRS
457 determination of non-structural carbohydrates, water soluble carbohydrates and
458 other nutritive quality traits in whole plant maize with wide range variability.
459 Span J Agric Res 11: 463-471.

460 Cartea ME, Velasco P (2008) Glucosinolates in *Brassica* foods: bioavailability in food
461 and significance for human health. Phytochem. Rev. 7: 213.

462 Cozzolino D, Moron A (2004) Exploring the use of near infrared reflectance
463 spectroscopy (NIRS) to predict trace minerals in legumes. Anim Feed Sci Tech,
464 111: 161–173.

465 Daniel JLP, Capelesso A, Cabezas-Garcia EH, Zopollatto M, Santos MC, Huhtanen P,
466 Nussio LG (2014) Fiber digestion potential in sugarcane across the harvesting
467 window. Grass Forage Sci 69: 176-181.

468 Daszykowski M, Wrobel MS, Czarnik-Matusiewicz H, Walczak B (2008) Near-infrared
469 reflectance spectroscopy and multivariate calibration techniques applied to
470 modelling the crude protein, fiber and fat content in rapeseed meal. Analyst,
471 133: 1523–1531.

472 Davey MW, Saeys W, Hof E, Ramon H, Swennen RL, Keulemans J (2009) Application
473 of visible and nearinfrared reflectance spectroscopy (Vis/NIRS) to determine
474 carotenoid contents in banana (*Musa* spp.) fruit pulp. J. Agric. Food Chem , 57:
475 1742.

476 Dimov Z, Suprianto E, Hermann F, Möllers, (2012) Genetic variation for seed hull and
477 fiber content in a collection of European winter oilseed rape material (*Brassica*
478 *napus* L.) and development of NIRS calibrations. Plant Breeding. 131: 361-368.

479 Font R, Del Río M, De Haro-Bailón A. (2006) The use of near-infrared spectroscopy
480 (NIRS) in the study of seed quality components in plant breeding programs. *Ind*
481 *Crop Prod* 24: 307–313.

482 Font R, Del Río M, Fernández JM, De Haro-Bailón A (2003) Acid Detergent Fiber
483 Analysis in Oilseed *Brassicas* by Near-Infrared Spectroscopy. *J Agric Food*
484 *Chem.* 51: 2917-2922.

485 Font R, Wittkop B, Badani AG, Del Río-Celestino M, Friedt W, Lühs W, De Haro-
486 Bailón A (2005) The measurements of acid detergent fiber in rapeseed by visible
487 and near-infrared spectroscopy. *Plant Breeding.* 124: 410-412.

488 Foster AJ, Kakani VG, Ge J, Mosali J (2013) Rapid assessment of bioenergy feedstock
489 quality by near infrared reflectance spectroscopy. *Agron J*, 105: 1487-1497.

490 Francisco M, Velasco P, Lema M, Cartea ME (2011) Genotypic and Environmental
491 Effects on Agronomic and Nutritional Value of *Brassica rapa*. *Agron. J* 103:
492 735–742

493 Goering HK, Van Soest PJ (1970) Forage fiber analysis apparatus reagents procedures
494 and some applications. In *USDA-ARS Agric. Handbook no 379*. U.S.
495 Washington DC.

496 Gómez-Campo C. (1980) Morphology and morpho-taxonomy of the tribe *Brassicaceae*.
497 In *Brassica Crops and Wild Allies*. Tsunoda, S., Hinata, K., Gómez-Campo, C.
498 (Eds.). Scientific Societies Press, Tokyo.

499 Guo Y, Ni Y, Kokot S (2016) Evaluation of chemical components and properties of the
500 jujube fruit using near infrared spectroscopy and chemometrics. *Spectrochim*
501 *Acta A*, 153: 79-86.

502 Helgerud T, Wold JP, Pedersen MB, Liland KH, Ballance S, Knutsen SH, Rukke EO,
503 Afseth NK. (2015) Towards on-line prediction of dry matter content in whole
504 unpeeled potatoes using near-infrared spectroscopy, *Talanta*, 143:138-144.

505 Hell J, Prückler M, Danner L, Henniges U, Apprich S, Rosenau T, Kneifel W,
506 Böhmendorfer S. (2016) A comparison between near-infrared (NIR) and mid-
507 infrared (ATR-FTIR) spectroscopy for the multivariate determination of
508 compositional properties in wheat bran samples. *Food Control*, 60: 365-369.

509 Hill RR, Barnes RF (1977) Genetic Variability for Chemical Composition of Alfalfa. II.
510 Yield and Traits Associated with Digestibility. *Crop Science*. 17: 948-952.

511 Hovin AW, Marten GC, and Stucker RE (1976) Cell wall constituents of reed
512 canarygrass: Genetic variability and relationship to digestibility and yield. *Crop*
513 *Sci*. 16:575–578.

514 Hruschka WR (2001) Data Analysis Wavelength Selection Methods. In *Near infrared*
515 *technology in the agricultural, food industries*. Williams, P.C., Norris, K.H.
516 (Eds.). American Association of Cereal Chemist, St. Paul, Minnesota, USA.
517 pp35-55.

518 Krizsan SJ, Rinne M, Nyholm L, Huhtanen P (2015) New recommendations for the
519 ruminal in situ determination of indigestible neutral detergent fiber. *Anim Feed*
520 *Sci Tech*, 205: 31-41.

521 Martens H, Naes T (1989) In *Multivariate calibration*. John Wiley and Sons Chichester
522 UK.

523 Michalski K, Ochodzki P, Cicha B (1992) Determination of fiber sulphur amino acids
524 and lysine in oilseed rape by NIT. In *Making Light Work: Advances in Near*
525 *Infrared Spectroscopy*. I. Murray, and I. A. Cowe (eds), VCH Weinheim, New
526 York. pp333-335.

527 Nordheim H, Volden H, Fystro G, Lunnan T (2007) Prediction of in situ degradation
528 characteristics of neutral detergent fiber (aNDF) in temperate grasses and red
529 clover using near-infrared reflectance spectroscopy (NIRS), *Anim Feed Sci*
530 *Tech*, 139: 92-108.

531 Núñez-Sánchez N, Martínez-Marín AL, Polvillo O, Fernández-Cabanás VM, Carrizosa
532 J, Urrutia B, Serradilla JM (2016) Near Infrared Spectroscopy (NIRS) for the
533 determination of the milk fat fatty acid profile of goats. *Food Chem*, 190: 244-
534 252.

535 Oh HK, Baumgardt BR, Scholl JM (1966) Evaluation of forages in the laboratory. V.
536 Comparison of chemical analysis, solubility tests, and in vitro fermentation. *J.*
537 *Dairy Sci.* 49: 850-855.

538 Osborne BG (1986) In *Near Infrared Spectroscopy in Food Analysis*. Longman
539 Scientific and Technical, New York.

540 Panford A, Williams PC, Man JM (1988) Analysis of oilseeds for protein oil fiber and
541 moisture by near-infrared reflectance spectroscopy. *J Am Oil Chem Soc.* 65:
542 1627-1634.

543 Petisco C, García-Criado B, Mediavilla S, Vázquez de Aldana BR, Zabalgoeazcoa I,
544 García-Ciudad A (2006) Near-infrared reflectance spectroscopy as a fast and
545 non-destructive tool to predict foliar organic constituents of several woody
546 species. *Anal Bioanal Chem.* 386: 1823–1833.

547 Petisco C, García-Criado B, Vázquez de Aldana BR, Zabalgoeazcoa I, Mediavilla S,
548 García-Ciudad A, (2005) Use of near-infrared reflectance spectroscopy in
549 predicting nitrogen, phosphorus and calcium contents in heterogeneous woody
550 plant species. *Anal Bioanal Chem.* 382: 458–465.

551 Prakash O (1061) In Food and drinks in ancient India. Munshi Ram Manohar Lal,
552 Delhi. pp 165-168.

553 Saeed MK, Anjum S, Ahmad I, Nisa A, Ali S, Zia A, Ali S (2012) Nutritional facts and
554 free radical scavenging activity of turnip (*Brassica rapa*) from Pakistan. World
555 Appl Sci J 19: 370–375.

556 Scotter C (1990) Use of near infrared spectroscopy in the food industry with particular
557 reference to its applications to on/in-line food processes. Food Control. 1: 142–
558 149.

559 Shenk JS, Westerhaus MO (1996) Calibration the ISI way. In Near infrared
560 spectroscopy: the future waves. Davies A.M.C., Williams P., (eds.). NIR
561 Publications, Chichester, UK. pp198-202.

562 Shenk JS, Westerhaus MO (1991) Population definition, sample selection, and
563 calibration procedures for near infrared reflectance spectroscopy. Crop Sci, 31:
564 469-474.

565 Shenk JS, Workman JJ, Westerhaus MO (1992) Application of NIR spectroscopy to
566 agricultural products. In Handbook of Near-Infrared Analysis. Burns, D.A.,
567 Ciurczak, E.W. (Eds.), Dekker Inc., NewYork, NY.pp 383–431.

568 Sinelli N, Spinardi A, Di Egidio V, Mignani I, Casiraghi E (2008) Evaluation of quality
569 and nutraceutical content of blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.) by near and
570 mid-infrared spectroscopy, Postharv. Biol. Tech. 50, 31.

571 Soh AC, Frakes RV, Chilcote DO, Slepser DA (1984) Genetic Variation in Acid
572 Detergent Fiber, Neutral Detergent Fiber, Hemicellulose, Crude Protein, and
573 Their Relationship with In Vitro Dry Matter Digestibility in Tall Fescue. Crop
574 Sci. 24: 721-727.

575 Traka M, Mithen R (2009) Glucosinolates, isothiocyanates and human health.
576 Phytochem Rev 8: 269–282.

577 Türk M, Albayrak S, Balabanli C, Yüksel O (2009) Effects of fertilization on root and
578 leaf yields and quality of forage turnip (*Brassica rapa* L.) J Food, Agri Environ.
579 7: 339 - 342.

580 Van Soest PJ, Robertson JB (1985) In Analysis of forages and fibrous foods. Cornell
581 University Publication: Ithaca, New York. pp165.

582 Van Soest PJ, Wine RH (1967) Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. IV.
583 Determination of plant cell-wall constituents. Assoc. Off. Agr. Chem. J. 50: 50–
584 55.

585 Williams PC (2001) Implementation of Near-Infrared technology. In Near infrared
586 technology in the agricultural, food industries. Williams, P.C., Norris, K.H.
587 (eds.). American Association of Cereal Chemist, St. Paul, Minnesota, USA.
588 pp145–169.

589 Williams P, Sobering DC (1996) How do we do it: a brief summary of the methods we
590 use in developing near infrared calibrations. In Near Infrared Spectroscopy: The
591 Future Waves. Davies, A.M.C., Williams, P.C. (eds.), NIR Publications.
592 Chichester, UK. pp 185–188.

593 Wittkop B, Snowdon R, Friedt W (2012) New NIRS Calibrations for Fiber Fractions
594 Reveal Broad Genetic Variation in *Brassica napus* Seed Quality. J. Agric. Food
595 Chem. 60: 2248–2256.

596

597 **Table 1.** Fiber content in samples of turnip greens and turnip tops of *Brassica rapa*,
 598 analyzed in the laboratory.

ADF (%)				
	Samples	Range	Mean	SD ^a
Turnip greens	63	8.55-15.27	11.53	1.54
Turnip tops	71	10.41-21.91	15.98	2.54

599 ^a Standard deviation

600

601 **Table 2.** ADF content in the turnip greens and turnip tops samples belonging to the
 602 calibration and validation set of *Brassica rapa*, analyzed following the reference
 603 wet method.

604

ADF (%)			
	Range	Mean	SD ^a
Calibration set (n= 104)	8.75-20.02	13.87	2.98
Validation set (n=26)	8.55-18.81	13.67	3.01

605 ^a Standard deviation

606

607 **Table 3.** Calibration and cross validation statistics for ADF content in *Brassica rapa*.

608

Calibration							Cross Validation		
TM ^a	Range	Samples	Mean	SD ^b	SEC ^c	R ^{2d}	SECV ^e	RPD _{cv} ^f	r ² _{cv} ^g
0,0,1,1	8.75-20.02	101	13.81	2.95	0.86	0.91	1.07	2.77	0.87
1,4,4,1	8.75-20.02	104	13.80	2.96	0.65	0.95	0.88	3.36	0.91
2,5,5,2	8.75-20.02	103	13.82	2.95	0.56	0.96	0.89	3.33	0.91

609 ^a Mathematical treatment of the spectra.

610 ^b Standard deviation.

611 ^c Standard error of the calibration.

612 ^d Coefficient of determination of the calibration.

613 ^e Standard error of the cross validation.

614 ^f Relation between the standard deviation and the standard error of the cross validation.

615 ^g Coefficient of determination of the cross validation.

616

617 **Table 4.** Statistics of the external validation (n=26) applied to the calibration equations
 618 of the fiber content in *Brassica rapa*

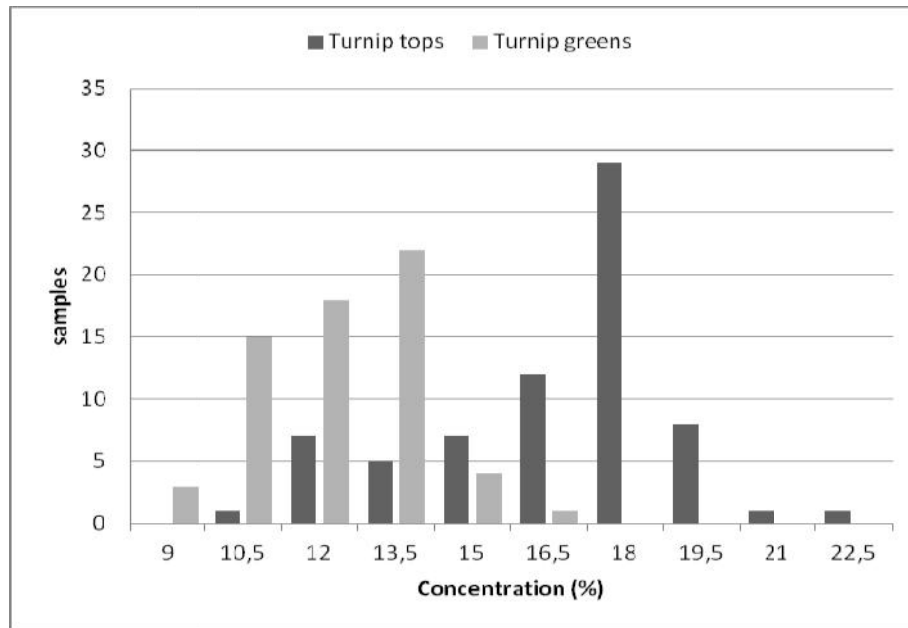
619

TM ^a	Range	Samples	Mean	SD ^b	SEP ^c	r ² _{ev} ^d	RPD _{ev} ^e	RER ^f
0,0,1,1	8.55-18.81	26	13.67	3.13	1.14	0.87	2.75	9.00
1,4,4,1	8.55-18.81	25	13.55	2.96	0.87	0.91	3.41	11.79
2,5,5,2	8.55-18.81	25	13.55	2.89	0.93	0.91	3.10	11.03

620 ^a Mathematical treatment.

- 621 ^b Standard deviation of the reference data of the external validation set.
- 622 ^c Standard error in the prediction
- 623 ^d Coefficient of determination of the external validation.
- 624 ^e Relation between the standard deviation and the standard error in the prediction.
- 625 ^f Relation between the data range and the standard error in the prediction.
- 626
- 627
- 628

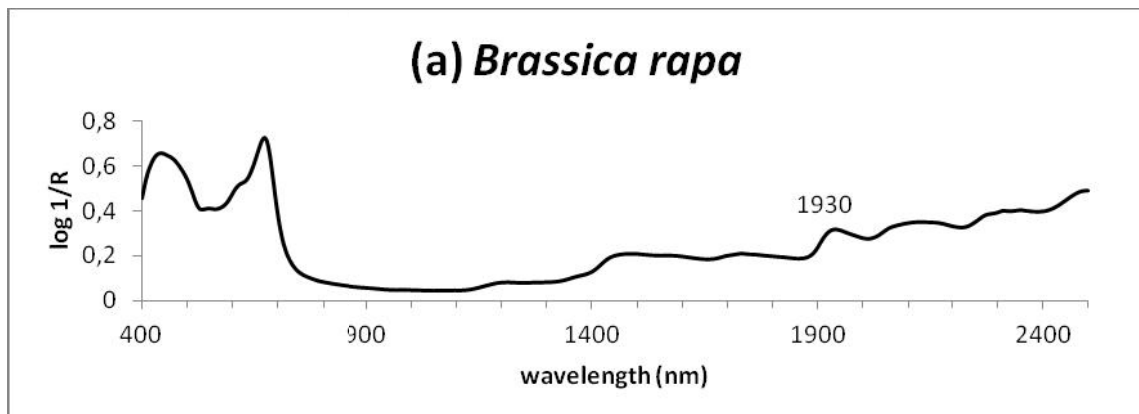
629
630



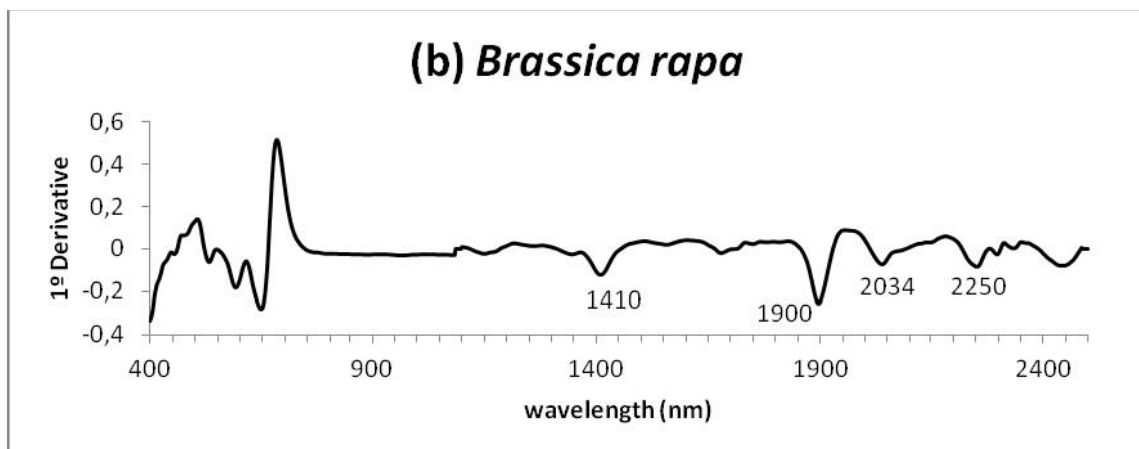
631
632

Figure 1. Graph of frequency distribution in turnip greens and turnip tops

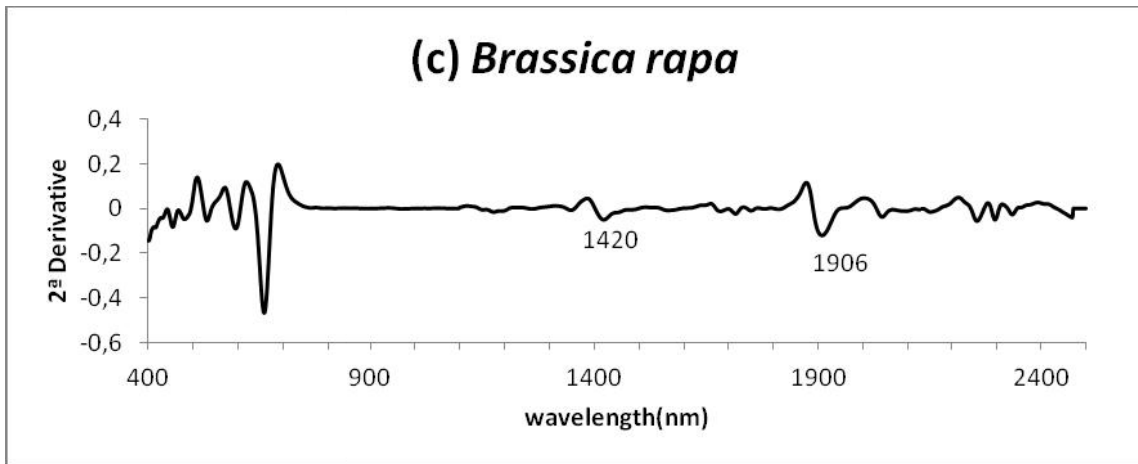
634



635



636

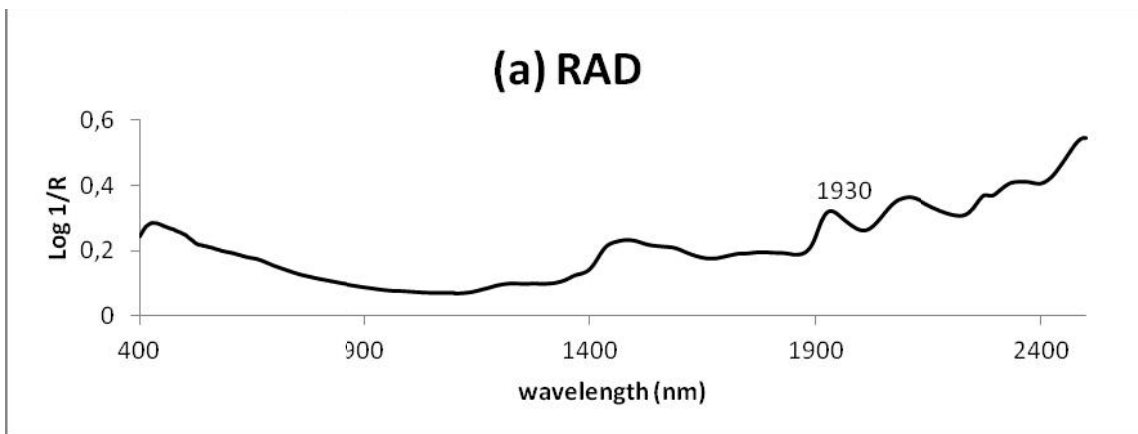


637

638 **Figure 2.** (a) Mean spectrum of the green parts of *Brassica rapa* (b) First derivative
 639 (SNV-DT) of the mean spectrum of the green parts of *Brassica rapa* (c) Second
 640 derivative (SNV-DT) of the mean spectrum of the green parts of *Brassica rapa*.

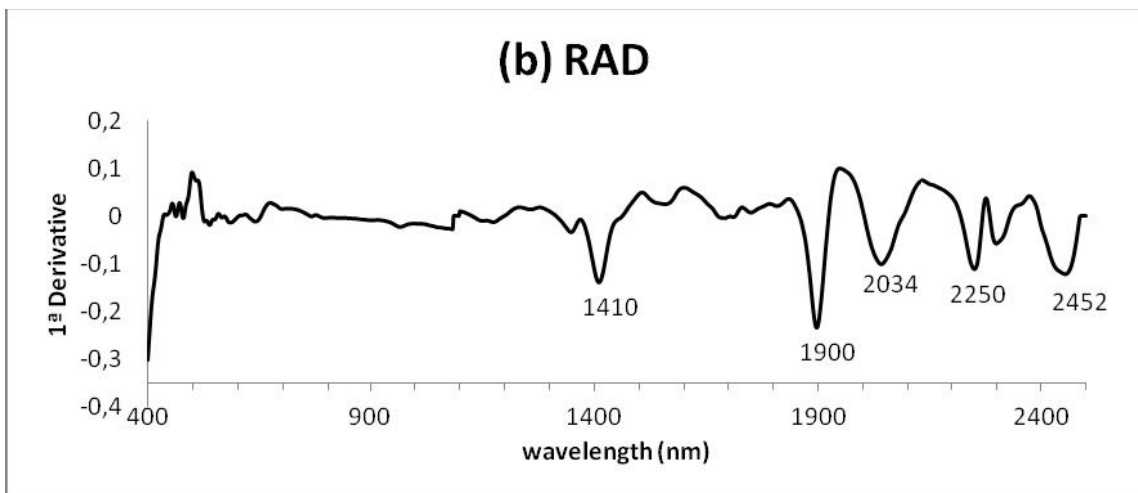
641

642

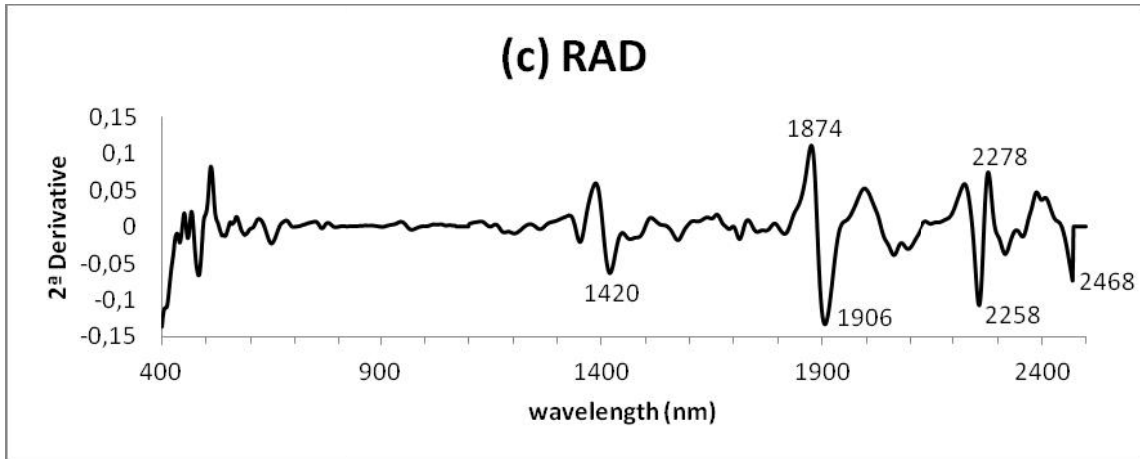


643

644



645



646

647

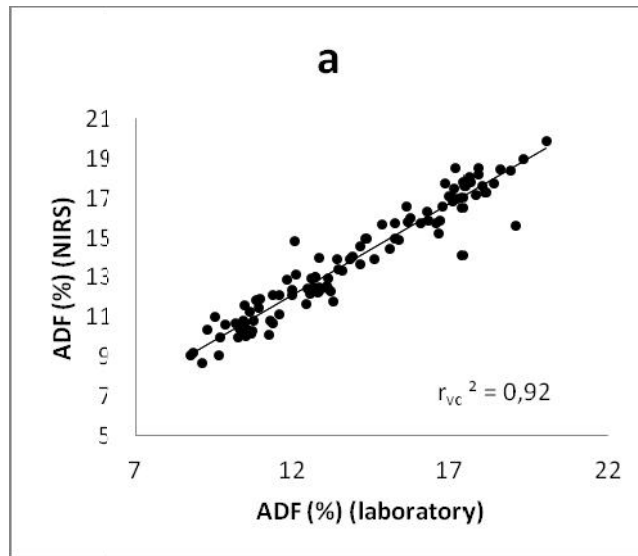
648

649

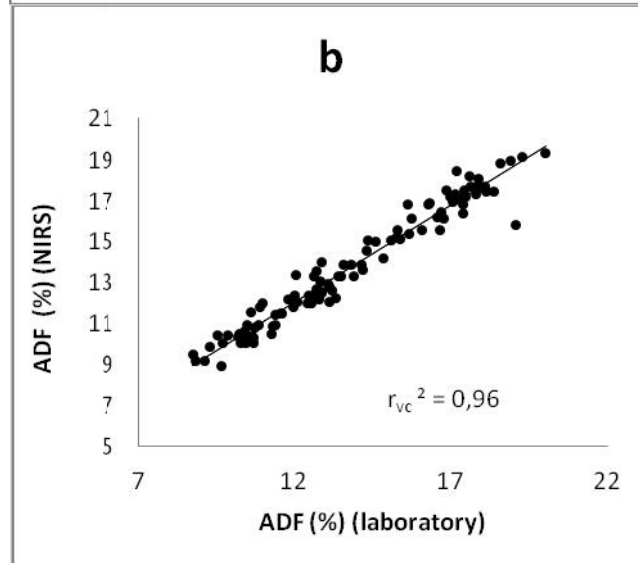
650

651

Figure 3. (a) Mean spectrum of the acid detergent residue of ADF (b) First derivative (SNV-DT) of the mean spectrum of ADR (c) Second derivative (SNV-DT) of the mean spectrum of ADR.



652



653

Figure 4. Scatter plot of the reference values against the prediction values in cross validation with respect to the ADF content applying the equations 1,4,4,1 (a) and 2,5,5,2 (b).

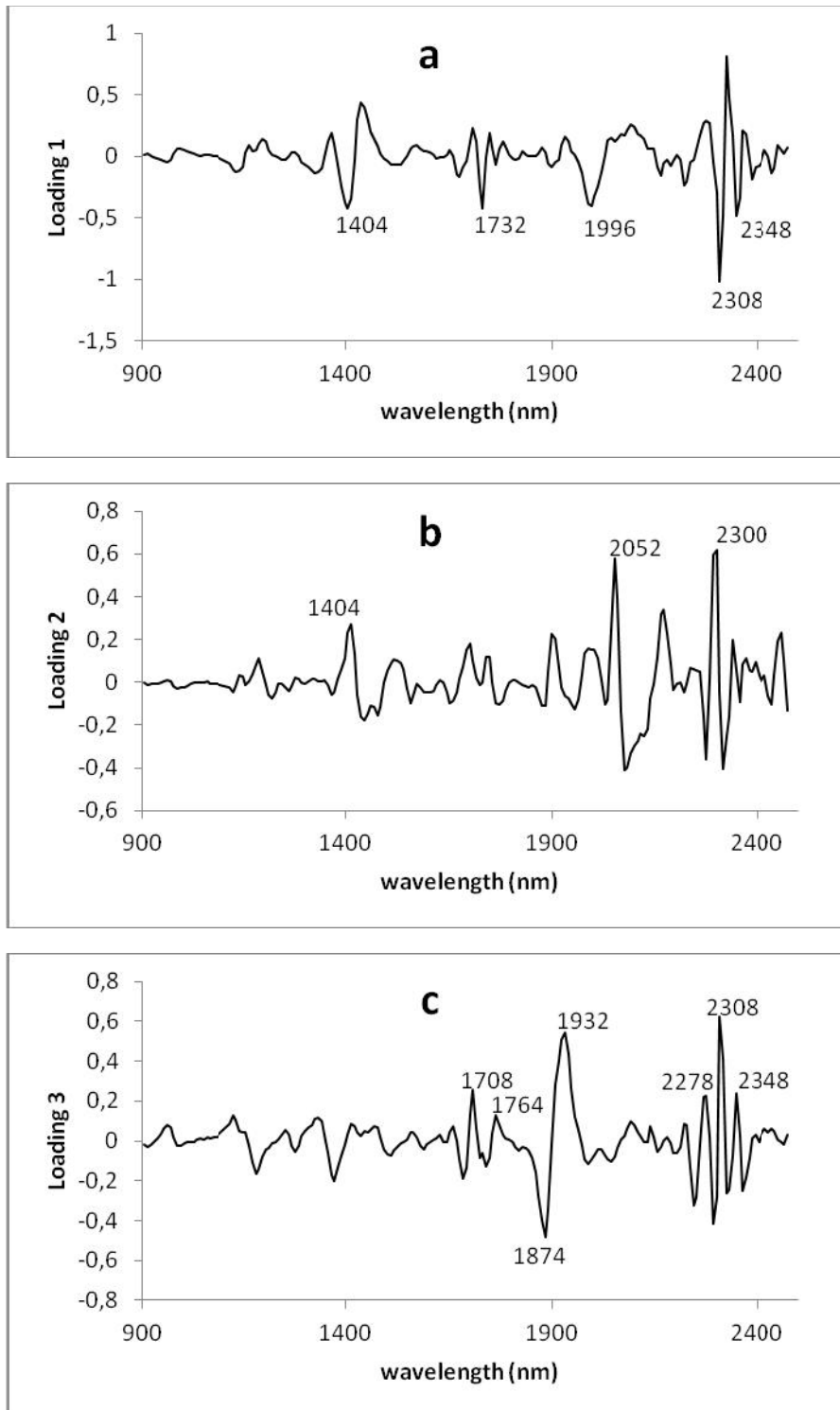


Figure 5 MPLS loading spectra for ADF in *Brassica rapa* in the second derivative (2,5,5,2) transformations. Panels a, b y c represent loading for factor 1, 2 and 3, respectively.



Rapum

1-7	Bluthe
8	Frucht
9, 10	Saame

Weisse runded Rube.