



TESIS DOCTORAL

“EVOLUCIÓN DE LOS PARÁMETROS DE CALIDAD FÍSICO-QUÍMICA Y FUNCIONAL DE DISTINTAS BRASSICAS SOMETIDAS A DIFERENTES TRATAMIENTOS POSTCOSECHA”

María Fernanda Fernández León

Departamento de Ingeniería del Medio Agronómico y Forestal

Conformidad de los directores:



Fdo. Mercedes Lozano Ruiz, David González Gómez y M. Concepción Ayuso Yuste

Badajoz, 2012

UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA
Departamento de Ingeniería del Medio Agronómico y Forestal



INSTITUTO TECNOLÓGICO AGROALIMENTARIO



**INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN Y
TECNOLOGÍA AGRARIA Y ALIMENTARIA**



TESIS DOCTORAL

**“EVOLUCIÓN DE LOS PARÁMETROS DE
CALIDAD FÍSICO-QUÍMICA Y FUNCIONAL DE
DISTINTAS BRASSICAS SOMETIDAS A
DIFERENTES TRATAMIENTOS POSTCOSECHA”**

María Fernanda Fernández León

Directores:

**Dra. Mercedes Lozano Ruiz
Dr. David González Gómez
Dra. M. Concepción Ayuso Yuste**

Badajoz, 2012

A mis padres y hermana

Agradecimientos

Condensar tantos años de trabajo, aprendizaje, experiencias, amistades, buenos y no tan buenos momentos, es difícil en tan poco espacio.

Para empezar, agradecer al Gobierno de Extremadura y al Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) por la concesión de la beca FPI-INIA con la que he podido desarrollar mi Tesis Doctoral en el Instituto Tecnológico Agroalimentario (INTAEX).

Agradecer a los fondos FEDER, al Fondo Social Europeo (Proyecto GR10006) y al Proyecto “Red de Investigación Transfronteriza de Extremadura-Centro-Alentejo (RITECA)” por la financiación.

Al Centro de Investigación “Finca La Orden-Vadesequera” por el suministro de muestras, en especial a D. José Ángel García y a D.^a Carlota Daza.

A mis directores de Tesis, las Dras. Mercedes Lozano y María Concepción Ayuso, por su apoyo y ayuda, así como al Dr. David González por su seguimiento, ayuda y dedicación constante, he aprendido mucho a vuestro lado, muchas gracias.

Agradecer al Dr. Giancarlo Colelli y a la Dra. M^a Luisa Amodio, el hecho de que mi estancia en la Università degli Studi di Foggia (Italia) fuese tan agradable y fructífera, así como a mis compañeros de laboratorio Ilde Ricci, Fedele Colantuono, Francesca Piazzolla, Michelle la Zazzera, Raffaella Rinaldi e Inma Pradas. “Sei sempre nei miei pensieri”.

A la Dra. Ana Cristina Agulheiro de la Universidad de Évora (Portugal), por darme la oportunidad de colaborar con su grupo. “Muito obrigada pela sua ajuda”.

A la Universidad de Extremadura, Escuela de Ingenierías Agrarias, en especial a la Dra. María Josefa Bernalte, por sus consejos y apoyo, y a la Dra. Sara Morales por sus constantes ánimos. También al Dr. Juan Florencio Tejeda por darme la oportunidad de empezar en todo este “mundo” de la investigación.

A todos y cada uno de mis compañeros del INTAEX, por hacerme el día a día más llevadero y hacerme sentir como en casa. A D. Manuel Martín y Dña. Teresa

Hernández, directores del centro durante mi etapa laboral en él. A Juan y a Paulino por ayudarme con el “papeleo”. A Ángeles, Andrés, M^a Agustina y Pepi por su apoyo diario. A Charo, Flori, Isidro, Pepe y Rafa por sus consejos y ánimos. A Carmela, Matilde, Lola, M^a Jesús, Olivia y Nieves por sus ánimos y atenciones. Al departamento de Aceites, en especial a José M^a, Nieves y Juanma por estar siempre interesados en mi trabajo, así como a Manolo Plaza y Beni. A Merche, Tomasa y Paco por las horas de transferencia y seminarios. A Moni, Isabel, Esther y Ángela por su compañía en las interminables tardes de trabajo. Al grupo de enología, Esperanza, Raquel, Esther, Balbi, Inma y Dani por su apoyo y amistad. A Loli y Sergio por su ayuda. A Francisco, Patricia y Maribel por su interés. A mis compañeros de despacho en esta última etapa de la Tesis, Jesús, Belén, Esther, Rosa y Diego gracias por su ayuda y comprensión. A Manolo Serradilla, por tantas horas compartidas de trabajo, por sus consejos y ánimos. A Kiko por su amistad, ayuda y por ser mi confidente en muchas ocasiones. A Paco por sus consejos y apoyo. A Choni por su gran ayuda, apoyo incondicional, por animarme y protegerme, gracias de verdad. Y a mis compañeros de desayuno Chapi, Carmina, Gloria, Laura, Rebeca, Elena, Valle, Meli, Diana, Toni, Juanra, Marisol, Sergio, Cristina y Roberto, entre otros, gracias por esas tertulias que nos han hecho reírnos y desconectar del trabajo.

A mi familia política Muñoz Marín, por los momentos que no he podido compartir con ellos, en especial uno de los más importantes como ha sido la llegada de Lara, gracias por su cariño, apoyo y comprensión.

A mi segunda familia política, mi cuñado Kiko y a Joaquina, por estar siempre ahí, apoyándome, animándome y ayudándome en todo lo que ha estado en su mano, muchas gracias.

A mi familia, en especial a mis tíos y primos, así como a mis amigas y amigos por su cariño, apoyo y comprensión diaria.

A mis abuelos, Benito, Agustín y Benita, porque aunque no estén físicamente conmigo siento su cariño y apoyo diariamente. Y a mi abuela Fernanda por su dedicación, apoyo, cariño incondicional y por valorarme tanto.

A mis padres, Teresa y Jerónimo, por su cariño, consejos, apoyo, dedicación, paciencia, por ayudarme en todo lo posible y lo imposible para ellos, por estar en todo momento a mi lado y por creer tanto en mí, muchas gracias.

A Jose, por quererme tanto, hacerme sentir importante, animarme y sacarme una sonrisa en los momentos difíciles, por su ayuda, paciencia y comprensión, gracias de verdad.

A mi hermana Ana M^a, porque sin ella no hubiera sido capaz de realizar este trabajo. Mi compañera, trabajadora incansable y meticulosa, mi mano derecha, mi consejera, mi apoyo. Por su cariño, paciencia y dedicación a este trabajo. Por su labor diaria como hermana-amiga dándome ánimos en todo momento y creyendo tanto en mí. Sin ella este trabajo no hubiera sido posible, mil gracias por estar a mi lado.

Sin duda, lo mejor de este trabajo no son los resultados, ni siquiera las publicaciones, son las experiencias personales que he tenido y que no cambiaría por nada del mundo.

A todos, gracias de corazón.

ÍNDICE

	Página
RESUMEN	1
ABSTRACT	3
1.- INTRODUCCIÓN GENERAL	7
1.1.- Hortalizas y verduras	7
1.1.1.- Brassicas.....	8
1.1.1.1.- Brócoli.....	10
1.1.1.2.- Coles o repollos	12
1.2.- Importancia económica	13
1.3.- Parámetros de calidad	16
1.3.1.- Parámetros de calidad físico-química	17
1.3.2.- Parámetros de calidad funcional	18
1.3.2.1.- Vitamina C	18
1.3.2.2.- Fitocompuestos o fitoquímicos	19
1.3.2.2.1.- Carotenoides	20
1.3.2.2.2.- Clorofilas	21
1.3.2.2.3.- Compuestos fenólicos.....	22
1.3.2.2.4.- Glucosinolatos	24
1.4.- Tecnologías postcosecha	27
1.4.1.- Concepto, objetivos y ámbito de la postcosecha.....	27
1.4.2.- Biología y tecnología postcosecha.....	28
1.4.2.1.- Factores biológicos involucrados en el deterioro vegetal	29
1.4.2.1.1.- Respiración	29
1.4.2.1.2.- Producción y sensibilidad al etileno	30
1.4.2.1.3.- Cambios en la composición.....	30
1.4.2.1.4.- Transpiración	32
1.4.2.1.5.- Deterioros fisiológicos.....	32
1.4.2.1.6.- Daños físicos.....	35
1.4.2.1.7.- Deterioros patológicos.....	35
1.4.2.2.- Factores ambientales involucrados en el deterioro vegetal	36

1.4.2.2.1.- Temperatura.....	36
1.4.2.2.2.- Humedad relativa.....	36
1.4.2.2.3.- Composición atmosférica	37
1.4.2.2.4.- Etileno.....	38
1.4.2.2.5.- Otros factores.....	38
1.4.3.- Tecnologías de conservación en atmósfera controlada y modificada....	39
1.4.4.- Tecnología de aplicación de 1-metilciclopropeno (1-MCP).....	43
1.5.- Fundamentos de los métodos analíticos.....	48
2.- JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS/OBJECTIVES	57
2.1.- Justificación.....	57
2.2.- Objetivos	57
2.3.- Objectives	58
3.- MATERIAL Y MÉTODOS	61
3.1.- Material vegetal y diseño experimental	61
3.1.1.- Caracterización físico-química y funcional de brassicas	61
3.1.2.- Aplicación de diferentes tecnologías postcosecha al brócoli ‘Parthenon’	63
3.1.2.1.- Alteración de las condiciones comerciales de atmósfera controlada usadas para el almacenamiento de brócoli ‘Parthenon’	63
3.1.2.2.- Aplicación de diferentes estrategias postcosecha para preservar la calidad del brócoli ‘Parthenon’ durante el almacenamiento y vida útil: atmósfera controlada y aplicación de 1-MCP.....	64
3.1.2.3.- Mantenimiento de la calidad y de los compuestos funcionales del brócoli ‘Parthenon’ almacenado mediante envasado en atmósfera modificada	67
3.2.- Métodos.....	69
3.2.1.- Tasa respiratoria.....	69
3.2.2.- Composición de gases de la atmósfera modificada	70
3.2.3.- Permeabilidad de un film plástico.....	70
3.2.4.- Apariencia externa y olor	71
3.2.5.- Parámetros de calidad físico-química	72

3.2.5.1.- Peso y pérdida de peso	72
3.2.5.2.- Textura.....	72
3.2.5.3.- Color	73
3.2.5.4.- pH	74
3.2.5.5.- Contenido en sólidos solubles	74
3.2.5.6.- Humedad	74
3.2.6.- Parámetros de calidad funcional	75
3.2.6.1.- Vitamina C	75
3.2.6.2.- Carotenoides	78
3.2.6.3.- Clorofilas	79
3.2.6.4.- Compuestos fenólicos	80
3.2.6.5.- Glucosinolatos intactos.....	84
3.2.6.6.- Actividad antioxidante	87
3.2.7.- Parámetros de calidad y validación de métodos	89
3.2.8.- Análisis estadístico.....	90
4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	93
4.1.- Caracterización físico-química y funcional de brassicas. Discusión general.....	93
4.1.1.- Parámetros de calidad físico-química	93
4.1.2.- Parámetros de calidad funcional	95
ARTÍCULOS: Caracterización de brassicas.....	103
4.1.a.- Fast and accurate alternative UV-chemometric method for the determination of Chlorophyll A and B in broccoli (<i>Brassica oleracea Italica</i>) and cabbage (<i>Brassica oleracea Sabauda</i>) plants.....	105
4.1.b.- PLS Calibration to Resolve Overlapping Peaks of Lutein and Zeaxanthin in Vegetable Samples by LC.....	119
4.1.c.- Identification, quantification and comparison of the principal bioactive compounds and external quality parameters of two broccoli cultivars	131
4.1.d.- Quality evaluation of two Savoy cabbage cultivars: physicochemical parameters and bioactive compounds.....	147

4.2.- Aplicación de diferentes tecnologías postcosecha al brócoli ‘Parthenon’.	
Discusión general.....	165
4.2.1.- Alteración de las condiciones comerciales de atmósfera controlada usadas para el almacenamiento de brócoli ‘Parthenon’. Influencia sobre los parámetros de calidad externa y sobre los biocompuestos.....	165
4.2.2.- Aplicación de diferentes estrategias postcosecha para preservar la calidad del brócoli ‘Parthenon’ durante el almacenamiento y vida útil: atmósfera controlada y aplicación de 1-MCP	173
4.2.3.- Mantenimiento de la calidad y de los compuestos funcionales del brócoli ‘Parthenon’ almacenado mediante envasado en atmósfera modificada.....	185
ARTÍCULOS: Aplicación de técnicas postcosecha.....	197
4.2.a.- Altered commercial controlled atmosphere storage conditions for ‘Parthenon’ broccoli plants (<i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>italica</i>). Influence on the outer quality parameters and on the health-promoting compounds	199
4.2.b.- Different postharvest strategies to preserve broccoli quality during storage and shelf life: Controlled atmosphere and 1-MCP	219
4.2.c.- Retention of quality and functional values of broccoli ‘Parthenon’ stored in modified atmosphere packaging.....	245
5.- CONCLUSIONES GENERALES	267
6.- REFERENCIAS	273
7.- PUBLICACIONES-COMUNICACIONES	301

ÍNDICE de FIGURAS

	Página
1.- INTRODUCCIÓN GENERAL	7
Figura 1.1: Grupos de cultivo y variaciones de <i>Brassica oleracea</i>	9
Figura 1.2: Formación de la pella de brócoli	11
Figura 1.3: Apertura de las flores de brócoli	11
Figura 1.4: Coles o repollos de hoja lisa (A), de hoja rizada (B) y lombarda (C)	12
Figura 1.5: Estructura química del ácido L-ascórbico (A) (forma reducida de la vitamina C) y del ácido dehidroascórbico (B) (forma oxidada de la vitamina C).....	19
Figura 1.6: Estructura química del β -caroteno (caroteno) (A) y de la luteína (xantofila) (B).....	21
Figura 1.7: Estructura química de la clorofila A y de la clorofila B.....	22
Figura 1.8: Estructuras químicas de los ácidos fenólicos: gálico (A) (derivado hidroxibenzoico), clorogénico (B) y sinápico (C) (derivados hidroxicinámicos).....	23
Figura 1.9: Estructura química de los flavonoles: quercetina y kaempferol.....	24
Figura 1.10: Estructura química general de los glucosinolatos	24
Figura 1.11: Hidrólisis de los glucosinolatos catalizada por la enzima mirosinasa.....	26
Figura 1.12: Esquema de un cromatógrafo de líquidos	49
Figura 1.13: Partes y procesos fundamentales en un espectrómetro de masas	50
3.- MATERIAL Y MÉTODOS	61
Figura 3.1: Brócoli y Col de Milán	62
Figura 3.2: Cabinas de almacenamiento en atmósfera controlada.....	64
Figura 3.3: Bolsa o contenedor estanco de plástico	65
Figura 3.4: Dispositivo para realizar la mezcla de reacción y difundir el 1-MCP gas.....	66
Figura 3.5: Materiales usados para la preparación de la mezcla de reacción	66
Figura 3.6: Bolsa de floretes de brócoli	68
Figura 3.7: Sistema dinámico, con la muestra en un contenedor cerrado con entrada y salida de gases	69

Figura 3.8: Escala numérica de amarilleamiento del brócoli (Cantwell y Suslow, 1999).....	71
Figura 3.9: Aparición de podredumbre en brócoli (Cantwell y Suslow, 1999)	72
Figura 3.10: Cromatograma del ácido ascórbico presente en una muestra de brócoli, registrado a 260 nm	76
Figura 3.11: Cromatogramas del ácido ascórbico y dehidroascórbico presentes en una muestra de brócoli, registrados a 261 nm y a 348, respectivamente	77
Figura 3.12: Cromatograma de los pigmentos carotenoides presentes en una muestra de brócoli, registrado a 460 nm	79
Figura 3.13: Espectros de absorción de patrones de clorofila A, B y mezcla de ambas, así como de una muestra de brócoli, registrados de 600 a 700 nm	80
Figura 3.14: Cromatograma de masas en modo SIM de los compuestos fenólicos presentes en una muestra de brócoli.....	83
Figura 3.15: Espectro de masas del ión precursor (m/z 358) y del ión de fragmentación (m/z 97) en una muestra patrón de sinigrina	85
Figura 3.16: Cromatogramas, de las masas extraídas en modo Full Scan, de los glucosinolatos intactos presentes en una muestra de brócoli	86
Figura 3.17: Estructura química del ABTS (A) y del DPPH (B)	87
Figura 3.18: Estructura química del Trolox	88
4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	93
Figura 4.1: Espacio CIELab para las muestras de brócoli y col de Milán.....	95
Figura 4.2: Concentraciones de gases usadas generalmente para almacenar brócoli en atmósfera controlada (verde), zona de peligro (naranja) y condiciones propuestas en nuestro trabajo (azul)	166
Figura 4.3: Evolución del contenido de pigmentos carotenoides (A) y clorofilas (B) a lo largo del almacenamiento en atmósfera controlada (AC) y al aire (Control), ambas a 1-2 °C y 85-90% HR	169
Figura 4.4: Evolución del contenido de ácidos fenólicos (A) y flavonoides (B) a lo largo del almacenamiento en atmósfera controlada (AC) y al aire (Control), ambas a 1-2 °C y 85-90% HR	170

Figura 4.5: Evolución del contenido de glucobrasicina a lo largo del almacenamiento en atmósfera controlada (AC) y al aire (Control), ambas a 1-2 °C y 85-90% HR171

Figura 4.6: Evolución de la apariencia externa para los tres tratamientos postcosecha (Control, Atmósfera controlada (AC) y 1-MCP) a la salida del almacenamiento en refrigeración a 1-2 °C, tras el almacenamiento en refrigeración más 2 días de vida útil (2dvu) a 20 °C y tras el almacenamiento en refrigeración más 4 días de vida útil (4dvu) a 20 °C. De 5, excelente, a 1, no comestible.....174

Figura 4.7: Deshidratación y pérdida de compacidad de la pella de brócoli175

Figura 4.8: Evolución del contenido de ácido ascórbico (A) y del valor de actividad antioxidante (B) para los tres tratamientos postcosecha (Control, Atmósfera Controlada (AC) y 1-MCP) a la salida del almacenamiento en refrigeración a 1-2 °C, tras el almacenamiento en refrigeración más 2 días de vida útil (2dvu) a 20 °C y tras el almacenamiento en refrigeración más 4 días de vida útil (4dvu) a 20 °C.....179

Figura 4.9: Evolución del contenido de β -cartoneno (A) y lutéina (B) para los tres tratamientos postcosecha (Control, Atmósfera Controlada (AC) y 1-MCP) a la salida del almacenamiento en refrigeración a 1-2 °C, tras el almacenamiento en refrigeración más 2 días de vida útil (2dvu) a 20 °C y tras el almacenamiento en refrigeración más 4 días de vida útil (4dvu) a 20 °C180

Figura 4.10: Evolución del contenido de clorofila A (A) y clorofila B (B) para los tres tratamientos postcosecha (Control, Atmósfera Controlada (AC) y 1-MCP) a la salida del almacenamiento en refrigeración a 1-2 °C, tras el almacenamiento en refrigeración más 2 días de vida útil (2dvu) a 20 °C y tras el almacenamiento en refrigeración más 4 días de vida útil (4dvu) a 20 °C181

Figura 4.11: Evolución del contenido fenólico total para los tres tratamientos postcosecha (Control, Atmósfera Controlada (AC) y 1-MCP) a la salida del almacenamiento en refrigeración a 1-2 °C, tras el almacenamiento en refrigeración más 2 días de vida útil (2dvu) a 20 °C y tras el almacenamiento en refrigeración más 4 días de vida útil (4dvu) a 20 °C182

Figura 4.12: Evolución del contenido de los glucosinolatos alifáticos (A), indólicos (B) y aromáticos (C) para los tres tratamientos postcosecha (Control, Atmósfera Controlada (AC) y 1-MCP) a la salida del almacenamiento en refrigeración a 1-2 °C, tras el almacenamiento en refrigeración más 2 días de vida útil (2dvu) a 20 °C y tras el almacenamiento en refrigeración más 4 días de vida útil (4dvu) a 20 °C	184
Figura 4.13: Evolución del porcentaje de gases en el interior de la bolsa de floretes de brócoli a 5 °C.....	187
Figura 4.14: Evolución de la apariencia externa (A), olor (B) y pérdida de peso (C) para las muestras almacenadas al aire (Control) y las almacenadas en atmósfera modificada (AM) a lo largo del almacenamiento a 5 °C. La apariencia va de 5, excelente, a 1, no comestible, y el olor va de 5, olor típico, a 1, olor a enmohecimiento	189
Figura 4.15: Evolución de los parámetros de color L* (A), a* (B) y b* (C) para las muestras almacenadas al aire (Control) y las almacenadas en atmósfera modificada (AM) a lo largo del almacenamiento a 5 °C.....	191
Figura 4.16: Evolución del valor de actividad antioxidante para las muestras almacenadas al aire (Control) y las almacenadas en atmósfera modificada (AM) a lo largo del almacenamiento a 5 °C.....	191
Figura 4.17: Evolución del contenido de pigmentos carotenoides (A) y clorofilas (B) para las muestras almacenadas al aire (Control) y las almacenadas en atmósfera modificada (AM) a lo largo del almacenamiento a 5 °C.....	192
Figura 4.18: Evolución del contenido en vitamina C para las muestras almacenadas al aire (Control) y las almacenadas en atmósfera modificada (AM) a lo largo del almacenamiento a 5 °C.....	193
Figura 4.19: Evolución del contenido fenólico total para las muestras almacenadas al aire (Control) y las almacenadas en atmósfera modificada (AM) a lo largo del almacenamiento a 5 °C.....	194
Figura 4.20: Evolución del contenido en glucosinolatos intactos totales para las muestras almacenadas al aire (Control) y las almacenadas en atmósfera modificada (AM) a lo largo del almacenamiento a 5 °C	195

ÍNDICE de TABLAS

1.- INTRODUCCIÓN GENERAL.....	7
Tabla 1.1: Superficie, Producción y Valor de Hortalizas en España en 2010.....	14
Tabla 1.2: Superficie y Producción de variedades de Col en España en 2010	14
Tabla 1.3: Estructura de la cadena lateral R, nombre químico y nombre común de los glucosinolatos identificados	25
3.- MATERIAL Y MÉTODOS	61
Tabla 3.1: Condiciones de elución en gradiente para la determinación de ácido ascórbico.....	76
Tabla 3.2: Condiciones de elución en gradiente para la determinación de carotenoides.....	78
Tabla 3.3: Condiciones de elución en gradiente para la determinación de compuestos fenólicos	82
Tabla 3.4: Parámetros del espectrómetro de masas ajustados para los patrones usados	82
Tabla 3.5: Condiciones de elución en gradiente para la determinación de glucosinolatos intactos	84
4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	93
Tabla 4.1: Parámetros de calidad físico-química de dos cultivares de brócoli y col de Milán	94
Tabla 4.2: Parámetros de calidad funcional de los cultivares de brócoli y col de Milán	97
Tabla 4.3: Correlaciones entre los diferentes parámetros estudiados expresados como coeficiente de correlación de Pearson	98
Tabla 4.4: Contenido en glucosinolatos intactos de dos cultivares de brócoli y col de Milán	100
Tabla 4.5: Evolución de los parámetros pérdida de peso, firmeza, color y contenido en sólidos solubles (CSS) a lo largo del almacenamiento en atmósfera controlada (AC) y al aire (Control), ambas a 1-2 °C y 85-90% HR	168
Tabla 4.6: Evolución del contenido de vitamina C (ácido ascórbico) a lo largo del almacenamiento en atmósfera controlada (AC) y al aire (Control), a 1-2 °C y 85-90% HR.....	168

Tabla 4.7: Evolución del contenido de glucosinolatos intactos (GS) a lo largo del almacenamiento en atmósfera controlada (AC) y al aire (Control), ambas a 1-2 °C y 85-90% HR	172
Tabla 4.8: Evolución de los parámetros físico-químicos (pérdida de peso, firmeza, color y contenido en sólidos solubles) para los tres tratamientos postcosecha (Control, Atmósfera controlada (AC) y 1-MCP) a la salida del almacenamiento en refrigeración a 1-2 °C	176
Tabla 4.9: Evolución de los parámetros físico-químicos (pérdida de peso, firmeza, color y contenido en sólidos solubles) para los tres tratamientos postcosecha (Control, Atmósfera controlada (AC) y 1-MCP) tras el almacenamiento en refrigeración más 2 días de vida útil (2dvu) a 20 °C.....	177
Tabla 4.10: Evolución de los parámetros físico-químicos (pérdida de peso, firmeza, color y contenido en sólidos solubles) para los tres tratamientos postcosecha (Control, Atmósfera controlada (AC) y 1-MCP) tras el almacenamiento en refrigeración más 4 días de vida útil (4dvu) a 20 °C.....	178

RESUMEN/ABSTRACT

RESUMEN

Cada vez más el consumidor demanda productos con mayor calidad, tanto desde un punto de vista sensorial, como también nutricional y funcional. No sólo se busca que el alimento realice las funciones nutricionales básicas, sino también que con su ingesta pueda reportar beneficios para la salud e incluso poder prevenir enfermedades. Por lo tanto, se hace necesario el estudio de los parámetros físico-químicos, que determinan la calidad sensorial del alimento, así como el estudio de los parámetros de calidad funcional.

Dentro de los alimentos más demandados en la actualidad, están las frutas y hortalizas, y dentro de estas últimas destacar el auge de los vegetales de la familia de las Brassicas. Estos vegetales destacan por ser beneficiosos para la salud, debido fundamentalmente a su gran contenido en compuestos funcionales como vitamina C, carotenoides, clorofilas, compuestos fenólicos y glucosinolatos, y además son también importantes a nivel económico.

Así, en esta Tesis se han caracterizado y comparado dos tipos de brassicas (brócoli y col de Milán) cultivadas ambas en las Vegas Bajas del Guadiana (Badajoz). La caracterización realizada ha sido en base a los parámetros de calidad físico-químicos y funcionales. Obteniéndose que dentro de los cultivares de brócoli estudiados, 'Parthenon' y 'Mónaco', fue 'Pathenon' el que presentó de forma general, mejores propiedades físico-químicas y funcionales. Y dentro de los cultivares de col de Milán estudiados, 'Dama' y 'Leticia', fue 'Dama' el que, de forma general, destacó por su color verde más intenso y además presentó mayores contenidos en compuestos bioactivos.

El estudio de la composición funcional en alimentos requiere disponer de métodos analíticos apropiados, de elevada sensibilidad y selectividad, de forma que sea posible identificar y determinar de forma exacta el contenido de los diferentes compuestos bioactivos presentes en ellos. Para ello, en esta Tesis, ha sido necesario establecer diferentes métodos analíticos del tipo espectrométricos-quimiométricos y cromatográficos acoplados a espectroscopía de masas y ultravioleta visible, que han

permitido la identificación y cuantificación de una amplia gama de compuestos funcionales.

Por otro lado se ha estudiado el comportamiento postcosecha del brócoli 'Parthenon' en relación al incremento de su vida útil y al mantenimiento de sus cualidades físico-químicas y funcionales aplicando tres tratamientos postcosecha. En primer lugar se aplicó una atmósfera controlada formada por un 10% de O₂ y un 5% de CO₂. En segundo lugar se estudió la aplicación de 1-MCP y finalmente el envasado en atmósfera modificada usando polipropileno microperforado como plástico de envase. Se observó que la utilización de atmósferas controladas y modificadas fueron las estrategias más eficaces para mantener los parámetros de calidad físico-química y funcional.

ABSTRACT

Currently, consumers are demanding highly quality foodstuff, not only from a sensory point of view, but also with high nutritional and functional properties. Food should not be restricted to be a source of the basic nutritional compounds. Its consume ought to provide a number of healthy benefits or even though should prevent the occurrence of certain sickness. Therefore, it is necessary to study the main parameters that explain the food sensory quality, together with those that refer the functional quality and the biological activity of food.

Considering the huge variety of foodstuff, consumers are given a notorious relevance to fruit and vegetables. Among them, it is important to highlight the increasing tendency to consume Brassicas. These vegetables are characterized by their healthy benefits due to their high contents of functional compounds such as vitamin C, carotenoids, chlorophylls, phenols and glucosinolates. In addition, it is also important to emphasize their economical profitability.

Thus, in this Dissertation, two types of Brassicas (broccoli and Milan cabbage) grown in las Vegas Bajas del Guadiana (Badajoz) were evaluated in terms of physico-chemic and functional quality parameters. Among the studied broccoli plants ('Parthenon' and 'Monaco'), 'Parthenon' was the one showing better physicochemical and functional quality parameters. Regarding the assessed cabbage cultivars ('Dama' and 'Leticia'), in general terms, 'Dama' exhibited a more intense green colour and higher contents of bioactive compounds.

In order to establish the functional composition of foodstuff, it is necessary to have analytical methods with enough sensitivity and selectivity allowing the accurate identification and quantification of the different bioactive compounds found in foodstuff. Thus, in this Dissertation, different analytical procedures based on spectroscopic-chemometric methods and chromatographic separation methods coupled to mass and Uv-Vis spectroscopic were optimized to identify and quantify a broad variety of functional compounds.

Finally, the postharvest behaviour of 'Parthenon' broccoli was assessed, in terms of shelf-life extension, physicochemical and functional quality, after applying three different postharvest treatments. Firstly, a controlled atmosphere condition was studied consisted in an air composition of 10% of O₂ and 5% of CO₂. Secondly, the application of 1-MCP was assessed and finally the use of modified atmospheres packaging using polypropylene microperforated. As result, the most suitable conditions to preserve both physicochemical and functional quality parameters were the used of controlled atmospheres and modified atmospheres conditions.

1.- INTRODUCCIÓN GENERAL

1.- INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1.- Hortalizas y verduras

Entre los alimentos que forman parte de nuestra dieta habitual, se encuentran las hortalizas y verduras, vegetales de enorme interés por su composición y riqueza en micronutrientes y fibra. Existen diversos factores que inciden en la composición de estos productos (especie y cultivar, sistema de cultivo, condiciones medioambientales...), dando hortalizas de mayor o menor calidad.

Entre los vegetales que consumimos diariamente, y que no se caracterizan en general por el aporte energético, las hortalizas son un grupo importante y nadie duda de los resultados beneficiosos de su ingesta, su riqueza en vitaminas, elementos minerales y fibra, hace que su consumo sea imprescindible para conseguir una alimentación sana y equilibrada.

Cuando hablamos de hortalizas y verduras nos referimos a las plantas comestibles que se cultivan en huertas, esto es, son plantas herbáceas hortícolas, de las que se utilizan las partes del vegetal que son comestibles (Belitz y Grosch, 1997). El Código Alimentario Español (CAE., 1991) define hortaliza como: *“Cualquier planta herbácea hortícola en sazón (término que se emplea cuando una planta ha alcanzado el grado de madurez que le permite ser comida) que se puede utilizar como alimento, ya sea en crudo o cocinada”*. Indica, además, que la denominación de verdura distingue a un grupo de hortalizas en las que: *“La parte comestible está constituida por sus órganos verdes (hojas, tallos o inflorescencias)”*. No obstante, a nivel popular, este término se utiliza indistintamente ampliando el nombre de verduras a todas las hortalizas.

En este grupo de alimentos (hortalizas), además de las verduras, se encuentran también las legumbres frescas, por ejemplo la judía verde; los tubérculos como patata, batata; las raíces tuberosas, entre ellas está la mandioca o yuca, ricas en almidón y por tanto de alto contenido energético; y los hongos superiores o setas.

Dada la gran diversidad de especies vegetales, así como las diferentes partes de la planta que se utilizan como hortaliza (raíces, bulbos, tallos, hojas, flores y frutos), su

composición nutricional también será bastante diferente. Desde el punto de vista químico, las hortalizas son productos ricos en agua, pobres en carbohidratos, proteínas y lípidos, por lo que son alimentos de escasa importancia desde el punto de vista plástico y energético. Sin embargo tienen gran interés por su contenido en micronutrientes: vitaminas y minerales (Belitz y Grosch, 1997; Pattee, 1985; Rangana, 1986; Torija y Cámara, 1999).

Se trata de alimentos que se pueden consumir en estado fresco o sometidos a tratamiento culinario. También, y dado su carácter perecedero, se someten a diferentes métodos de conservación que permiten ampliar su periodo de vida útil, obteniendo distintos derivados. Todos estos procesos tendrán repercusión en el contenido de nutrientes.

1.1.1.- Brassicas

Dentro de las hortalizas destaca el género *Brassica* que pertenece a la familia Brasicáceas (*Brassicaceae*), también llamada familia Crucíferas (*Cruciferae*) debido al aspecto de cruz de su flor. Esta familia se caracteriza por su gran complejidad botánica (Nuez et al., 1999), e incluye diversas especies de gran interés agrícola, destacando la especie *Brassica oleracea*, de la que existen numerosas variedades botánicas.

El género *Brassica* es destacable por incluir muchas e importantes especies cultivadas en horticultura, existiendo más de 30 especies silvestres e híbridos, y numerosos cultivares adicionales e híbridos de origen cultivado. Muchas son anuales o bienales, y algunas incluso son pequeños arbustos.

El género es original del oeste de Europa, del clima mediterráneo y regiones templadas de Asia. Además de las especies cultivadas, que se producen mundialmente, muchas de las especies silvestres son malezas, especialmente en Norteamérica, Sudamérica y Australia.

Dentro de las brassicas, podemos encontrar una amplia gama de vegetales en los que diversas partes son comestibles, incluyendo la raíz (colinabo, rábano, nabo), tallos (colirrábano), hojas (repollo, col de Bruselas), flores (coliflor, brócoli), y semillas

(mostaza, colza). Algunas formas con follaje blanco o púrpura o cabezas florales, crecen como ornamento.

Las formas cultivadas de *B. oleracea* se pueden clasificar en siete Grupos de Cultivo (Figura 1.1), de los cuales el grupo de la Acephala tiene las variedades más salvajes en apariencia:

- *Brassica oleracea* Grupo Acephala: col verde y berza.
- *Brassica oleracea* Grupo Alboglabra: kai-lan (brócoli Chino).
- *Brassica oleracea* Grupo Botrytis: coliflor y romanesco.
- *Brassica oleracea* Grupo Capitata: repollo y col de Saboya o de Milán.
- *Brassica oleracea* Grupo Gemmifera: col de Bruselas.
- *Brassica oleracea* Grupo Gongylodes: colirrábano.
- *Brassica oleracea* Grupo Italica: brócoli.

Cabe mencionar también la *Raphanobrassica*, especie híbrida entre el rábano y el repollo.

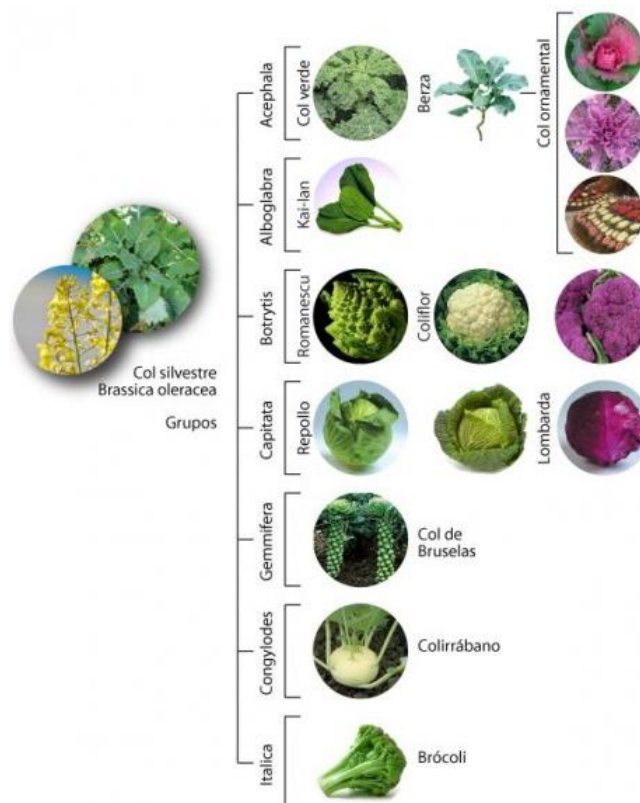


Figura 1.1: Grupos de cultivo y variaciones de *Brassica oleracea*.

Estos cultivos resultan muy interesantes para la región extremeña por rotar con los cultivos de verano, aumentando el nivel de utilización de la tierra, y por emplear una gran cantidad de mano de obra en épocas de poca actividad en las zonas de regadío (Lozano et al., 2007). Además de su interés agronómico, estas hortalizas tienen un gran interés nutricional y funcional por la presencia de vitamina C, fenoles y glucosinolatos, que las hacen recomendables debido a los numerosos efectos beneficiosos para la salud de estos compuestos (Vallejo et al., 2002).

1.1.1.1.- Brócoli

El nombre científico del brócoli es *Brassica oleracea* L. var. *italica* Plenck. Se considera que su origen se localiza en el próximo oriente, habiendo referencias escritas de la época de los griegos, que se refieren a coliflor y brócoli como “Coles de Chipre”, y posteriormente en diversas obras botánicas hispano-árabes como “Col de Siria”. Su cultivo se extiende por Europa a partir del siglo XVI (Maroto, 1989).

Es una planta anual; tiene un color verde azulado, con hojas rizadas y festoneadas, que llegan a presentar hendiduras en su base. El tallo, único, está rematado por la pella principal, una masa de botones florales de los cuales la mayor parte pueden desarrollarse totalmente (Nuez et al., 1999). Esta cabeza es menos compacta que en la coliflor, es de color verde y en las axilas de las hojas pueden aparecer también brotes florales laterales de menor tamaño. Las flores son características de las Brassicáceas, de color amarillo.

Durante su desarrollo, el brócoli pasa por las siguientes fases:

- Juvenil: comienza con la germinación, y se caracteriza porque la planta produce únicamente hojas, y su duración es variable según la longitud del ciclo de cada cultivar y de las condiciones de cultivo.
- Inducción floral: se producen una serie de cambios fisiológicos por acción de bajas temperaturas que promueven la capacidad de formación del cogollo de yemas hipertrofiadas. Cuando finaliza la fase de inducción floral, se termina la formación de nuevas hojas.

- Formación de la pella: En esta fase, las hojas más jóvenes tienden a cubrir la yema terminal o meristemo que comienza a crecer y a formar la pella gracias a la acumulación de las reservas previamente elaboradas por las hojas. Estos procesos pueden verse favorecidos por las bajas temperaturas. Algunas labores culturales tienen también un efecto positivo para la formación del cogollo o pella (Figura 1.2).



Figura 1.2: Formación de la pella de brócoli.

- Floración: Las ramificaciones preflorales inician un crecimiento, lo que hace perder a la pella su compacidad y firmeza, el color verde se pierde y las flores de color amarillo se abren (Figura 1.3).



Figura 1.3: Apertura de las flores de brócoli.

- Polinización y fructificación: Una vez abiertas las flores se produce la polinización, que es cruzada y entomófila, que da lugar a los frutos en silicua, con semillas redondeadas de color pardo.

En lo que respecta a las exigencias de clima, los brócolis se adaptan a gran variedad de condiciones, existiendo una gran diversidad de cultivares con distintas

longitudes del ciclo. En general vegetan bien con temperaturas moderadas, y son necesarias temperaturas frías para la inducción floral y la formación de pellas de calidad, compactas y firmes. Se adaptan mejor que las coles y repollos a suelos ácidos, de pH hasta 5,5.

1.1.1.2.- Coles o repollos

También dentro de este grupo hay cierta diversidad de formas. Su denominación botánica es *Brassica oleracea* L. var. *capitata* L para repollos de hoja lisa (Figura 1.4A) y *Brassica oleracea* L. var. *sabauda* L o *Brassica oleracea* L. convar. *capitata* var. *sabauda* para coles de hoja rizada o coles de Milán o de Saboya (Figura 1.4B) (Nuez et al., 1999). Anteriormente, Nieuwhof (1969) clasificó las coles según el color en coles blancas (generalmente de hoja lisa), coles con un color más verdoso (generalmente de hoja rizada) y coles rojas, moradas o azules (lombarda) (Figura 1.4C).

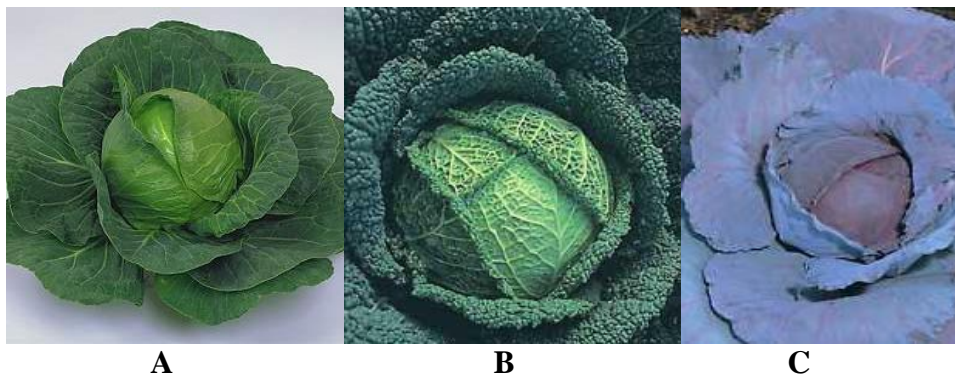


Figura 1.4: Coles o repollos de hoja lisa (A), de hoja rizada (B) y lombarda (C).

Su origen no está definido, encontrándose formas silvestres en las zonas costeras de toda Europa. Las coles fueron domesticadas en la cuenca mediterránea, y eran conocidas por los egipcios y cultivadas por los griegos, considerándose plantas con efectos medicinales (Maroto, 1989).

Son plantas bianuales cultivadas como anuales. Poseen un tallo comprimido, con hojas de color verde que varían en forma, color y textura según los diferentes cultivares. Las hojas están estrechamente apiladas unas sobre otras y forman una pella o cogollo compacto, durante el primer año. En el segundo año, si las plantas se dejan en el campo,

las reservas acumuladas se movilizan para emitir el tallo floral, con flores también amarillas y alógamas.

En cuanto a la fisiología del crecimiento de coles y repollos, se distinguen tres periodos en el ciclo: la fase de crecimiento es la interesante en la producción de esta hortaliza, la fase de inducción floral y la fase de floración, que resultan necesarias para la obtención de semillas y que pueden suponer un problema cuando se producen de manera accidental durante el cultivo de repollos.

Como los brócolis, son plantas que se adaptan a una amplia diversidad de condiciones, aunque se desarrollan mejor en ambientes húmedos y frescos, llegando a resistir los cultivares de invierno temperaturas muy bajas.

1.2.- Importancia económica

A nivel mundial China es el principal productor de hortalizas. Este mercado registró una producción de más de 448 millones de toneladas, lo que se traduce en más del 50% de la producción mundial de 2010. Italia y España, con producciones de 13,6 y 12,7 millones de toneladas respectivamente, son los países europeos con mayor producción hortícola. Éstos ocupan el octavo y noveno puesto en el ranking de principales productores hortícolas en el mundo, según los datos de la Organización de las Naciones Unidas de los Alimentos y la Agricultura del 2010 (FAOSTAT, 2010).

Con respecto a las Brassicas, hay que destacar que sigue siendo China el mayor productor de coles y otras brassicas, con un total de 32,5 millones de toneladas, seguida por otros países orientales, no siendo su producción significativa en Europa (FAOSTAT, 2010). Según esta base de datos, las producciones más elevadas de coliflor y brócoli corresponden a China e India, con 8,6 y 6,6 millones de toneladas, respectivamente, seguida de España con 0,5 millones de toneladas e Italia con 0,4 millones de toneladas.

A nivel nacional, el sector hortofrutícola español ha seguido una evolución creciente a lo largo de los últimos años, contribuyendo de forma positiva al conjunto del sector agrario, ya que es el principal sector de la rama agraria de España.

La superficie dedicada al cultivo de hortalizas ha ido disminuyendo a lo largo de los últimos diez años provocando una disminución de la producción. Sin embargo, se ha observado una revalorización de este sector (MAGRAMA, 2011) (Tabla 1.1).

Tabla 1.1: Superficie, Producción y Valor de Hortalizas en España en 2010.

Años	Superficie (miles de hectáreas)	Producción (miles de toneladas)	Valor (miles de euros)
2000	409	12.802	5.290.937
2001	400	12.886	5.115.069
2002	403	13.206	5.851.457
2003	397	13.194	6.415.585
2004	405	13.751	5.925.064
2005	407	13.896	6.794.138
2006	395	13.512	5.796.221
2007	380	13.501	6.287.555
2008	361	13.006	6.263.458
2009	379	14.031	6.061.507
2010	341	12.649	6.668.107

Fuente: Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. Anuario de Estadística 2011. (MAGRAMA, 2011).

Dentro de las hortalizas, la col de Milán y el brócoli han sufrido las mismas tendencias que el resto de hortalizas a lo largo de los últimos años en España. Según los datos recogidos por el Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (MAGRAMA, 2011) las producciones de col de Milán y de brócoli en el año 2010 en España fueron 80.900 toneladas y 356.387 toneladas, respectivamente. Siendo la col de Milán la segunda en importancia, tanto en producción como en superficie cultivada, dentro de las coles (Tabla 1.2) y el brócoli el principal dentro de las hortalizas de flor.

Tabla 1.2: Superficie y Producción de variedades de Col en España en 2010.

Años	Col-repollo de hojas lisas		Col-repollo de Milán		Col de Bruselas		Otras coles	
	S	P	S	P	S	P	S	P
2000	4,5	138,0	2,3	82,1	0,2	5,6	3,1	83,0
2001	3,4	98,0	1,9	57,6	0,2	4,6	4,4	128,5
2002	3,7	104,8	1,9	56,4	0,1	4,0	2,4	88,0
2003	3,0	92,7	1,8	50,9	0,1	3,0	2,9	122,1
2004	3,9	110,7	1,5	46,0	0,1	2,6	2,4	83,2
2005	4,6	149,1	1,5	44,7	0,1	2,2	2,5	86,1
2006	4,3	154,0	1,1	33,2	0,1	6,7	2,7	66,2
2007	4,3	143,5	1,4	40,0	0,1	1,6	2,1	54,8
2008	4	141,9	1,2	34,2	0,7	14,1	3,2	61,8
2009	3	105,8	1,7	70,7	0,1	2,0	3,2	55,4
2010	3	112,7	2,0	80,9	0,1	2,0	2,4	42,0

Fuente: Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. Anuario de Estadística 2011. (MAGRAMA, 2011). S: superficie (miles de hectáreas). P: producción (miles de toneladas).

Galicia es la región donde más se produce col de Milán, con 45.666 toneladas, lo que supone alrededor de un 56% de la producción nacional de esta hortaliza, y Murcia es la región más productora de brócoli, con 164.928 toneladas, alrededor de un 46% del total de la producción nacional de esta hortaliza en 2010 (MAGRAMA, 2011).

España, con un 35%, lidera las exportaciones mundiales de brócoli, siendo el principal proveedor de esta hortaliza en el mundo. La mayoría, entre un 70 y 75%, proviene de la huerta murciana, según aseguran desde la Asociación de Productores y Exportadores de Frutas y Hortalizas de la Región de Murcia (Proexport) (noticia de la Revista Digital Distribución hortofrutícola, 2012).

En Extremadura el cultivo de brócoli y col de Milán se localiza fundamentalmente en la provincia de Badajoz, con una producción de 6.479 toneladas de brócoli y 2.168 toneladas para la col de Milán, lo que supuso, aproximadamente un 2% y un 3%, respectivamente, de la producción nacional de estas brassicas en 2010 (MAGRAMA, 2011).

Sin embargo, aunque es poca su producción, el cultivo del brócoli ha ido incrementándose en los últimos años en Extremadura, fundamentalmente en Las Vegas del Guadiana, donde se venía situando hasta el año 2002 en torno a las 400 ha, habiéndose visto aumentada esta superficie hasta alcanzar las 800 ha en 2004, siendo el destino de la producción, principalmente, las industrias de congelación y deshidratación de la zona, aunque también existen centrales hortofrutícolas que empiezan a comercializar en fresco para rentabilizar las instalaciones de frío fuera de la temporada de la fruta (García et al., 2006; Lozano et al., 2007). En la actualidad y debido a los problemas del sector tabaquero se está iniciando el cultivo de brócoli en el norte de Cáceres (Lozano et al., 2007).

Respecto al consumo en los hogares, según datos del Plan de consumo alimentario del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, durante el año 2009 (MAGRAMA, 2010-2011) se consumieron 58,84 kg/persona de hortalizas frescas y 95,69 kg/persona de frutas frescas, lo que representa una media de 156,41 gramos de hortalizas por persona y día, y 258,36 gramos/persona y día de frutas frescas.

Según la Federación Española de Productores y Exportadores de Frutas y Hortalizas (FEPEX) el consumo de brassicas en España ha aumentado, siendo el brócoli la hortaliza cuyo consumo está experimentando el mayor crecimiento en los últimos años.

Con todo ello, se puede afirmar que este aumento es debido a que los consumidores demandan, cada vez más, alimentos sanos y nutritivos que les aporten beneficios para la salud. Puede decirse que las brassicas en general y, particularmente el brócoli, son hortalizas que en los últimos años han ganado popularidad, gracias a sus buenas características organolépticas, a su fácil limpieza y preparación, a que están incluidas en numerosos preparados de verdura fresca y congelada y a los numerosos efectos beneficiosos que para la salud se les atribuyen.

1.3.- Parámetros de calidad

En lo que a calidad se refiere, se han establecido sistemas de gestión de la calidad. Actualmente ha cobrado importancia la “Trazabilidad” que es la capacidad de reconstruir la historia de un producto a partir de un sistema documentado de registros. Este sistema ofrece la ventaja de conocer el origen del producto y darles a los consumidores una mayor seguridad, ya que es un sistema de Identificación y Control de todo el proceso recorrido por la hortaliza desde su prospección en el campo hasta su destino en venta (Giambanco de Ena, 1999).

La calidad de los productos hortícolas es un concepto complejo que se refiere a un conjunto de propiedades, que abarcan un espectro muy diferente en función de quien lo contemple. Para el productor, la calidad va unida a productividad; para el almacenista y transportista viene condicionada por su estabilidad macroscópica, aspecto, presentación y resistencia a manipulaciones. Para el industrial, la calidad depende de la aptitud tecnológica del producto y de la buena aceptabilidad por parte de los consumidores. Para los responsables comerciales depende, en un primer momento, del aspecto externo, esto es, de los caracteres organolépticos. Para los servicios de inspección, está en relación con su composición química, bioquímica y sus características microbiológicas. Por último, para el consumidor, el concepto de calidad está relacionado con el sabor o aspecto y por tanto, es algo claramente subjetivo, ya que

no dispone de medios que le permitan evaluar la calidad nutritiva, funcional e higiénica, así como el valor comercial de los alimentos (Adrián y Fragüe, 1990; Torija, 2002).

1.3.1.- Parámetros de calidad físico-química

Los parámetros de calidad físico-química están muy relacionados con los índices de cosecha o de madurez y con los índices de calidad, así como con la apariencia externa. Estos índices son propuestos por los productores y vendedores, y pueden considerarse como parámetros agronómicos de la calidad.

Para el brócoli los índices de cosecha o madurez están basados en el tamaño y apariencia de la pella (inflorescencia principal), que debe presentar un diámetro y grado de compactación adecuado, con todos los floretes cerrados. Según los índices de calidad, el brócoli debe tener los floretes cerrados y de color oscuro-brillante, la pella o cabeza debe ser regular y compacta (firme a la presión de la mano), y el tallo bien cortado y de la longitud requerida. Además, no debe tener ningún florete amarillo ni tonalidades pardas en las partes del tallo (Cantwell y Suslow, 1999), con ausencia de tronco o tallo hueco y también hay que tener en cuenta la finura del grano en la pella.

Para la col el índice de madurez se basa en la presión que ha de ser ejercida para compactar la cabeza o pella de la col con la mano. Una cabeza muy floja o suelta significa que la col está inmadura, y una cabeza muy firme o dura significa que la col está madura. Y según los índices de calidad, después de quitar las hojas externas, la cabeza o pella debería ser del color típico del cultivar (verde, rojo-morado-azul o de color verde-amarillo pálido), firme, de un peso adecuado para su tamaño y sin insectos, pudriciones, desarrollo de las semillas y otros defectos. Las hojas deben ser crujientes y turgentes (Cantwell y Suslow, 2005).

Para conocer los índices de madurez y de calidad de los brócolis y de las coles de Milán utilizados en este trabajo experimental, se han evaluado los valores obtenidos de parámetros físico-químicos como peso, pérdida de peso, color, textura, pH, contenido en sólidos solubles y humedad, durante el almacenamiento. Relacionándose estos parámetros con la apariencia externa de dichas brassicas estudiadas.

1.3.2.- Parámetros de calidad funcional

Un gran número de estudios epidemiológicos han demostrado que un consumo regular de vegetales de la familia de las Brassicas ayuda a la disminución del riesgo de padecer diferentes tipos de cáncer (Cohen et al., 2000; Vallejo et al., 2002). Este efecto beneficioso puede ser atribuido a los compuestos bioactivos o funcionales que poseen estos vegetales. Los principales compuestos bioactivos que poseen son vitamina C, carotenoides, clorofilas, compuestos fenólicos y glucosinolatos, cuya actividad es sinérgica y actúan reduciendo el nivel de las especies reactivas de oxígeno (Podsdek, 2007). Son por tanto, compuestos con actividad antioxidante.

Así, según la definición de alimento funcional “*son aquellos alimentos que en forma natural o procesada, contienen componentes biológicamente activos que ejercen efectos beneficiosos para la salud que van más allá de la nutrición*” (Vidal, 2008), las brassicas son alimentos funcionales y por tanto, el estudio del contenido en dichos compuestos, así como su actividad biológica, será fundamental para evaluar la calidad funcional de estos vegetales. Los compuestos funcionales o biocompuestos, evaluados generalmente en brassicas, son la vitamina C y los compuestos fitoquímicos o fitocompuestos.

Destacar que la variación en el contenido de compuestos funcionales, así como de la capacidad antioxidante de las brassicas, es causada por muchos factores entre los que cabe resaltar: cultivar, condiciones de cultivo, estado de maduración y cosecha, así como las condiciones postcosecha (Jeffery et al., 2003; Vallejo et al., 2002).

1.3.2.1.- Vitamina C

Forma parte de las propiedades nutricionales de un alimento, pero cada vez más se está incluyendo dentro de las funcionales, por tener un efecto pronunciado sobre la mejora de la salud y la disminución del riesgo de sufrir ciertas enfermedades.

Más del 85% de la vitamina C en las dietas humanas es suministrada por frutas y verduras (Davey et al., 2000; Lee y Kader, 2000). La vitamina C, la cual incluye el ácido ascórbico (Figura 1.5A) y su producto de oxidación, el ácido dehidroascórbico (Figura 1.5B), tiene muchas actividades biológicas en el cuerpo humano. Block et al.

(2004) han encontrado que la vitamina C puede reducir los niveles de proteína C-reactiva, un marcador de inflamación y, posiblemente, un predictor para enfermedades del corazón.

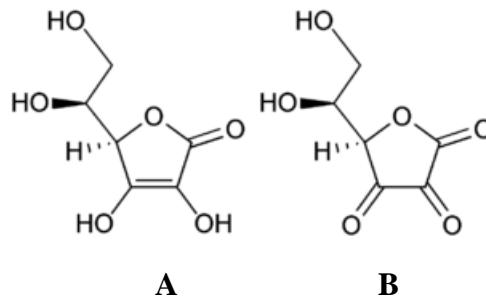


Figura 1.5: Estructura química del ácido L-ascórbico (A) (forma reducida de la vitamina C) y del ácido dehidroascórbico (B) (forma oxidada de la vitamina C).

La vitamina C tiene un papel fundamental dentro de los vegetales ya que interviene en los sistemas de oxidación de la célula vegetal y establece potenciales favorables de oxidación-reducción. Pero una vez consumida formando parte de algún alimento, es el ácido L-ascórbico el que tiene mayor función biológica, pudiéndose definir como un cofactor enzimático, como un captador de radicales y como un donador/aceptor en el transporte de electrones en la membrana plasmática (Davey et al., 2000), por tanto el ácido ascórbico tiene mayor capacidad antioxidante que el ácido dehidroascórbico.

1.3.2.2.- Fitocompuestos o fitoquímicos

Son, según Bello (2000) “*estructuras químicas de origen vegetal, que ingeridas con la alimentación, son activas desde el punto de vista fisiológico y medicinal, excluyendo su posible papel como nutrientes*”.

Entre estas sustancias se encuentran diversas familias químicas que poseen estructuras y propiedades muy variadas. Destacan los carotenoides, las clorofilas, los compuestos fenólicos y los glucosinolatos. Todos ellos, excepto las clorofilas, son metabolitos secundarios de las plantas, es decir, son compuestos químicos sintetizados por las plantas que cumplen funciones no esenciales en ellas. A diferencia de lo que sucede con los metabolitos primarios, la ausencia de algún metabolito secundario no

impide la supervivencia de la planta, aunque a veces, puede verse gravemente afectada, ya que sí que intervienen en las interacciones ecológicas entre la planta y su ambiente (Ávalos y Pérez-Urria, 2009).

1.3.2.2.1.- Carotenoides

Desde el punto de vista químico, los carotenoides pertenecen a la familia de los terpenos, más concretamente son tetraterpenoides. Se dividen en dos tipos básicos: los carotenos que son hidrocarburos y las xantofilas que son sus derivados oxigenados. Son de color amarillo, naranja y rojo, y se encuentran presentes en muchas frutas y verduras como pigmentos.

Los carotenoides que participan en la fotosíntesis se designan como carotenoides primarios o pigmentos accesorios (localizados en los cloroplastos como la clorofila), son diferentes de los secundarios que aparecen en flores y frutos como componentes de los cromoplastos y en organismos heterótrofos como bacterias, levaduras y hongos. La principal función de los pigmentos carotenoides, tanto en vegetales como en bacterias, es captar energía luminosa, energía que es luego transferida a las clorofilas para ser transformada durante la fotosíntesis. Además, también intervienen especialmente en la protección contra la foto-oxidación, ya que en su estructura química poseen dobles enlaces conjugados (Figura 1.6), los cuales hacen que sean captadores de radicales, aportándoles efectos antioxidantes, como son la protección cardiovascular y antitumoral (Podsdek, 2007) una vez que son consumidos. Por esto, los carotenoides juegan un papel importante en la salud humana actuando como antioxidantes biológicos, protegiendo a las células y tejidos del daño provocado por los radicales libres.

El β -caroteno y la luteína (Figura 1.6A y 1.6B, respectivamente) son los principales carotenoides en el género *Brassica*, como todos los carotenoides forman parte de la fracción lipídica de los sistemas biológicos, protegiendo a las membranas de los radicales libres. Tienen un efecto muy importante sobre la vista, puesto que el β -caroteno es precursor de la vitamina A y, la luteína se encuentra específicamente en la mácula y la lente del ojo, reduciendo el riesgo de enfermedades oculares graves, tales como la degeneración macular relacionada con la edad y las cataratas (Bone et al., 1997; Singh et al., 2006).

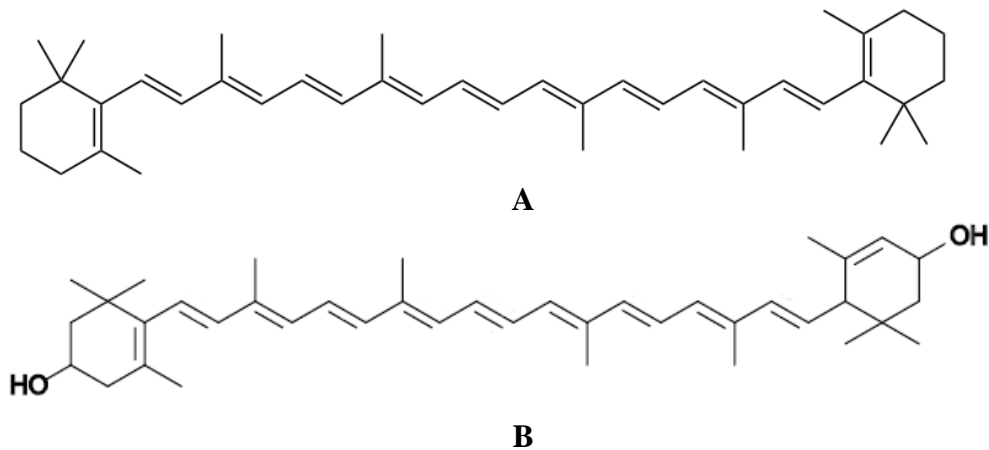


Figura 1.6: Estructura química del β -caroteno (caroteno) (A) y de la luteína (xantofila) (B).

1.3.2.2.2.- Clorofilas

Las clorofilas son un grupo de pigmentos que están distribuidos en la naturaleza. Se encuentran en diversos eucariotas que poseen cloroplastos (plantas, algas) y en algunos procariotas como bacterias (cianobacterias, bacterias verdes y púrpuras), las cuales no poseen cloroplastos, y por lo tanto, sus pigmentos se encuentran en sistemas de membrana internos. La clorofila es una biomolécula extremadamente importante, crítica en la fotosíntesis, proceso que permite a las plantas absorber energía a partir de la luz.

La estructura de la molécula de clorofila tiene dos partes: un anillo de porfirina (con un ion magnesio en el centro) y una cadena larga llamada fitol. Es un tetrapirrol, con cuatro anillos pentagonales de pirrol enlazados para formar un anillo mayor que es la porfirina. Los compuestos clorofílicos mayoritarios en las plantas son la clorofila A y la clorofila B (Figura 1.7). Ambas clorofilas son componentes genuinos de las membranas fotosintéticas, y están normalmente en un ratio de 3:1 (Chen y Chen, 1993) si bien las condiciones de crecimiento y los factores medioambientales, entre otros, modifican este ratio clorofila A/clorofila B (Lichtenthaler et al., 1982).

Además, la descomposición de las clorofilas está fuertemente ligada a la senescencia de los vegetales verdes después de la recolección, así como a la marchitez de las hojas (Deschene et al., 1991; Zhuang et al., 1995). Pero además, Lai et al. (1980)

demonstraron que existía una relación entre la actividad antimutagénica y antioxidante y el contenido en clorofilas en muchos extractos vegetales.

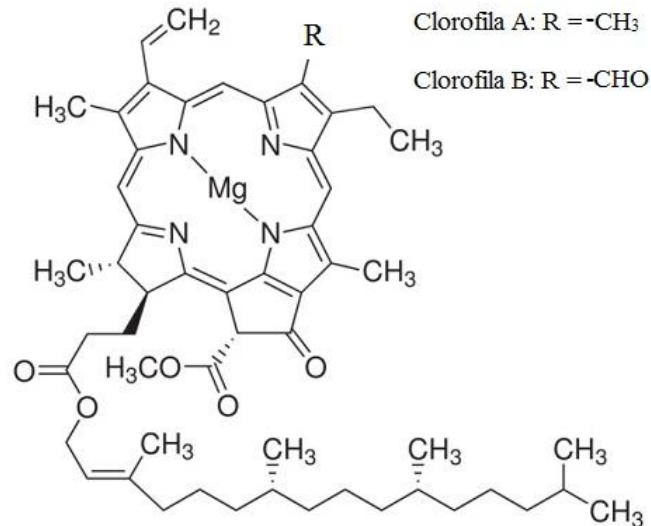


Figura 1.7: Estructura química de la clorofila A y de la clorofila B.

1.3.2.2.3.- *Compuestos fenólicos*

Los fenoles o compuestos fenólicos son compuestos orgánicos cuyas estructuras moleculares contienen al menos un grupo fenol, un anillo aromático unido al menos a un grupo funcional. El término “compuestos fenólicos” engloba a todas aquellas sustancias que poseen varias funciones fenol, nombre popular del hidroxibenceno, unidas a estructuras aromáticas o alifáticas. Únicamente, algunos compuestos fenólicos de la familia de los ácidos fenólicos no son polifenoles, sino monofenoles (Gimeno, 2004).

Los compuestos fenólicos son unos de los principales metabolitos secundarios de las plantas, por tanto, son productos biosintetizados en las plantas, en las que desarrollan diversas funciones, como la protección frente a condiciones externas. Se encuentran en casi todos los alimentos de origen vegetal aportando color, sabor amargo, astringencia y/o aroma, siendo su distribución muy diversa dentro de las plantas (hojas, flores, frutos, semillas, tallos, raíces). Los compuestos fenólicos, especialmente los flavonoides, poseen diferente actividad biológica, pero las más importantes son la actividad antioxidante y el efecto inhibitorio de varias clases de tumores (Czeczot, 2000).

Los compuestos fenólicos se pueden clasificar de muchas maneras debido a su diversidad estructural. Según su estructura química tenemos dos grandes grupos (Gimeno, 2004):

- No flavonoides, entre ellos hay tres subgrupos:
 - Fenoles no carboxílicos.
 - Ácidos fenólicos: derivados del ácido benzoico y derivados del ácido cinámico.
 - Estilbenos.
- Flavonoides, formados por dos grupos bencénicos unidos por un puente tricarbonado, hay siete subgrupos:
 - Antocianos o antocianinas.
 - Flavanoles (flavan-3-oles).
 - Flavanonas.
 - Flavonoles.
 - Flavonas.
 - Isoflavonoides.
 - Chalconas.

Pero hay que tener en cuenta, que la mayoría de los compuestos fenólicos se presentan en las células vivas de forma combinada, generalmente como *O*-glicósidos. Se denomina entonces aglicona a la porción diferente del azúcar que se obtiene por hidrólisis de los glicósidos (Gimeno, 2004). En nuestro caso, después de la hidrólisis ácida de las muestras de brassica, se consiguieron identificar los siguientes compuestos fenólicos: tres ácidos fenólicos (ácidos gálico, clorogénico y sinápico, Figura 1.8A, B y C, respectivamente) y dos flavonoles (quercetina y kaempferol, Figura 1.9).

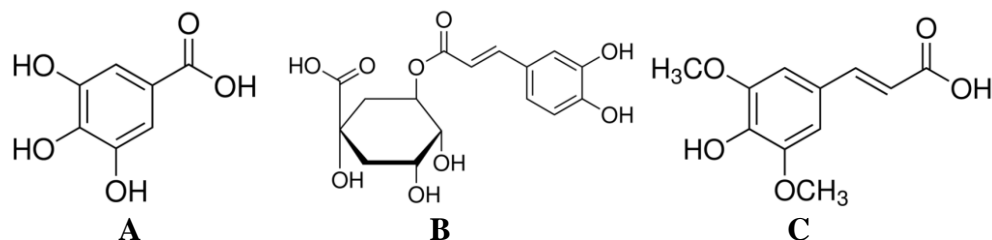


Figura 1.8: Estructuras químicas de los ácidos fenólicos: gálico (A) (derivado hidroxibenzoico), clorogénico (B) y sinápico (C) (derivados hidroxicinámicos).

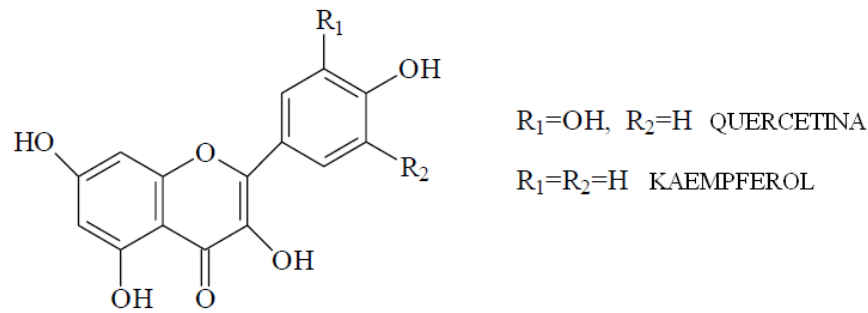


Figura 1.9: Estructura química de los flavonoles: quercetina y kaempferol.

1.3.2.2.4.- Glucosinolatos

Los glucosinolatos son compuestos azufrados también llamados tioglucósidos. Son metabolitos secundarios, de bajo peso molecular, presentes en once familias de dicotiledóneas. Pero es, principalmente, el género *Brassica* el que presenta una tercera parte de los 100 tipos de glucosinolatos conocidos. Estos compuestos se encuentran tanto en los tejidos vegetativos como en los tejidos reproductivos de la planta, y constituyen un mecanismo de defensa de la misma ante plagas y enfermedades (Mithen, 1992).

La molécula de los glucosinolatos está constituida por un grupo β -D-tioglucósido unido a una oxima sulfatada con una cadena lateral (R) derivada de un aminoácido (metionina, valina, alanina, leucina, isoleucina, fenilalanina, tirosina o triptófano) (Mikkelsen et al., 2002) (Figura 1.10).

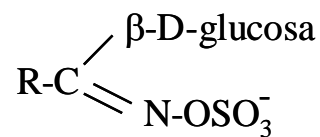
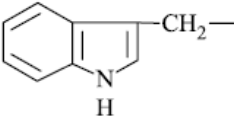
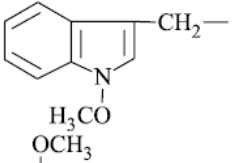
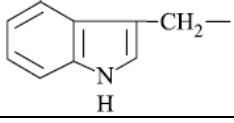
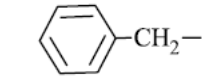
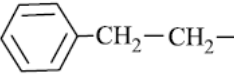


Figura 1.10: Estructura química general de los glucosinolatos.

Dependiendo de la cadena lateral (R), los glucosinolatos se dividen en tres grandes grupos: alifáticos, derivados de la metionina, alanina, valina, leucina o isoleucina; indólicos, derivados del triptófano; y aromáticos; derivados de la fenilalanina o tirosina (Wittstock y Halkier, 2002).

En la Tabla 1.3 se muestran los glucosinolatos alifáticos, indólicos y aromáticos identificados en esta Tesis Doctoral para las muestras de brassica estudiadas, así como la estructura de la cadena lateral R para cada uno de ellos, su nombre científico y su nombre común.

Tabla 1.3: Estructura de la cadena lateral R, nombre químico y nombre común de los glucosinolatos identificados.

Estructura de R	Nombre químico	Nombre común
1. Alifáticos		
<i>1.1. Alquílicos</i>		
$\text{CH}_3\text{-SO-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$	3-metilsulfinilpropil glucosinolato	Glucouiberina
$\text{CH}_3\text{-SO-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$	4-metilsulfinilbutil glucosinolato	Glucorafanina
$\text{CH}_3\text{-SO-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$	5-metilsulfinilpentil glucosinolato	Glucualisina
$\text{CH}_3\text{-S-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$	4-metiltiobutil glucosinolato	Glucocerucina
<i>1.2. Alquenílicos</i>		
$\text{CH}_2\text{=CH-CH}_2\text{-}$	2-propenil o alil glucosinolato	Sinigrina
$\text{CH}_2\text{=CH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$	3-butenil glucosinolato	Gluconapina
$\text{CH}_2\text{=CH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$	4-pentenil glucosinolato	Glucobrasicanapina
<i>1.3. Hydroxialquenílicos</i>		
$\text{CH}_2\text{=CH-CHOH-CH}_2\text{-}$	2-hidroxi-3-butenil glucosinolato	Progoitrina
2. Indólicos		
	3-indolilmetil glucosinolato	Glucobrasicina
	1-metoxi-3-indolilmetil glucosinolato	Neoglucobrasicina
	4-metoxi-3-indolilmetil glucosinolato	4-Metoxiglucobrasicina
3. Aromáticos		
	Bencil glucosinolato	Glucotropaeolina
	2-feniletíl glucosinolato	Gluconasturtina

La identificación y cuantificación de los glucosinolatos puede realizarse sin llevar a cabo la desulfatación o eliminación del grupo sulfato, y en este caso, se denominan glucosinolatos intactos, de esta forma es como se han determinado en esta Tesis Doctoral. Sin embargo, en otros trabajos experimentales, como en los de Jia et al. (2009) y Kiddle et al. (2001), se determinan como glucosinolatos desulfatados o desulfoglucosinolatos, después de realizar una ruptura química o enzimática del grupo sulfato (mediante la utilización de la enzima arilsulfatasa) para facilitar la separación cromatográfica y la detección por espectrometría de masas.

La hidrólisis de los glucosinolatos está catalizada por la enzima mirosinasa, que es una β -tioglucosidasa llamada tioglucósido glucohidrolasa (Figura 1.11). Los glucosinolatos y la enzima mirosinasa se encuentran localizados en célula, pero en compartimentos independientes. Cuando se produce un proceso de estrés en la planta, se origina la ruptura de la célula, y la molécula de glucosinolatos y la enzima entran en contacto, produciéndose la hidrólisis. Esto también ocurre en la masticación y en la digestión, debido a la mirosinasa presente en la microflora del tracto digestivo de los humanos (Bones y Rossiter, 1996; Fahey et al., 2001).

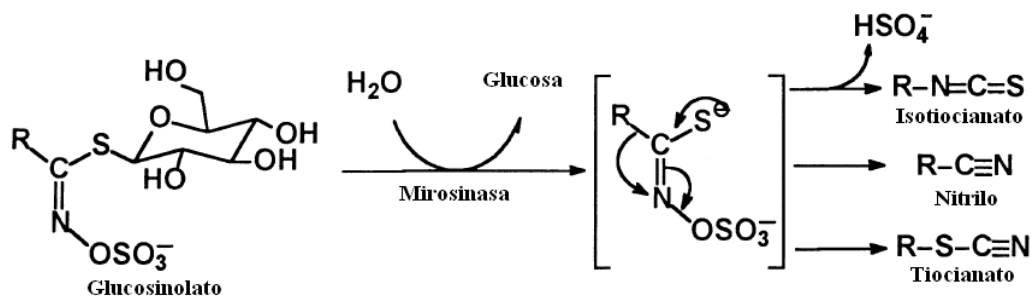


Figura 1.11: Hidrólisis de los glucosinolatos catalizada por la enzima mirosinasa.

Uno de los productos de la hidrólisis o degradación de los glucosinolatos son los isotiocianatos, que son los compuestos volátiles responsables del olor y del sabor amargo atribuido a las brassicas, así como de la acción biológica de los glucosinolatos (Fahey et al., 2001). Además, según estudios científicos, se ha detectado que dietas ricas en vegetales del género *Brassica* reducen la incidencia de ciertos cánceres, especialmente de pulmón y del tracto digestivo (Wollowski et al., 2001).

1.4.- Tecnologías postcosecha

1.4.1.- Concepto, objetivos y ámbito de la postcosecha

La postcosecha es la fase de la vida de los vegetales que sigue a la cosecha, en la cual, la hortaliza o la fruta se separa de la fuente de nutrientes y tiene que continuar con sus procesos metabólicos consumiendo sus propios nutrientes. Así, en los estudios postcosecha se abordan los principios básicos que regulan el metabolismo del producto cosechado, así como el conocimiento de las tecnologías de manejo necesarias para la adecuada conservación de dicho producto natural o en fresco, en función de sus características en el momento de la cosecha y de su destino comercial (Kader, 1992).

Por tanto, los objetivos de la aplicación de técnicas postcosecha son:

- Evitar la reducción de la calidad del producto cosechado.
- Posibilitar el comercio de productos altamente perecederos, como frutas, hortalizas y flores fuera de temporada y en mercados distantes.
- Conservación de estos productos durante periodos prolongados para la regulación del mercado.

La postcosecha es parte integral de la cadena alimentaria y se ubica desde que el producto es cosechado hasta que llega al consumidor para su consumo en fresco o hasta que el producto es utilizado como materia prima para su posterior procesamiento. En ese sentido es una área intermedia entre la producción agrícola y el procesamiento de alimentos, pero que requiere un enfoque integral y multidisciplinario debido a la complejidad de la logística involucrada que incluye preparación, mantenimiento, transporte y distribución de productos perecederos muchas veces a grandes distancias de los lugares de producción (Kader, 1992).

Las frutas y hortalizas son tejidos vivos, por lo que hay que poner especial énfasis en los factores que influyen la fisiología de los mismos. Los principales factores a considerar son: producto, condiciones ambientales de la postcosecha, plagas, enfermedades y el destino. El conocimiento de estos principios básicos, que rigen la

interacción entre el producto y el ambiente, constituye la base para el desarrollo de la tecnología de manejo correspondiente (Kader, 1992).

1.4.2.- Biología y tecnología postcosecha

Entre la cosecha y el consumo, los productos vegetales sufren pérdidas que afectan a la cantidad y a la calidad. La magnitud de las pérdidas postcosecha de estos productos están estimadas entre un 5 y un 25% en países desarrollados y, entre un 20 y un 50% en países en vías de desarrollo, dependiendo del tipo de producto (Paliyath et al., 2008). Para reducir estas pérdidas, productores y comerciantes deben de:

1. Entender los factores biológicos y ambientales que están involucrados en el deterioro.
2. Conocer y usar tecnologías postcosecha para retardar la senescencia y mantener el producto en su mejor calidad posible.

Frutas y verduras frescas, así como plantas ornamentales, son tejidos vivos, como ya se ha mencionado anteriormente, y por tanto, están sujetos a cambios continuos después de la cosecha. Mientras que algunos de estos cambios son deseables, la mayoría de ellos, desde el punto de vista del consumidor, no lo son. Los cambios postcosecha en productos frescos no pueden ser detenidos, pero pueden ser desacelerados o retardados dentro de ciertos límites. La senescencia es la etapa final del desarrollo de los órganos vegetales, durante la cual una serie de cambios irreversibles conducen a la desintegración y muerte de las células, este proceso de senescencia es el que hay que retardar con la aplicación de tecnologías postcosecha.

Los productos hortofrutícolas frescos varían en su estructura morfológica (raíces, tallos, hojas, flores, frutos, etc), en su composición y en su fisiología general. Por lo tanto, los requerimientos y recomendaciones generales para maximizar la vida postcosecha varían entre los productos. Sin embargo de forma general, todos los productos hortofrutícolas frescos tienen un alto contenido en agua, y por lo cual todos ellos están sujetos a la deshidratación (marchitamiento, arrugamiento) y a daños mecánicos. Estos productos son de igual manera susceptibles a los ataques de bacterias y hongos, dando como resultado un deterioro patológico (Kader, 1992).

1.4.2.1.- Factores biológicos involucrados en el deterioro vegetal

Entre los factores biológicos involucrados en el deterioro de los vegetales destacan:

- Respiración.
- Producción y sensibilidad al etileno.
- Cambios en la composición.
- Transpiración.
- Deterioros fisiológicos.
- Daños físicos.
- Deterioros patológicos.

A continuación se estudian más detalladamente.

1.4.2.1.1.- Respiración

La respiración es el proceso mediante el cual las reservas orgánicas (carbohidratos, proteínas, grasas) son degradadas a productos finales simples, con una liberación de energía, usando para ello oxígeno y produciendo dióxido de carbono en este proceso. La pérdida de las reservas de material orgánico en el producto durante la respiración significa una aceleración de la senescencia, ya que las reservas que mantienen vivo al producto se agotan. Además producen reducción en el valor nutritivo, pérdida de aromas y de sabor, especialmente de dulzor y pérdida de peso. La energía liberada en este proceso, conocida como calor vital, afecta a las consideraciones en el uso de tecnología postcosecha, así como a los requerimientos de enfriamiento y ventilación (Cappellini y Ceponis, 1984).

La tasa de deterioro (perecebilidad) de los productos cosechados es generalmente proporcional a la tasa respiratoria, clasificándose los productos hortofrutícolas de acuerdo a su velocidad de respiración. El brócoli presenta una tasa de respiración muy alta, de 16 a 18 mL CO₂/kg x h, para pellas a 5 °C, siendo superior este valor para floretes (Cantwell y Suslow, 1999), mientras que las coles en general, presentan una tasa respiratoria moderada, de 4 a 6 mL CO₂/kg x h, para pellas o cogollos enteros a 5 °C, siendo superior este valor para la col cortada (Cantwell y

Suslow, 2005). Teniendo en cuenta esto, se puede decir que el brócoli es mucho más perecedero que la col, y por tanto, será el brócoli el que requiera prioritariamente aplicaciones de tecnologías postcosecha para su conservación.

1.4.2.1.2.- Producción y sensibilidad al etileno

Este gas es el compuesto orgánico más simple que afecta a los procesos fisiológicos de la planta. Es un producto natural del metabolismo vegetal, que se produce en todos los tejidos en plantas superiores y en algunos microorganismos. Es una fitohormona que regula muchos aspectos del crecimiento, desarrollo y senescencia, siendo fisiológicamente activo a concentraciones muy bajas (menos de 0,1 ppm). Por lo tanto, el etileno juega un papel muy importante en la abscisión de órganos vegetales (Lipton, 1987).

Los productos hortofrutícolas también son clasificados de acuerdo a la tasa de producción de etileno, siendo el brócoli y la col productos con muy baja producción de etileno, $<0,1 \mu\text{L/kg} \times \text{h}$ a 20°C (Cantwell y Suslow, 1999; Cantwell y Suslow, 2005).

No existe una relación consistente entre la capacidad de producción de etileno de un producto dado y su grado de perecebilidad. Sin embargo, la exposición de la mayoría de los productos al etileno acelera su senescencia (Kader, 1992).

Generalmente la tasa de producción de etileno aumenta a medida que el producto se acerca a su madurez, por daños físicos, incidencia de enfermedades, aumento en la temperatura hasta los 30°C y estrés hídrico. Por otro lado, las tasas de producción de etileno, así como la tasa respiratoria, se reducen al almacenar los productos a baja temperatura, al reducir los niveles de oxígeno y al aumentar los niveles de dióxido de carbono (Lipton, 1987).

1.4.2.1.3.- Cambios en la composición

Existen numerosos cambios en el contenido de los pigmentos durante el desarrollo y la maduración del producto hortofrutícola en la planta. Algunos de éstos continúan después de la cosecha y pueden ser deseables o indeseables.

- La pérdida de las clorofilas (color verde), es deseable en frutas, pero no en vegetales. La oxidación-degradación de las clorofilas dan productos como feofitina, feofóbido y clorofilina que son de colores más pardos.
- La evolución de los carotenoides, algunos son precursores de la vitamina A y por tanto, su pérdida afectaría al valor nutricional y funcional del producto. El desarrollo de carotenos es deseable por ejemplo en el tomate.
- El desarrollo y evolución de los compuestos fenólicos incide sobre la calidad de los productos y está en parte regulado por la actividad de la enzima fenil amino liasa (PAL), que interviene en la formación de compuestos fenólicos, y por la actividad de la enzima polifenol oxidasa (PPO), que interviene en la degradación de polifenoles a quinonas, las cuales proporcionan una coloración oscura o parduzca en la zona dañada (por oxidación, corte, etc) del producto hortofrutícola (Dixon, 2001). Resaltar, que la degradación de los compuestos fenólicos, a parte de por oxidación enzimática, en la que interviene la enzima PPO, puede producirse por oxidación no enzimática, ya sea la reacción de oxidación de naturaleza química o microbiológica.

También el proceso de maduración origina cambios en el contenido de carbohidratos, como la desintegración de pectinas y otros polisacáridos, dando como resultado el ablandamiento de los productos y, consecuentemente, aumentando la susceptibilidad a daños mecánicos.

Los ácidos orgánicos, las proteínas, los aminoácidos y los lípidos modifican su composición y pueden influir en la calidad organoléptica (sabor-olor) del producto. La producción de sustancias volátiles aromáticas está fuertemente asociada a la maduración del producto, pero a veces también al deterioro de éste cuando se generan sustancias volátiles no desadas.

La pérdida de vitamina C (especialmente de ácido ascórbico) va en detrimento de la calidad nutricional y funcional del producto.

1.4.2.1.4.- Transpiración

La pérdida de agua es una de las causas principales de deterioro, porque esto no produce únicamente pérdidas cuantitativas directas (como es la pérdida de peso vendible), sino que también supone pérdidas en la apariencia (marchitamiento y deshidratación), en la calidad de la textura (ablandamiento, flacidez, pérdida de una textura crujiente y jugosidad), así como en su valor nutricional (Cappellini y Ceponis, 1984).

La tasa de transpiración está influenciada por muchos factores internos, tales como las características morfológicas y anatómicas, la relación entre la superficie y el volumen, los daños en la superficie y el estado de madurez. Además también está influenciada por factores externos o ambientales como la temperatura, la humedad relativa, el movimiento del aire y la presión atmosférica. La transpiración es un proceso físico que consiste en la evaporación del agua de los tejidos vegetales. Puede ser controlado por la aplicación de ceras y otras cubiertas superficiales o envolturas de plástico al producto, o por el control del medio ambiente en el almacenamiento, como por ejemplo, mantener una humedad relativa alta y controlar la circulación del aire (Kader, 1992).

1.4.2.1.5.- Deterioros fisiológicos

La exposición del producto a temperaturas extremas y condiciones ambientales o de almacenamiento indeseables pueden dar como resultado desórdenes fisiológicos, tales como:

- Daños por congelación

Ocurren cuando los productos son almacenados a temperaturas inferiores a su punto de congelación. La destrucción causada por la congelación, generalmente, da como resultado un colapso inmediato de los tejidos y la pérdida total del producto. En el brócoli y las coles, las áreas dañadas por congelación y después descongeladas resultan de color verde oscuro y apariencia translúcida o acuosa, pudiendo tornarse pardas y volverse susceptibles a la pudrición bacteriana (Cantwell y Suslow, 1999; Cantwell y Suslow, 2005).

- Daños por frío

Se producen en algunos productos, en la mayoría de los productos tropicales y subtropicales y en numerosos productos mediterráneos o de clima templado, cuando son almacenados a temperaturas por encima de su punto de congelación, en un rango amplio, entre -0,5 y 15 a 20 °C, dependiendo del producto. Son desórdenes fisiológicos provocados por las temperaturas bajas como respuesta al estrés. Los síntomas del daño por frío se hacen más notorios después de que el producto es transferido a temperaturas más altas (temperaturas que no inducen daño por frío). Los síntomas más comunes son pardeamiento, oscurecimientos internos, incapacidad de madurar del producto, desarrollo de olores anómalos, y una aceleración en la incidencia de hongos y pudriciones superficiales, especialmente son organismos que no son encontrados en tejidos sanos (Kader, 1992).

- Daños por calor

Son inducidos por la exposición directa a la luz o a temperaturas excesivamente altas. Los síntomas incluyen un blanqueamiento, una quemadura o un escaldado en la superficie, una maduración no uniforme, un ablandamiento excesivo y una desecación.

- Daños causados por la composición de los gases

Atmósferas que contienen muy bajos niveles de oxígeno y altas concentraciones de dióxido de carbono pueden causar desintegración fisiológica en la mayoría de los productos hortícolas frescos.

El etileno puede inducir desórdenes fisiológicos en ciertas frutas y hortalizas.

Las interacciones entre concentraciones de oxígeno, dióxido de carbono, etileno, temperatura y duración del periodo de almacenamiento, influyen en la incidencia y la severidad de los desórdenes fisiológicos relacionados con la composición atmosférica (Lipton, 1987).

Los deterioros, desórdenes fisiológicos o fisiopatías más comunes en el brócoli son:

- Fermentaciones y olores indeseables: el desarrollo de fermentaciones y aromas desagradables, que se pueden producir como consecuencia del almacenamiento en atmósferas que contienen muy bajos niveles de oxígeno y altas concentraciones de dióxido de carbono, al generarse en estas condiciones compuestos azufrados indeseables.
- Tallo hueco: es una cavidad en la parte central del tallo de la base de la inflorescencia. La superficie de corte en el pedúnculo tiende a volverse parda y a pudrirse. El desarrollo de esta fisiopatía depende del cultivar y de las condiciones durante la producción, se relaciona con la carencia de boro.
- Amarilleamiento de los floretes: los floretes son los tejidos más perecederos del brócoli. Su amarilleamiento puede deberse a sobremadurez en la cosecha, temperaturas altas de almacenamiento y/o contacto con el etileno. En todos estos casos, la causa fisiológica es la senescencia de los floretes. La aparición de un color amarillo en los floretes termina con la vida comercial del brócoli. El amarillamiento por senescencia no debe confundirse con el color verde claro-amarillento que presentan las áreas de los floretes que no estuvieron expuestas a la luz durante el crecimiento, y que ocasiona el llamado “amarilleamiento marginal” (Cantwell y Suslow, 1999).
- Granos pardos en la superficie de la pella: es una fisiopatía en ciertas áreas de las inflorescencias que no se desarrollan correctamente, mueren y se tornan pardas. Se cree que es provocada por un desequilibrio nutricional de la planta durante el cultivo (Cantwell y Suslow, 1999).

Para las coles la principal alteración fisiológica es la “mota negra de la hoja”. Es una alteración que consiste en la aparición de decoloraciones de tamaño muy pequeño a moderado en la nervadura central y las venas de las hojas. Los síntomas pueden ocurrir después de bajas temperaturas en el campo o por la cosecha de las cabezas demasiado maduras, pero generalmente se asocian a las condiciones del transporte y del almacenamiento. Las temperaturas bajas del almacenamiento seguidas por temperaturas

más altas realzan aún más el desarrollo de la alteración. Y al igual que en el brócoli, como consecuencia del almacenamiento en atmósferas que contienen muy bajos niveles de oxígeno y altas concentraciones de dióxido de carbono, se pueden producir fermentaciones y aromas indeseables (Cantwell y Suslow, 2005).

1.4.2.1.6.- Daños físicos

Los mayores responsables del deterioro del producto son varios tipos de daños físicos, tales como daños en la superficie por compresión, por vibración, etc. El pardeamiento de los tejidos es el resultado de la desintegración de las membranas, originando que los compuestos fenólicos entren en contacto con la enzima polifenol oxidasa (PPO) (Dixon, 2001). Los daños mecánicos no son solamente desagradables a la vista, sino que también aceleran la pérdida de agua, dando lugar a la infección por hongos y estimulando la producción de CO₂ y etileno en el producto.

El manejo descuidado durante la cosecha del brócoli puede causar daño en los floretes e incrementar la aparición de pudriciones (Cantwell y Suslow, 1999). Para las coles la fractura de la nervadura central durante el embalaje en el campo, causa el aumento del pardeamiento y también la susceptibilidad a pudriciones (Cantwell y Suslow, 2005).

1.4.2.1.7.- Deterioros patológicos

Uno de los síntomas más comunes y obvios del deterioro es el que resulta de la actividad de las bacterias y de los hongos. El ataque de los microorganismos ocurre después del daño mecánico, físico o por un desorden fisiológico del vegetal. En algunos casos, los patógenos pueden infectar tejidos aparentemente sanos y ser la principal causa del deterioro. En general las frutas y las hortalizas demuestran una resistencia considerable a los patógenos potenciales durante la mayor parte de su vida postcosecha, sin embargo durante la maduración y la senescencia estos productos se vuelven más susceptibles a las infecciones de los patógenos. El estrés, los daños mecánicos, los daños por frío y las quemaduras de sol son factores que disminuyen la resistencia de las frutas y hortalizas a los patógenos (Cappellini y Ceponis, 1984).

1.4.2.2.- Factores ambientales involucrados en el deterioro vegetal

Entre ellos destacan los siguientes, que a continuación se detallan:

- Temperatura.
- Humedad relativa.
- Composición atmosférica.
- Etileno.
- Otros factores.

1.4.2.2.1.- Temperatura

La temperatura es el factor ambiental que tiene una mayor influencia sobre la tasa de deterioro en los productos cosechados. Por cada aumento en 10 °C por encima del óptimo, la tasa de deterioro aumenta de 2 a 3 veces. La exposición a temperaturas no deseadas dan como resultado muchos problemas fisiológicos, como los mencionados anteriormente. La temperatura también influye en el efecto de la composición gaseosa de la atmósfera sobre el producto. La germinación de esporas y la tasa de crecimiento de los patógenos son altamente influenciados por la temperatura (Kader, 1992).

La temperatura óptima de almacenamiento para el brócoli está entre 0 y 5 °C, pudiéndose almacenar así durante unos 14 días y, para las coles está entre -0,5 y 2,5 °C con una durabilidad de meses (Cantwell y Suslow, 1999; Cantwell y Suslow, 2005). El brócoli es mucho más perecedero, tiene una capacidad de almacenamiento máxima de tres días a 20 °C, mientras que las coles, de forma general, pueden llegar hasta la semana de almacenamiento a esta misma temperatura (King y Morris, 1994).

1.4.2.2.2.- Humedad relativa

La tasa de pérdida de agua de las frutas y hortalizas depende de la diferencia en el déficit de la presión de vapor entre el producto y el medio ambiente, lo cual está influenciado por la temperatura y humedad relativa (HR). A una temperatura dada y con una velocidad de movimiento del aire específica, la tasa de pérdida de agua del producto depende de la humedad relativa. A una humedad relativa dada, la pérdida de agua se incrementa con el aumento de la temperatura (Cappellini y Ceponis, 1984).

Es por esto, que el mantenimiento de la temperatura y de la humedad relativa es tan importante en la postcosecha, siendo dos parámetros a controlar de forma conjunta en el almacenamiento de los productos hortofrutícolas. De forma general se recomienda HR de entre el 85 y el 98%, teniendo en cuenta las temperaturas de refrigeración óptimas para cada producto (Kader, 1992; Shewfelt, 1986).

1.4.2.2.3.- Composición atmosférica

La reducción de la concentración oxígeno y el aumento en los niveles de dióxido de carbono puede ser intencionada, como ocurre el caso del almacenamiento en atmósfera controlada o modificada, o puede ser no intencionada, como sucede cuando hay ventilación restringida dentro de un sistema de almacenamiento o de un vehículo de transporte. Este cambio en la composición atmosférica que rodea la vegetal puede retardar o acelerar el deterioro de productos frescos. La magnitud de este efecto depende del tipo de producto, cultivar, la edad fisiológica, los niveles de O₂ y CO₂, la temperatura y el periodo de almacenamiento (Shewfelt, 1986; Wills et al., 1999).

El brócoli se puede beneficiar de atmósferas que contengan 1-2% O₂ con 5-10% CO₂ en un intervalo de temperatura de 0-5 °C. Aunque en condiciones controladas estas concentraciones bajas de O₂ alargan la vida del brócoli, las fluctuaciones de temperatura durante el manejo comercial hacen que estas concentraciones sean “peligrosas” pues el brócoli puede producir volátiles azufrados de olor desagradable. Como resultado, se recomienda una tasa de recambio de aire alta en los contenedores en los que se almacena y/o transporta el brócoli. La mayoría de los envases con atmósfera modificada para brócoli están diseñados para mantener concentraciones de 3-10% para O₂ y de 5-10% para CO₂, concentraciones que evitarían el desarrollo de estos volátiles de olores indeseables (Cantwell y Suslow, 1999).

Se puede prolongar un poco la duración de la col con una atmósfera controlada de baja concentración de O₂ (2,5-5%) y alta concentración de CO₂ (2,5-6%) en el intervalo de temperatura de 0-5 °C. El almacenamiento en atmósfera controlada (AC) mantendrá el color y el sabor de la col, retrasará el desarrollo y crecimiento de la raíz y del tallo, y reducirá la abscisión de las hojas. Las atmósferas cuya concentración de O₂ esté por debajo de 2,5% para la col de hoja y de 1% para la col de China causarán

fermentación, mientras que las atmósferas cuya concentración de CO₂ sea mayor de 10% causarán la decoloración interna (Cantwell y Suslow, 2005).

1.4.2.2.4.- Etileno

El efecto del etileno sobre los productos vegetales cosechados puede ser beneficioso o dañino para ellos, por esto, es una gran preocupación para todos aquellos que manejan productos frescos. Si bien el etileno puede ser usado para promover una rápida y uniforme maduración de algunas frutas, la exposición al etileno provoca el deterioro de la calidad de la mayoría de las hortalizas, las plantas ornamentales y las flores cortadas (Watkins, 2006).

Como vimos anteriormente, las dos brassicas estudiadas no se caracterizan por la producción de etileno, sin embargo, las dos son sensibles a él. El brócoli es extremadamente sensible al etileno presente en el ambiente postcosecha, siendo el síntoma más común el amarilleamiento de los floretes. El contacto con 2 ppm de etileno a 10 °C reduce la vida del brócoli en un 50% (Cantwell y Suslow, 1999). En las coles, aunque los efectos son menos graves, el etileno causa abscisión y amarilleamiento de las hojas (Cantwell y Suslow, 2005).

1.4.2.2.5.- Otros factores

Diversos productos químicos, por ejemplo fungicidas y reguladores de crecimiento, pueden ser aplicados a los productos para alterar uno o más de los factores biológicos que inducen el deterioro del producto hortofrutícola.

Una vez conocidos los factores biológicos y ambientales que están involucrados en el deterioro del producto hortofrutícola, así como el control de dichos factores para disminuir deterioros y pérdidas, se puede llevar a cabo el estudio y aplicación de la tecnología postcosecha más adecuada para cada producto.

En este trabajo de investigación, a parte de la refrigeración y del control de la humedad relativa durante el periodo de conservación del brócoli, se aplicaron tres tecnologías postcosecha: atmósfera controlada, atmósfera modificada y aplicación de 1-metilciclopropeno (1-MCP), cuyos fundamentos se detallan a continuación. El motivo

de haber trabajado con brócoli, en la aplicación de las distintas tecnologías postcosecha, es debido a que el brócoli es más perecedero que la col.

1.4.3.- Tecnologías de conservación en atmósfera controlada y modificada

Como se ha explicado anteriormente, las frutas y hortalizas tras la recolección siguen respirando y transpirando, y la velocidad de estas reacciones determina la vida postcosecha. Por este motivo, se busca ralentizar la respiración de dichos productos mediante el uso de diferentes técnicas postcosecha, con las que se consigue controlar los procesos de maduración y retardar la senescencia, disminuyéndose así las pérdidas de peso por deshidratación y alargándose por tanto la vida útil de los productos hortofrutícolas, sin un detrimento de la calidad y de sus cualidades organolépticas.

Con el uso de técnicas postcosecha, como la alteración de la atmósfera de conservación, se consiguen estos objetivos, pero hay que tener en cuenta, que el uso de atmósferas controladas o modificadas debe considerarse complementario al uso de técnicas de conservación frigorífica, donde se controlan los parámetros de temperatura y humedad relativa.

Ambas técnicas, atmósfera controlada (AC) y modificada (AM) suponen el cambio de la atmósfera que rodea a los alimentos por otra con una composición distinta a la del aire normal. Generalmente, se reduce el contenido de oxígeno y se aumenta el contenido de dióxido de carbono según las características del producto (Wills et al., 1999).

La AC es una técnica frigorífica de conservación en la que se modifica la composición gaseosa de la atmósfera en una cámara de refrigeración. En dicha cámara se realiza un control de las variables físicas del ambiente (temperatura, humedad y circulación del aire) y en estas condiciones controladas se lleva a cabo la conservación de un producto hortofrutícola, generalmente, en una atmósfera empobrecida en oxígeno (O₂) y enriquecida en dióxido de carbono (CO₂). En este caso, la composición de la atmósfera, la temperatura y la humedad se ajustan de forma precisa a los requerimientos del producto almacenado, manteniéndose constante durante todo el proceso (Wills et al., 1999).

La técnica de conservación en AM, es una técnica frigorífica, que consiste en envasar los productos hortofrutícolas en materiales con barrera a la difusión de los gases, como los plásticos, por lo tanto la atmósfera gaseosa que se genera dentro del envase cambia continuamente durante el periodo de almacenamiento, por la influencia de factores como la respiración del producto envasado, los cambios bioquímicos y microbiológicos que se producen en él y por la difusión de los gases a través del envase. En este caso, la elección del plástico será una variable a tener en cuenta para que se genere la atmósfera propicia, para el producto envasado, a lo largo del almacenamiento a la temperatura de refrigeración adecuada para dicho producto (Wills et al., 1999).

Por lo tanto, las AM y AC difieren en el grado de control de la concentración de gases, siendo más preciso en las AC, donde además la composición de la atmósfera es constante a lo largo de todo el almacenamiento en refrigeración, no siendo así en las AM (Kader, 2007).

Según Artés (2006), el envasado en atmósferas modificadas (AM) es ambientalmente sostenible, más flexible y barato que las AC. Dicha tecnología de envasado AM es aplicable a unidades con fracciones de kg y a palets completos, consigue los beneficios de la AC cuando se utilizan cámaras frigoríficas y/o transporte refrigerado convencionales y aporta valor añadido al producto al mejorar su presentación para el consumo (Artés, 2006).

Artés (2006) y Kader (2007) coinciden en los efectos favorables y perjudiciales del empleo de AM y AC. El uso adecuado de las AM o AC proporciona uno o varios de los siguientes beneficios:

- Disminución de la tasa respiratoria.
- Reducción en la producción, sensibilidad y acción del etileno.
- Retraso de la maduración organoléptica y senescencia del producto hortofrutícola, con todos los cambios fisiológicos y composicionales que conlleva.
- Inhibición del crecimiento y desarrollo de agentes patógenos.
- Reducción de daños por frío.
- Reducción de fisiopatías o daños fisiológicos.

- Reducción de las mermas por peso.
- Aumento de la vida comercial por reducción de pérdidas cualitativas y cuantitativas durante el almacenamiento, transporte y distribución de productos hortofrutícolas.

Pero también una incorrecta composición de la atmósfera puede tener efectos perjudiciales, tales como:

- Maduración irregular o anormal.
- Desarrollo de sabores y olores anómalos debido a concentraciones muy bajas de oxígeno y altas de dióxido de carbono, como resultado de una respiración anaerobia.
- Sensibilización a los daños por frío.
- Desarrollo de alteraciones fúngicas secundarias sobre tejidos dañados.
- Aparición de nuevas fisiopatías y desórdenes propios de la nueva atmósfera.
- Particularmente las AC tienen las limitaciones de la apertura de la cámara, y el aumento de la problemática de incompatibilidades entre variedades a consecuencia de las diferentes condiciones de conservación.

Por lo tanto, para maximizar los beneficios y disminuir los efectos perjudiciales, es necesaria una correcta aplicación de las técnicas de AC y AM, lo que requiere precisión en la composición de la atmósfera de conservación, así como de la temperatura y la humedad relativa, condiciones que serán propias para cada producto. Además, hay que tener en cuenta que el producto bajo estas condiciones se encontrará con un metabolismo ralentizado, con la posibilidad de una reactivación vegetativa una vez expuesto al aire atmosférico normal.

De forma general, la tecnología AC es utilizada para ampliar la vida útil de frutas y verduras almacenadas a granel, usando para ello, almacenes herméticos que están equipados con sistemas que controlan con alta precisión la composición de la atmósfera gaseosa en el interior, así como la temperatura y la humedad relativa. Pero también es una tecnología que sirve como primer paso para el diseño y desarrollo correcto del envasado en AM.

El envasado en AM es una técnica utilizada para modificar y controlar la atmósfera en el interior del envase, teniendo en cuenta el proceso natural de respiración del producto y la permeabilidad a los gases del embalaje que lo contiene (Serrano et al., 2006). Dicha modificación de la atmósfera puede obtenerse de forma activa o pasiva. En la activa, la atmósfera se modifica durante el envasado generalmente por inyección de una mezcla de gases de una composición determinada, y en la pasiva la permeabilidad de las películas plásticas al O₂, al CO₂, al etileno y al vapor de agua, así como la respiración del producto, permitirán la creación de una atmósfera de equilibrio con menor concentración de O₂ y mayor de CO₂ que la atmósfera normal (Church, 1994).

La permeabilidad a los gases del material elegido debe permitir la entrada de oxígeno en el interior del envase y la eliminación de dióxido de carbono a una velocidad suficiente para que se establezca una atmósfera modificada de equilibrio. Los recientes avances en el envasado en AM se deben, en buena medida, a la aparición en el mercado de nuevos polímeros y envases con un amplio rango de difusión a los gases. De entre los tipos de polímeros disponibles, los más utilizados son el polietileno (PE), el polipropileno (PP), el cloruro de polivinilo (PVC), el copolímero de etileno y acetato de vinilo (EVA) y el poliestireno (PS), cada uno de ellos con rangos de permeabilidad muy amplios y características muy específicas (Artés, 2006).

El grado de modificación de la atmósfera dentro del envase depende de la permeabilidad al oxígeno y dióxido de carbono del plástico, del ritmo respiratorio del producto y de la influencia de la temperatura, tanto en la permeabilidad del envase como en la respiración del producto. Temperaturas elevadas durante el transporte, almacenamiento y comercialización de frutas y hortalizas conducen al deterioro del producto envasado debido al incremento de su metabolismo y al crecimiento de microorganismos. Como resultado, los niveles de oxígeno disminuyen y los de dióxido de carbono aumentan en el interior del envase. Con el incremento de la temperatura se produce un aumento de la permeabilidad del plástico, que es insuficiente para mantener los niveles de oxígeno que demanda el producto, lo que conduce, finalmente, a un déficit de oxígeno. De ahí la importancia de mantener estable la temperatura de almacenamiento, ya que las fluctuaciones, incluso si solo ocurren una vez, pueden

comprometer los beneficios del envasado en AM y la seguridad del producto (Sandhya, 2010).

Otro aspecto a considerar en el éxito del envasado en AM es el control de la humedad relativa dentro del envase. Ésta suele estar próxima a la saturación en la mayoría de los envases plásticos, una vez termosellados. Por ello, incluso pequeñas fluctuaciones de temperatura durante el almacenamiento, transporte o comercialización pueden provocar condensaciones de agua en la superficie de los vegetales y del plástico. Tales condensaciones favorecen la proliferación de microorganismos alterantes y patógenos, que restan valor comercial a frutas y hortalizas (Aharoni et al., 2008).

Actualmente, el uso de películas microperforadas, como el PP microperforado, está aumentando, y se emplean en aquellos productos que precisan de una velocidad de transmisión de oxígeno elevada, como es el caso de los productos hortofrutícolas en general. Se trata de películas que contienen pequeños agujeros de aproximadamente 40-200 μm de diámetro que atraviesan la película. La atmósfera dentro del envase es determinada por el área total de perforaciones en la superficie del envase. Además, las películas microperforadas mantienen unos niveles de humedad relativa altos, evitan condensaciones cuando aumenta la temperatura, y son muy efectivas para prolongar la vida media de productos especialmente sensibles a las pérdidas por deshidratación y al deterioro por microorganismos (Oliveira et al., 1998).

1.4.4.- Tecnología de aplicación de 1-metilciclopropeno (1-MCP)

El 1-metilciclopropeno (1-MCP) es un tratamiento químico de postcosecha que está atrayendo la atención de científicos e industriales. Se ha demostrado que este compuesto es un poderoso inhibidor de la acción del etileno y que por tanto, tiene la capacidad de mantener la calidad en postrecolección en muchos productos vegetales (Watkins, 2008).

El descubrimiento del 1-MCP como inhibidor de la producción de etileno comienza a finales de 1980, con la investigación desarrollada por Sisler et al. (1995). Estos investigadores decidieron buscar un compuesto distinto del etileno que tuviera la facultad de unirse fuertemente a los receptores del etileno en los tejidos, y así crear una

marca de seguimiento que facilitara las tareas de extracción y purificación de estos receptores.

Los primeros trabajos y el desarrollo comercial del producto se realizaron en flores cortadas, demostrando su efecto al atrasar la senescencia natural. El producto se ha comercializado bajo el nombre de “EthylblockTM” para flores y “SmartfreshTM” para frutas y hortalizas. El 1-MCP está clasificado por la Agencia de Protección del Ambiente de USA como un regulador de crecimiento, con un modo de acción inocuo para el ser humano. La aplicación se realiza en forma gaseosa, a través de la volatilización del compuesto con agitación o aireación. La concentración efectiva varía para cada producto y se dosifica en función del volumen total de la cámara (Watkins, 2006). Más recientemente, se registró en el año 2007 con el nombre de “HarvistaTM”, un producto constituido por 1-MCP que en el futuro, posiblemente, permitirá su aplicación en precosecha (Watkins, 2008).

En condiciones de temperatura y presión estándares, el 1-MCP es un gas que ocupa los receptores del etileno, de forma que el etileno no se puede unir, ni producir su acción. Sisler y Serek (1997) propusieron un modelo de cómo el 1-MCP reacciona con el receptor del etileno, siendo la afinidad del 1-MCP por el receptor del etileno aproximadamente 10 veces mayor que la que posee el propio etileno. Por tanto, comparado con el etileno, el 1-MCP es más activo a concentraciones inferiores, inhibiendo la acción del etileno y por tanto su biosíntesis autocatalítica.

Se ha asumido que la unión del 1-MCP a los receptores de etileno es permanente después del tratamiento, es decir irreversible, y si ese vegetal vuelve a producir etileno se debe a la aparición de nuevos receptores. Aunque esto puede ser verdad, no hay muchos datos que así lo demuestren, y además entre distintos vegetales, la regeneración de los tejidos es muy diferente (Sisler y Serek, 1997).

El efecto general del 1-MCP en los productos hortofrutícolas es el de detener o retrasar su maduración. Sin embargo, la acción de este compuesto sobre hortalizas como el brócoli o la lechuga, así como en algunas frutas no climatéricas, cuya maduración o senescencia no está influenciada por el etileno, sería la detención de la senescencia

(Able et al., 2002). Este proceso de senescencia conllevaría la aparición de alteraciones, como amarilleamientos, que inciden en una pérdida del valor del producto.

Con respecto a la calidad organoléptica, se ha observado, de forma general, que la aplicación de 1-MCP retrasa los cambios de color, textura, acidez y sólidos solubles que suceden durante la maduración y senescencia de los vegetales, pero su eficacia depende mucho del producto y del cultivar sobre el que se haga la aplicación (Watkins, 2006; Watkins, 2008). Además, el aroma de los productos hortofrutícolas tratados con 1-MCP puede verse afectado significativamente, pudiendo esto influenciar o modificar la aceptabilidad por el consumidor (Ku y Wills, 1999).

Por otro lado, se han observado diferentes efectos del 1-MCP sobre la calidad nutritiva de los productos hortofrutícolas, si bien, se sabe poco sobre su efecto en los compuestos bioactivos (Yuan et al., 2010).

En los diferentes trabajos publicados sobre los tratamientos de frutas y hortalizas con 1-MCP existen diferentes variables que influyen en su eficacia para retrasar la maduración o senescencia de estos productos vegetales. Entre estas variables destacan la temperatura, la dosis y duración del tratamiento, el estado de maduración del vegetal, la forma de recolección y el tiempo transcurrido entre la recolección y el tratamiento. No existe un estándar de aplicación, y cada una de estas variables debe ser ajustada para cada especie y cultivar (Watkins, 2006; Watkins, 2008).

Alguna de estas variables son:

- Temperatura

En muchos estudios el 1-MCP ha sido aplicado a temperaturas que van desde 1 a 25 °C. La aplicación a bajas temperaturas no ha sido efectiva en algunos productos. Así, la aplicación del 1-MCP en brócoli producía mejores resultados a 20 °C que a 5 °C, pero se daba efecto inhibitor de etileno exógeno en ambos casos (Ku y Wills, 1999). Hay que tener cautela con el uso de temperaturas elevadas, pues podrían desencadenar daños, por eso, es conveniente trabajar a menos de 5 °C, aunque el tiempo de aplicación sea mayor. La relación entre tiempo de tratamiento y temperatura, también fue objeto de

estudio por DeEll et al. (2002), llegando a la conclusión que a mayor temperatura hacía falta menos tiempo de tratamiento con 1-MCP.

- Concentraciones adecuadas

Las concentraciones efectivas varían, dependiendo del producto vegetal, del tiempo de aplicación, la temperatura y del estado de maduración. Así, por ejemplo, la concentración mínima para bloquear la acción del etileno en brócoli está entre 0,1 y 10 $\mu\text{L/L}$ (Yuan et al., 2010).

- Aplicación múltiple

Como se ha comentado anteriormente, se asume que la unión entre receptores de etileno y 1-MCP es irreversible, por lo que la producción de etileno posterior se debería a la regeneración de nuevos receptores. Por ello, volver a tratar los vegetales podría ser aconsejable. En el caso del tomate se ha indicado que la aplicación múltiple resulta más efectiva que la aplicación simple (Mir et al., 1999). Sin embargo, aplicaciones múltiples de 1-MCP a brócoli no surtieron más efecto que una sola aplicación (Able et al., 2002).

- Duración del tratamiento

En muchos estudios se aconseja que la duración del tratamiento esté entre 12 y 24 horas, lo cual es suficiente para generar una respuesta de inhibición completa. Además, se ha observado una relación inversamente proporcional, entre la duración del tratamiento y la dosis necesaria para conseguir el efecto. Así, en brócoli, Ku y Wills (1999), describen que a mayores concentraciones de 1-MCP se requiere menor duración del tratamiento para retrasar su senescencia. El cultivar también es un factor importante, para el mismo producto, según el cultivar, se requerirá un tiempo de aplicación más corto o más largo a igual concentración (DeEll et al., 2002). La duración del tratamiento también se ve afectada por la temperatura de aplicación, como ya se ha comentado.

- Estado de maduración del vegetal

Es necesario tener en cuenta el estado de desarrollo del vegetal, ya que tiene una gran influencia en el efecto del 1-MCP (Watkins, 2006).

- Tiempo transcurrido desde la recolección hasta el tratamiento

La importancia del tiempo transcurrido desde la recolección hasta el tratamiento con 1-MCP varía según el cultivo. Generalmente, el tiempo transcurrido desde la recolección, debe de ser el mínimo para conseguir la máxima efectividad, como se ha comprobado en brócoli (Able et al., 2002). Por el contrario, la producción de etileno, el ablandamiento del fruto y el pardeamiento interno en albaricoque y ciruela fue inhibido cuando los frutos fueron tratados con 1-MCP tras el almacenamiento, pero no antes de ser almacenados (Dong et al., 2002).

- Influencia del envasado

En un reciente estudio en ciruelas ‘President’, se ha puesto de manifiesto, que para obtener los máximos beneficios que proporciona la aplicación del 1-MCP en estas ciruelas, los tratamientos deben de realizarse una vez la fruta se encuentra ya envasada, en lugar de realizar el tratamiento con 1-MCP sobre fruta dispuesta a granel. Así el gas podría difundir homogéneamente por la superficie de la fruta, y todos los receptores de etileno serían bloqueados por el 1-MCP (Valero et al., 2004).

Con todo esto, se puede decir que las perspectivas comerciales del 1-MCP dependen de que se amplie la información sobre las aplicaciones comerciales del 1-MCP. A nivel mundial, los productos que parecen tener las mejores perspectivas son manzana, aguacate, melón, caqui, ciruela y tomate. En España, la aplicación y uso de 1-MCP está realizándose sobre tomate, caqui, ciruela, manzana y se encuentra en fase de registro para pera. Por otro lado, la aplicación comercial de esta tecnología está muy relacionada con el coste de la aplicación en función de los beneficios del producto. De hecho, la relación coste/beneficio está afectada por muchos factores que engloban desde el efecto sobre el producto, hasta el impacto sobre la percepción por parte del consumidor. Del mismo modo, los productos tratados con 1-MCP pueden mostrar una competitividad clave, para acceder a mercados donde otras tecnologías no lo permitirían (Guillén, 2009).

1.5.- Fundamentos de los métodos analíticos

Para la detección, identificación y cuantificación de los parámetros de calidad físico-química y funcional, así como para saber su evolución a lo largo de los almacenamientos postcosecha realizados con las muestras vegetales, es necesario el uso de diferentes métodos analíticos ofrecidos por la disciplina de la química analítica.

La química analítica trata de la detección de la naturaleza (análisis cualitativo) y de la medida de la cantidad (análisis cuantitativo) de las diversas sustancias presentes en un material (Ayres, 1970).

Para llevar a cabo un análisis cuantitativo hay que llevar a cabo dos mediciones:

- La primera medida es el peso o volumen de la muestra bajo análisis.
- La segunda medida es una cantidad que es proporcional a la cantidad de analito presente en la muestra.

Los métodos analíticos se clasifican en función de la naturaleza de esta última medida (Skoog et al., 1992), en este sentido hablamos de:

- Métodos Clásicos o Químicos: basados en interacciones materia-materia, esto es, en reacciones químicas. El analito se determina por medidas gravimétricas o volumétricas.
- Métodos Físicos: un método analítico se considera físico cuando no incluye reacción química alguna y la operación de medida no modifica la composición química del sistema. Como la medida del color y de la textura.
- Métodos Instrumentales o Físico-químicos: basados en interacciones materia-energía, utilizan un instrumento más o menos complejo para evaluar una propiedad física o físico-química del sistema objeto de análisis. Son métodos potenciométricos, calorimétricos, espectroscópicos y cromatográficos.

Uno de los métodos instrumentales más usados es la cromatografía, que se basa en un conjunto de técnicas asociadas al principio de retención selectiva, que permite separar los distintos componentes de una mezcla. La cromatografía posee una fase

móvil, que consiste en un fluido (gas, líquido o fluido supercrítico) y una fase estacionaria, que se trata de un sólido o un líquido fijado en un sólido. En la separación cromatográfica, los distintos componentes de la mezcla interaccionan de forma diferente con la fase estacionaria y con la fase móvil, atravesando la fase estacionaria a distintas velocidades y favoreciéndose así la separación. Las técnicas cromatográficas se pueden dividir en función a distintos factores, la división más sencilla es en función al lecho cromatográfico, dividiéndose en:

- Cromatografía plana: la fase estacionaria se sitúa sobre una placa plana o sobre un papel. Las principales técnicas son :
 - Cromatografía en papel.
 - Cromatografía en capa fina.
- Cromatografía en columna: la fase estacionaria se sitúa dentro de una columna. Según el fluido empleado como fase móvil se distinguen:
 - Cromatografía de líquidos. Es una de las más utilizadas, sobre todo la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) (Figura 1.12).
 - Cromatografía de gases.
 - Cromatografía de fluidos supercríticos.

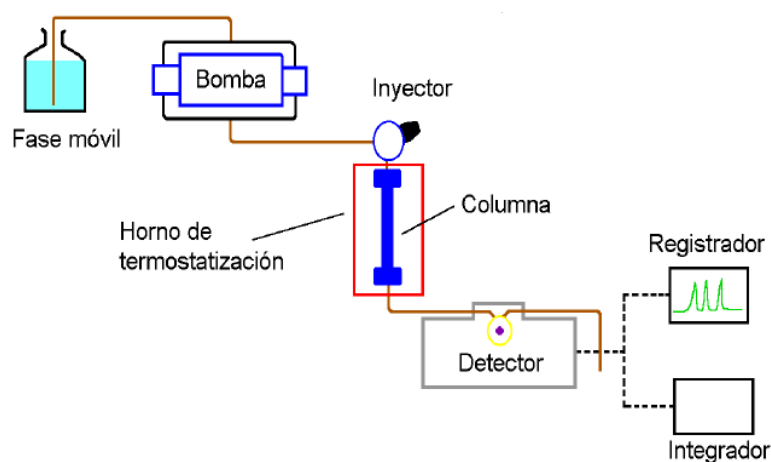


Figura 1.12: Esquema de un cromatógrafo de líquidos.

Por tanto, la cromatografía es una técnica analítica que nos permite separar o aislar los compuestos de interés tanto de la matriz donde se encuentra, como de otros interferentes presentes en la muestra. Esta técnica separativa lleva acoplado un sistema de detección, que en función de sus características lleva a cabo la identificación y cuantificación del analito de interés, hablándose entonces de técnicas de análisis acopladas.

Los detectores usados en HPLC son: detector de absorbancia, de fluorescencia, de índice de refracción, de dispersión de la luz (técnicas de detección basadas en métodos espectroscópicos); detector electroquímico (basado en potenciometría); y detector de espectrometría de masas (basado en espectroscopía).

La espectrometría de masas es una técnica de análisis basada en la separación de acuerdo a sus razones masa/carga (m/z) de las especies cargadas formadas a partir de la volatilización/ionización de una muestra. Todos los espectrómetros de masas constan de una serie de partes esenciales: la primera es la Fuente, en la que se generan los iones gaseosos del analito (volatilización/ionización); la segunda es el Analizador de masas, que diferencia a los iones gaseosos según su relación m/z ; la tercera parte es el Detector, el cual recibe a los iones diferenciados por el analizador; el cuarto elemento fundamental del equipo son las Bombas a vacío, que regulan los valores absolutos y el gradiente de vacío entre la fuente, el analizador de masas y el detector. A todo esto, en la actualidad se le añade el uso de sistemas informáticos que permiten almacenar y tratar los datos obtenidos (Figura 1.13) (Erra-Balsells, 2004).

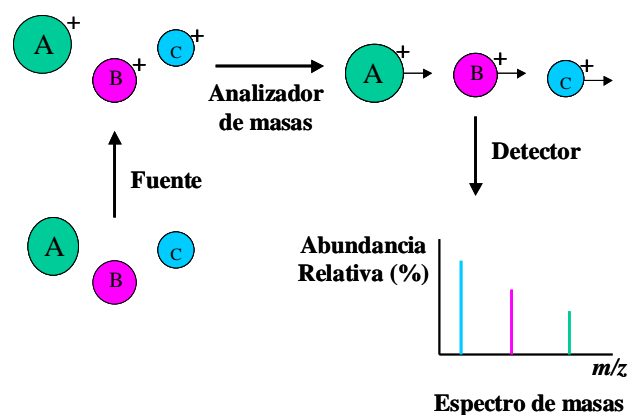


Figura 1.13: Partes y procesos fundamentales en un espectrómetro de masas.

Se trata de una técnica extremadamente sensible, de gran versatilidad y cuyos campos de aplicación experimentan un crecimiento vertiginoso en nuestros días. La espectrometría de masas suministra información muy valiosa sobre los compuestos químicos: la masa molecular, la fórmula global y, a partir del patrón de fragmentaciones, la estructura molecular, así como la composición isotópica en sustancias naturales o marcadas. Debe reiterarse la elevada sensibilidad de la espectrometría de masas, por lo que es la preferida para la determinación de trazas en química ambiental, en los controles antidopaje y en la determinación de compuestos bioactivos en los alimentos.

Todos los métodos analíticos tienen unas características de calidad comunes que son:

- **Exactitud:** Grado de concordancia entre el resultado y un valor de referencia certificado. En ausencia de exactitud se tiene error sistemático.
- **Precisión:** Grado de concordancia entre los datos obtenidos de una serie. Refleja el efecto de los errores aleatorios producidos durante el proceso analítico.
- **Sensibilidad:** Capacidad para discriminar entre pequeñas diferencias de concentración del analito. Se evalúa mediante la sensibilidad de calibración, que es la pendiente de la curva de calibración a la concentración de interés.
- **Límite de detección (LOD):** Concentración correspondiente a una señal de magnitud igual al blanco más tres veces la desviación estándar del blanco.
- **Intervalo dinámico:** Intervalo de concentraciones entre el límite de cuantificación (LOQ) y el límite de linealidad (LOL).
- **Selectividad:** Cuantifica el grado de ausencia de interferencias debidas a otras especies contenidas en la matriz.
- **Seguridad:** Amplitud de condiciones experimentales en las que puede realizarse un análisis.

Pero además de la medida, un análisis cuantitativo implica una secuencia de etapas que implican desde la definición del problema planteado hasta la elaboración de un informe y sus conclusiones. De forma general los pasos del proceso analítico serían:

1. Definición del problema.
2. Selección del método de análisis.
3. Obtención de la muestra o toma de muestra o muestreo.
4. Tratamiento de la muestra.
5. Proceso de medida, calibración.
6. Evaluación de los resultados, informe y conclusiones.

Dentro de esta serie de pasos no hay que olvidar que el objetivo principal en un análisis químico, es la búsqueda de procedimientos o metodologías, que permitan cuantificar a un determinado analito o conjunto de analitos en una mezcla, mediante la eliminación de las influencias que puedan ser debidas a otros compuestos presentes. Debido al gran avance de la quimiometría, se han desarrollado algoritmos que permiten evitar estos inconvenientes. Por lo tanto, la quimiometría es una disciplina química que utiliza herramientas matemáticas, estadísticas y lógica formal para: diseñar o seleccionar procedimientos experimentales optimizados; proporcionar información química relevante analizando datos químicos y obtener conocimientos sobre sistemas químicos (Massart et al., 1997).

El gran avance de la quimiometría es debido, en parte, a la mayor facilidad que existe para el manejo de un gran número de datos, la realización de cálculos y el desarrollo computacional. Actualmente, la programación en el entorno MATLAB está teniendo un gran auge dentro de la química analítica y, concretamente, dentro del campo de la quimiometría. El nombre MATLAB proviene de la contracción matrix laboratory. Este paquete de software presenta gran poder computacional, gráfico y de programación, todo ello en un lenguaje sencillo, lo que hace que la programación en MATLAB sea fácil de llevar a cabo. MATLAB es un sistema interactivo, donde el elemento básico es el vector, el cual no requiere una dimensionalización previa. Esto

permite la resolución de un gran número de problemas computacionales, especialmente aquellos basados en el cálculo matricial y vectorial (González-Gómez, 2005).

Con MATLAB podemos realizar calibraciones multivariantes como la realizada con el método de regresión por mínimos cuadrados parciales PLS (Partial Least Squares). Mediante los métodos de calibración multivariante es posible obtener información cuantitativa selectiva a partir de datos poco selectivos, posibilitándose la determinación simultánea de diversos componentes en muestras complejas. Esta posibilidad se traduce en que el tratamiento previo de la muestra se reduce al mínimo, lo que, a su vez, determina tiempos de análisis más cortos, aspectos ambos de gran importancia en los análisis de rutina o de control sobre gran cantidad de muestras análogas (Martens y Naes, 1989).

Una de las principales ventajas de la calibración multivariante es la minimización de la manipulación de las muestras. Los métodos univariantes requieren, en la mayoría de los casos, complejos procesos previos a la adquisición de la señal que, generalmente, conllevan procesos de separación, con el consiguiente consumo de tiempo, posible contaminación de las muestras y en muchos casos pérdida de sensibilidad, posibilitando en la mayoría de los casos la determinación cuantitativa de un único componente en una muestra compleja. Sin embargo, la utilización de métodos de calibración multivariante posibilita el análisis de más de un componente de interés en sistemas complejos reales de forma más directa (Tauler y Casassas, 1989).

Para finalizar, decir que toda esta metodología química permite obtener una trazabilidad de los resultados, es decir, un seguimiento en todo el proceso analítico, obteniéndose resultados con calidad analítica que logren explicar el problema planteado.

2.- JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS/ OBJECTIVES

2.- JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS/OBJECTIVES

2.1.- Justificación

Los hábitos actuales de consumo de productos vegetales frescos y elaborados están obligando a actualizar y mejorar las tecnologías postcosecha y los métodos de producción de las industrias agroalimentarias. Las nuevas tendencias hacia un producto de alta calidad y con un elevado valor, supone la puesta a punto de nuevos tratamientos de conservación, que por un lado satisfagan a un consumidor cada vez más exigente y por otro a un mercado cada vez más competitivo, dinámico y globalizado.

Brócoli y coles son productos de gran demanda, entre otras cuestiones por su interés como hortalizas de alto interés funcional. Por ello, el conocimiento exhaustivo del producto fresco y el estudio de diferentes estrategias postcosecha resultan necesarios para establecer las condiciones óptimas de conservación según su destino comercial, de tal forma que se minimizarán las pérdidas de calidad final del producto fresco, permitiendo así alargar el periodo de almacenamiento y posibilitando la distribución a mercados más alejados de los centros de producción.

2.2.- Objetivos

Por todo esto el **objetivo general** de este trabajo fue conocer el efecto que la aplicación de diferentes tratamientos o tecnologías postcosecha tiene sobre distintos tipos de Brassicas. Para alcanzar este objetivo principal, se propusieron los siguientes **objetivos específicos**:

1. La caracterización físico-química y funcional de dos tipos de Brassicas cultivadas en Extremadura, brócoli y col de Milán, con el fin de conocer el material de estudio.
2. Establecer métodos rápidos y reproducibles de cuantificación de los compuestos funcionales presentes en las Brassicas: clorofilas, carotenoides, compuestos fenólicos y glucosinolatos.
3. Aplicar diferentes tecnologías postcosecha sobre el brócoli, con el fin de reducir el deterioro de su calidad durante el almacenamiento y aumentar su vida útil. Las

tecnologías aplicadas fueron atmósfera controlada, aplicación de 1-metilciclopropeno (1-MCP) y envasado de floretes en atmósfera modificada.

2.3.- Objectives

The **main objective** of this dissertation was to understand the effects produced by the application of a number of postharvest technologies to different types of Brassicas. To achieve this goal, the following **specific objectives** were proposed:

1. Characterize physic chemically and functionally two types of Brassicas grown in Extremadura, broccoli and Savoy cabbage, with the aim of knowing the plant material used in this study.
2. Establish rapid and reliable analytical methodologies to quantify the bioactive compounds found in Brassicas: chlorophylls, carotenoids, phenolic compounds and glucosinolates.
3. Application of different postharvest technologies such as controlled atmosphere, modified atmosphere and application of 1-methylcyclopropene (1-MCP), to extend the shelf life of broccoli.

3.- MATERIAL Y MÉTODOS

3.- MATERIAL Y MÉTODOS

3.1.- Material vegetal y diseño experimental

3.1.1.- Caracterización físico-química y funcional de brassicas

Los cultivos de brócoli, ‘Parthenon’ y ‘Mónaco’, utilizados para este ensayo se realizaron en un campo comercial ubicado en las Vegas Bajas del Guadiana, cercano al municipio de Badajoz en Extremadura. Mientras que los de col de Milán, ‘Dama’ y ‘Leticia’, fueron cultivados en el centro de investigación “Finca La Orden-Valdesequera” localizada también en las Vegas Bajas del Guadiana. De este modo, todos los cultivares crecieron bajo unas condiciones agroclimáticas y de cultivo semejantes, en un suelo aluvial, de textura franco-arenosa, ligeramente ácido y con un contenido de materia orgánica bajo. Los cultivares usados fueron elegidos por tener buenas características agronómicas y por tanto, ser los más producidos en esta zona.

La cosecha de los cultivares de col de Milán se realizó durante la segunda semana de diciembre de 2009, cosechándose ambos cultivares en el mismo estado de madurez de acuerdo con los parámetros de calidad: peso, color característico (de color verde a verde-amarillo pálido), compacidad o firmeza de la cabeza al tacto y hojas turgentes y crujientes, así como con ausencia de defectos. Destacar que las pellas o cabezas de col de Milán ‘Dama’ eran más redondeadas y, sin embargo, las del cultivar ‘Leticia’ eran ovaladas.

La cosecha de los cultivares de brócoli se produjo durante la primera semana de febrero de 2009. Las plantas fueron cosechadas en el mismo estado, con aproximadamente 20 cm de diámetro de las pellas, con apropiado índice de madurez, compactas al tacto, con todos los floretes cerrados y de color verde oscuro brillante y sin defectos, como así requieren los índices de calidad.

Una vez cosechadas, las muestras fueron rápidamente transportadas al laboratorio, donde se analizaron un total de 12 pellas de brócoli y 12 pellas o cabezas de col de Milán para cada cultivar, respectivamente, según el diseño experimental.

En el caso del brócoli, las muestras fueron floreteadas y, en el caso de la col de Milán, fueron deshojadas, seleccionando hojas de distintas profundidad (externas, medias e internas). (Figura 3.1) En ambos casos, se quitaron las hojas de envoltura externa y se descartaron las muestras con defectos o con índices de madurez y calidad no apropiados.



Figura 3.1: Brócoli y Col de Milán.

Las determinaciones del peso, textura, color, pH, contenido en sólidos solubles y humedad se hicieron sobre las muestras en fresco. Sin embargo, para las determinaciones del contenido en ácido ascórbico, carotenoides y clorofilas, así como para la determinación del valor de actividad antioxidante, las muestras fueron envasadas a vacío y congeladas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, hasta realizar posteriormente los análisis correspondientes. Para la determinación del contenido en compuestos fenólicos y glucosinolatos se tomaron de 10 a 15 floretes de cada muestra para preparar un homogeneizado que posteriormente se liofilizaba, utilizando para ello un liofilizador Virtis-Genensis (SP Industries Inc, PA, USA).

Todos los parámetros estudiados, tanto en el brócoli como en la col de Milán, fueron evaluados para caracterizar completamente ambos tipos de brassicas y determinar así, las variaciones cualitativas y cuantitativas entre los cultivares producidos bajo similares condiciones y usando los mismos procedimientos analíticos.

3.1.2.- Aplicación de diferentes tecnologías postcosecha al brócoli 'Parthenon'

3.1.2.1.- Alteración de las condiciones comerciales de atmósfera controlada usadas para el almacenamiento de brócoli 'Parthenon'

Para este ensayo se utilizaron las muestras de brócoli 'Parthenon' descritas anteriormente, pero esta vez con 20 a 25 cm de diámetro cada pella.

Aproximadamente 50 kg de brócoli fueron seleccionados y distribuidos en tres lotes de muestras:

1. Muestra fresca o recién cosechada: un total de 6 pellas de brócoli fueron analizadas el día cero del ensayo (día 0).
2. Muestra control: 18 pellas de brócoli fueron divididas en 3 lotes de 6 pellas cada uno, y almacenadas en una cámara de refrigeración a 1-2 °C, con un 85-90% de humedad relativa (HR), bajo atmósfera normal (aire). Se analizaron 6 pellas de brócoli en tres fechas durante el almacenamiento, los días 3, 9 y 21.
3. Muestra en atmósfera controlada (AC): 18 pellas de brócoli fueron almacenadas en tres cabinas diferentes (6 pellas por cabina) bajo la atmósfera controlada estudio (10% de O₂ y 5% de CO₂), manteniendo un 85-90% HR y con 1-2 °C de temperatura. Cada una de las cabinas fue abierta tras un determinado tiempo de almacenamiento, 3, 9 y 21 días, analizándose por tanto, al igual que antes, 6 pellas de brócoli por cada día de muestreo.

Las cabinas utilizadas para el almacenamiento en atmósfera controlada eran de polimetacrilato de metilo de 530 litros cada una (Tecnidex SA, Valencia, España) (Figura 3.2) y estaban equipadas con detectores en línea para comprobar en todo momento que la composición de la atmósfera en su interior se mantenía en las condiciones establecidas, 10% O₂ y 5% CO₂.

Además, la composición de la atmósfera se controlaba a través del software específico que permitía la inyección de la cantidad necesaria de dióxido de carbono, de nitrógeno o de aire sintético para mantener las condiciones de atmósfera controlada requeridas, así como el control de la HR (80-90%) y de la temperatura (1-2 °C). Las

mediciones de la composición del gas, la humedad relativa (HR) y la temperatura se realizaron cada 10 minutos para asegurar las condiciones del ensayo.

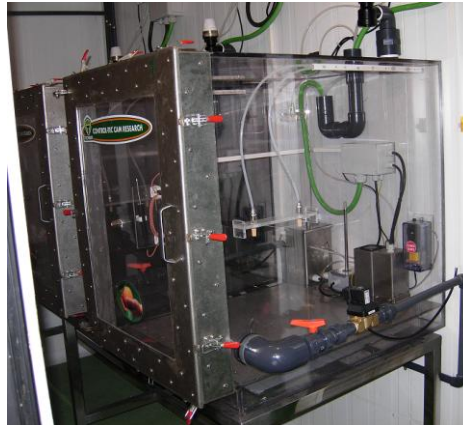


Figura 3.2: Cabinas de almacenamiento en atmósfera controlada.

Para cada muestra y día de muestreo se realizaron los siguientes análisis: pérdida de peso, firmeza, color y contenido en sólidos solubles (empleando la muestra en fresco); ácido ascórbico, actividad antioxidante, carotenos y clorofilas (utilizando la muestra congelada a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$), siguiendo tanto en la muestra en fresco como en la congelada la metodología descrita para el brócoli en el apartado anterior. Para el análisis de compuestos fenólicos y glucosinolatos (se tomaron de 10 a 15 floretes de cada muestra para preparar homogeneizados que posteriormente se liofilizaban, utilizando para ello un liofilizador Virtis-Genensis (SP Industries Inc, PA, USA).

3.1.2.2.- Aplicación de diferentes estrategias postcosecha para preservar la calidad del brócoli 'Parthenon' durante el almacenamiento y vida útil: atmósfera controlada y aplicación de 1-MCP

El origen de las plantas de brócoli usadas para este ensayo (*Brassica oleracea* L. var *italica* cv. Parthenon) fue el mismo que el descrito anteriormente, pero esta vez la cosecha se realizó durante la segunda semana de enero del 2010, cosechándose con el apropiado índice de madurez y calidad.

Aproximadamente 123 kg de brócoli (de unos 20-25 cm de diámetro cada pella) fueron rápidamente transportados al laboratorio después de su cosecha, donde se

seleccionaron y se descartaron las pellas con daños, obteniéndose así un total de 144 pellas de brócoli que fueron clasificadas en 4 lotes de muestras diferentes:

1. Muestra fresca: 9 pellas de brócoli fueron analizadas después de su recolección (día 0 del ensayo).
2. Muestra control: 45 pellas de brócoli fueron divididas en 5 lotes de 9 pellas cada uno y almacenadas en una cámara de refrigeración a 1-2 °C, con un 85-90% de humedad relativa (HR), bajo atmósfera normal (aire) para su análisis los días 2, 6, 13, 20 y 27.
3. Muestra en atmósfera controlada (AC): 45 pellas de brócoli fueron almacenadas en 5 cabinas de atmósfera controlada previamente descritas (Figura 3.2) bajo la atmósfera controlada estudio (10% de O₂ y 5% de CO₂), manteniendo un 85-90% HR y con 1-2 °C de temperatura. Las cabinas fueron abiertas individualmente, una por cada día de muestreo, teniendo cada una de ellas 9 pellas de brócoli que se analizaron los días 2, 6, 13, 20 y 27.
4. Muestra tratada con 1-MCP: 45 pellas de brócoli fueron tratadas con SmartFresh™ (AgroFresh Inc., Rohm and Haa Europe Trading APS, S.L., España) según las recomendaciones comerciales, tratamiento con 0,6 µL/L de 1-MCP en un contenedor estanco de plástico de 1 m³ (Figura 3.3) durante 24 horas a 1 °C. Después de este tiempo, la bolsa o contenedor de plástico se abrió y las muestras se ventilaron, dividiéndose a continuación en 5 lotes de 9 pellas de brócoli cada uno, los cuales se almacenaron a 1-2 °C y 85-90% HR, analizándose tras 2, 6, 13, 20 y 27 días de almacenamiento.



Figura 3.3: Bolsa o contenedor estanco de plástico.

Para realizar con efectividad la aplicación del tratamiento con 1-MCP, las cajas con las pellas de brócoli se colocaron en el interior de la bolsa (Figura 3.3) de forma que en el medio de todas estuviera el dispositivo donde se realizaba la mezcla de reacción. Dicho dispositivo consistía en un recipiente de mezcla y un pequeño ventilador para facilitar la difusión del gas 1-MCP (Figura 3.4). La aplicación se realizó en todo momento dentro de una cámara de refrigeración a 1 °C.

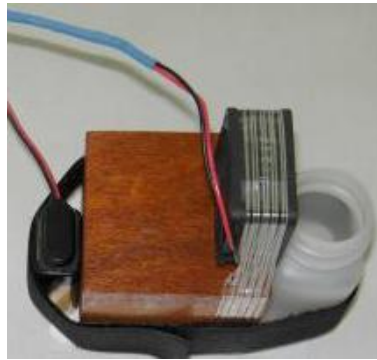


Figura 3.4: Dispositivo para realizar la mezcla de reacción y difundir el 1-MCP gas.

La mezcla de reacción se preparó mezclando 15 mL de líquido activador (Figura 3.5A), dos pastillas activadoras (Figura 3.5B) y dos pastillas de 1-MCP (Figura 3.5C) suministrados por SmartFresh™, obteniéndose así 0,6 $\mu\text{L/L}$ de 1-MCP en 1 m^3 . Al reaccionar los componentes, el 1-MCP fue liberado en forma de gas, con lo que seguidamente se procedió al cerrado y sellado hermético de la bolsa. A las 24 horas se abrió la bolsa y las pellas, una vez aireadas, se conservaron en refrigeración a 1-2 °C y 85-90% HR para su posterior análisis los correspondientes días de muestreo.



Figura 3.5: Materiales usados para la preparación de la mezcla de reacción.

Para cada uno de los tratamientos aplicados, tras el almacenamiento en refrigeración, los lotes de 9 pellas de brócoli (uno para cada muestra y día de almacenamiento) fueron divididos en tres grupos de 3 pellas, analizándose uno de ellos inmediatamente después del almacenamiento en refrigeración. Los otros dos grupos de 3 pellas se analizaron respectivamente tras 2 y 4 días de vida útil a 20 °C, simulando las prácticas comerciales.

Por lo tanto, para todos los análisis se utilizaron 3 pellas de brócoli (por cada tratamiento y día de muestreo). Las determinaciones de la apariencia externa, pérdida de peso, firmeza y color, se realizaron con la pella completa para cada día de almacenamiento y para cada tratamiento. Después, se floretearon y se prepararon varios homogeneizados para determinar el contenido de sólidos solubles. El resto de los floretes obtenidos se congelaron a -80 °C para realizar posteriormente el análisis de los compuestos funcionales así como de la actividad antioxidante.

3.1.2.3.- Mantenimiento de la calidad y de los compuestos funcionales del brócoli 'Parthenon' almacenado mediante envasado en atmósfera modificada

Las plantas de brócoli 'Parthenon' utilizadas en este ensayo fueron cultivadas en una finca comercial en Foggia (Italia) de acuerdo al estándar de prácticas culturales de la zona. Las plantas se cosecharon durante la última semana de noviembre de 2010, en su madurez comercial y con el apropiado índice de calidad. Las muestras se transportaron rápidamente al Laboratorio de Postcosecha de la Universidad de Foggia, donde fueron seleccionadas, descartando las plantas dañadas, y pesadas para saber la cantidad de partida.

Las pellas se floretearon y aproximadamente 250 g de floretes de brócoli fueron envasados en bolsas de polipropileno microperforado de 30 µm de espesor, con un tamaño de 25 cm x 25 cm, obteniéndose así 54 bolsas de producto, que fueron divididas en tres lotes de muestras:

1. Muestra fresca: 6 bolsas sin sellar fueron analizadas en mismo día de experimento (día 0).

2. Muestra control: 24 bolsas sin sellar se almacenaron a 5 °C para su análisis los días 3, 6, 9 y 12.
3. Muestra en atmósfera modificada (AM): 24 bolsas fueron selladas usando una selladora Tecnovac T720 (Tecnovac, Srl, Grassobbio, Italia), aplicándoles antes una inyección de gases para conseguir, en el equilibrio, una atmósfera modificada con 5% de CO₂ y 10% de O₂ en el interior de cada bolsa sellada (Figura 3.6). A continuación, se almacenaron a 5 °C durante 3, 6, 9 y 12 días.



Figura 3.6: Bolsa de floretes de brócoli.

Así, para llegar a la composición de atmósfera modificada deseada, 5% de CO₂ y 10% de O₂, dentro de las bolsas selladas, se utilizó la siguiente ecuación propuesta por González et al. (2008) y Massey (2003):

$$\text{Permeabilidad} = \frac{R \times t \times P}{A \times (\Delta G)}$$

donde:

La permeabilidad vendrá dada como mL de CO₂ o de O₂/ m² x día (valor por mil).

R = tasa de respiración (producción de CO₂ o consumo de O₂ en mL/ Kg x día, respectivamente).

t = espesor del film (μm).

P = peso del producto envasado (Kg).

A = área del film, es decir, dimensiones de la bolsa (m^2).

ΔG = diferencia entre la concentración de gases inicial y final (para el O_2 y el CO_2 , respectivamente) dentro de la bolsa (en tanto por 1).

Por lo tanto, se dispuso de 6 bolsas de producto para realizar los diferentes análisis en cada fecha de muestreo y para cada tratamiento. Parte de los análisis se realizaron sobre la muestra en fresco, congelándose a $-80\text{ }^\circ\text{C}$ cuando fue preciso, hasta realización posterior de los análisis de calidad funional.

3.2.- Métodos

3.2.1.- Tasa respiratoria

La tasa de respiración, expresada como la producción de dióxido de carbono en $mL\ CO_2/kg \times h$, se midió por triplicado utilizando un sistema dinámico (Kader, 2002) (Figura 3.7).

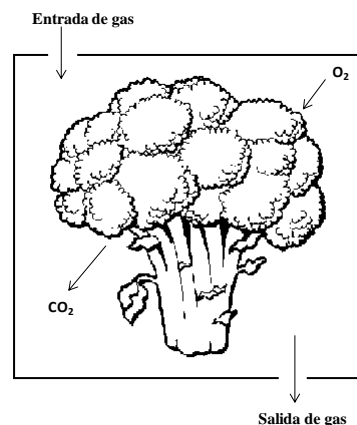


Figura 3.7: Sistema dinámico, con la muestra en un contenedor cerrado con entrada y salida de gases.

Este sistema consiste en encerrar, un peso determinado de muestra, en contenedores cerrados que poseen dispositivos de entrada y de salida de gases. Al ser un sistema dinámico, la muestra se somete a un flujo de gases de concentración conocida, en nuestro caso aire (para las muestras control) y $10\% CO_2$ - $5\% O_2$ y $5\% CO_2$ - $10\% O_2$ (para las muestras en atmósfera modificada en la inyección inicial y en el equilibrio, respectivamente). Una vez que el flujo se estabiliza y se conoce su velocidad ($mL/hora$), determinada mediante el medidor de flujo portátil Agilent ADM 2000 (Agilent

Technologies, Waldbronn, Alemania), se recogen 0,1 mL de gas a la salida y a la entrada de cada frasco o contenedor, y se inyectan en un cromatógrafo de gases Shimadzu modelo 17A (Shimadzu, Kyoto, Japón) equipado con un detector de conductividad térmica a 230 °C, estando el inyector a 120 °C y utilizando He como gas portador. La separación cromatográfica de dióxido de carbono se realizó en una columna capilar 19091J-413, HP-5 (0,25 µm, 30 m x 0,32 mm) de Agilent Technologies (Waldbronn, Alemania), con un flujo de columna de 7 mL/min, con una temperatura en el horno de 180 °C.

Para el cálculo de la tasa respiratoria se utilizó la siguiente fórmula, propuesta por Kader (2002), donde el % CO₂ dentro del recipiente, y por tanto el producido por la muestra, se calculó como la diferencia entre el % CO₂ salida y el % CO₂ de entrada del contenedor, teniendo en cuenta en todo caso, que para relacionar las áreas cromatográficas con el porcentaje, se utilizó un patrón externo de concentración de CO₂ conocida (0,1%).

$$\text{mLCO}_2/\text{kg} \times \text{h} = \frac{\% \text{CO}_2 \times \text{Flujo (mL/h)}}{100 \times \text{Peso (Kg)}}$$

3.2.2.- Composición de gases de la atmósfera modificada

Las concentraciones de CO₂ y O₂ en el interior de las bolsas, usadas para el almacenamiento de floretes de brócoli en atmósfera modificada, fueron medidas por triplicado utilizando un analizador de gases MAPY 4.0 (Witt Italia Srl, Solza, Italia). Un septum de silicona pegado en la superficie de la bolsa permite tomar la medida dentro de las bolsas sin que haya pérdida de gases. Los resultados se expresaron como porcentaje de O₂ y CO₂ en el interior de las bolsas.

3.2.3.- Permeabilidad de un film plástico

Para medir la permeabilidad al CO₂ y al O₂ del film plástico usado, polipropileno microperforado de 30 µm, se utilizó un medidor manométrico de permeabilidad Lissiy L100-5000 (M. Penati Strumenti, srl, Pioltello, Italia). La medida

se realizó a la temperatura de almacenamiento durante el ensayo (5 °C) y los resultados fueron expresados en mL del gas/m² x día, después de utilizar un plástico de referencia con las medidas de permeabilidad estandarizadas y conocidas.

3.2.4.- Apariencia externa y olor

Con el fin de evaluar el almacenamiento en atmósfera controlada y el efecto del envasado en atmósfera modificada de las pellas y floretes de brócoli, respectivamente, la apariencia y el olor del brócoli se evaluaron individualmente en cada día de muestreo, utilizando para ello la escala subjetiva de 5 a 1 descrita también por otros autores como Cantwell y Suslow (1999) y Winkler et al. (2007).

En el caso de la apariencia, se usó una escala compuesta por imágenes (Figura 3.8) y una breve descripción de cada valor de la puntuación, siendo: 5=excelente, sin defectos; 4=muy bueno, defectos de menor importancia; 3=defectos justos, moderados; 2=deficiente, defectos importantes; y 1=no comestible.

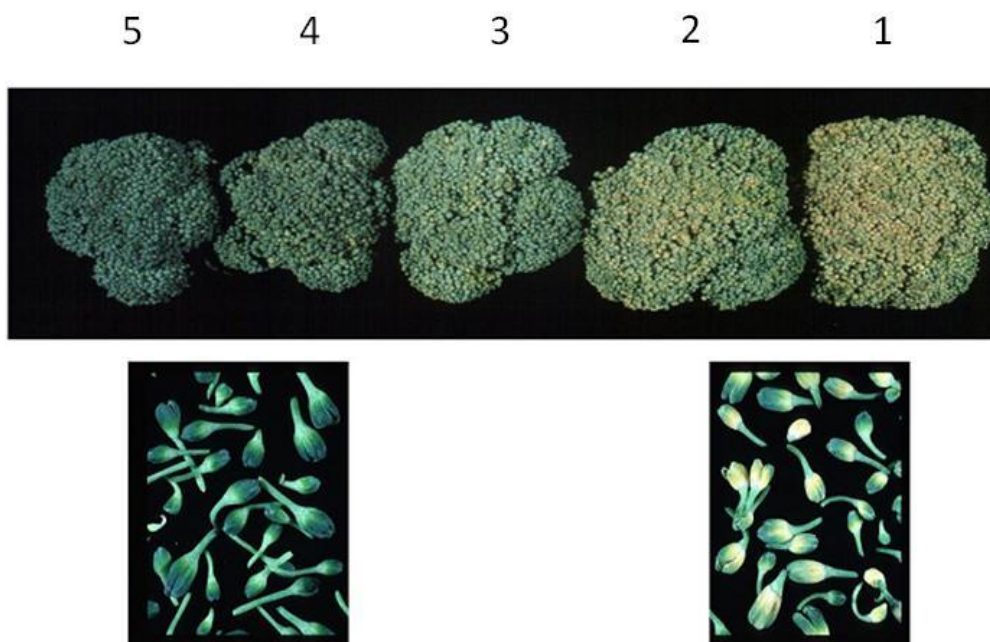


Figura 3.8: Escala numérica de amarilleamiento del brócoli (Cantwell y Suslow, 1999).

En el caso del olor la escala utilizada fue la siguiente: 5=olor típico; 4=ligeramente mal olor; 3=moderado mal olor; 2=fuerte mal olor; y 1=olor de enmohecimiento.

En ambos casos, una puntuación de 3 se considera como límite de comercialización y una puntuación de 2, como límite de comestibilidad (Amodio et al., 2007; Cantwell y Suslow, 1999).

Para el reconocimiento de la aparición de podredumbres en las pellas o floretes de brócoli se hizo en base a la Figura 3.9 propuesta por Cantwell y Suslow (1999).



Figura 3.9: Aparición de podredumbre en brócoli (Cantwell y Suslow, 1999).

3.2.5.- *Parámetros de calidad físico-química*

3.2.5.1.- *Peso y pérdida de peso*

El peso individual de las pellas o cabezas de las brassicas fue tomado el día de la cosecha en una balanza de precisión media o granatario (Mettler-Toledo Classic PB3001-S, Mettler-Toledo, Madrid, España), y se expresó como g/pella.

Para calcular la pérdida de peso producida en las muestras tras los almacenamientos postcosecha realizados (refrigeración, atmósfera controlada, 1-MCP y atmósfera modificada, así como después de un periodo de vida útil a 20 °C) se compararon los pesos obtenidos de las pellas o floretes de brócoli recién cosechados o en fresco, con los obtenidos tras los diferentes tratamientos postcosecha, en los distintos días de muestreo, empleándose para ello la misma balanza y expresándose los resultados en porcentaje o en g/100 g de peso fresco.

3.2.5.2.- *Textura*

La firmeza o compacidad de las pellas de brócoli y de las cabezas de col de Milán se evaluó usando el texturómetro Stable Micro Systems Texture Analyzer TA-XT2i (Aname, Madrid, España) mediante un ensayo de compresión sobre cada pella o

cabeza de brassica. Para ello se aplicó una fuerza para producir una deformación del 2% con un plato de aluminio de 100 mm de diámetro. Las curvas fuerza/deformación se registraron utilizando el programa informático del analizador de textura, obteniéndose así el valor de fuerza máxima en Newtons (N).

Para evaluar el parámetro crujiente de las coles de Milán se utilizó el test de Kramer en el analizador de textura Stable Micro Systems Texture Analyzer TA-XT2i (Aname, Madrid, España) equipado con una celda de Kramer con ranuras para 5 cuchillas y una célula de carga de 30 Kg (Aname, Madrid, España). Para realizar esta prueba, alrededor de 4 g de hojas, de diferentes profundidades de la cabeza de col de Milán, se colocaron en la celda Kramer cortadas con las dimensiones de dicha celda. Una vez que las cuchillas ejercen la fuerza correspondiente, para romper las hojas colocadas en la celda, se obtiene el pico de fuerza máxima (N), expresándose el valor de crujiente como fuerza máxima por peso de muestra (N/g).

3.2.5.3.- Color

Para la medida del color se ha utilizado el espacio de color CIE 1976 L^* , a^* , b^* , CIELab, que es usado normalmente para definir el color de los alimentos y está relacionado con la percepción del ojo humano.

Los tres parámetros en el modelo representan la luminosidad de color (L^* , $L=0$ para el negro y $L^*=100$ para el blanco), su posición entre el rojo y el verde (a^* , valores negativos indican verde, mientras valores positivos indican rojo) y su posición entre amarillo y azul (b^* , valores negativos indican azul y valores positivos indican amarillo).

Las medidas de los parámetros de color (L^* , a^* y b^*) en el espacio CIELab fueron realizadas en un espectrofotómetro Konica Minolta CM-3500d (Aquatecnica, S.A., Madrid, España) usando el iluminante D65, iluminación difusa, 8° de ángulo de visión y un área de medida circular de 30 mm de diámetro. Las medidas fueron tomadas en diferentes localizaciones de cada pella de brócoli y de cada cabeza de col de Milán.

En el experimento de utilización de atmósfera modificada, los parámetros de color (L^* , a^* y b^*) también se obtuvieron en el espacio de color CIELab, pero por elaboración de las imágenes adquiridas por un escáner espectral (Spectral scanner, DV

SRL, Padova, Italia). Las medidas fueron tomadas en la parte superior de cada florete de brócoli (la Zazzera et al., 2010).

3.2.5.4.- *pH*

Para esta determinación, se prepararon, para cada muestra, varios homogeneizados en una batidora-picadora de laboratorio (Moulinex, Madrid, España) utilizando para ello de 20 a 30 hojas frescas de distintas profundidades de cada col de Milán. A continuación, se mezclaron alrededor de 3 g de cada homogeneizado con 60 mL de agua destilada para realizar las medidas de pH en un titrador automático (Mettler Toledo DL50 Rondolino, S.A., Madrid, España).

3.2.5.5.- *Contenido en sólidos solubles*

Para la determinación del contenido en sólidos solubles de las muestras de col de Milán se utilizaron los homogeneizados obtenidos anteriormente. En el caso de las muestras de brócoli, se prepararon varios homogeneizados, para cada muestra, con aproximadamente 10 floretes cada uno de ellos. En ambos casos, los homogeneizados fueron filtrados a través de una gasa para obtener el zumo correspondiente en el que se midió el contenido en sólidos solubles mediante refractometría, usando para ello un refractómetro RE40 (Mettler Toledo, Madrid, España). Los resultados fueron expresados como °Brix.

3.2.5.6.- *Humedad*

Para su determinación, se utilizaron los homogeneizados descritos anteriormente para las muestras de brócoli y col de Milán. Se pesaron unos 5 g de estos homogeneizados en crisoles secos y previamente tarados, realizándose las pesadas en una balanza de precisión o analítica Mettler Toledo AX205 DeltaRange (Mettler Toledo, Greifensee, Suiza). A continuación, se tuvieron en una estufa a vacío VacíoTem-T Selecta (Andaluza de Instrumentación, S.L., Mairena del Aljarafe, Sevilla, España) a 70 °C durante 16 horas, pasado este tiempo se colocaron en un desecador para su enfriamiento, pesándose después y determinando el porcentaje de humedad como diferencia de ambos pesos.

3.2.6.- *Parámetros de calidad funcional*

3.2.6.1.- *Vitamina C*

Para la determinación de la vitamina C se utilizaron dos métodos: el primero consistente en la determinación del contenido en ácido ascórbico (componente principal de la vitamina C); y el segundo método, usado únicamente para las muestras del experimento de atmósfera modificada, consistente en la determinación conjunta de ácido ascórbico y su forma oxidada (ácido dehidroascórbico). A continuación se describen con detalle los dos métodos.

Contenido en ácido ascórbico

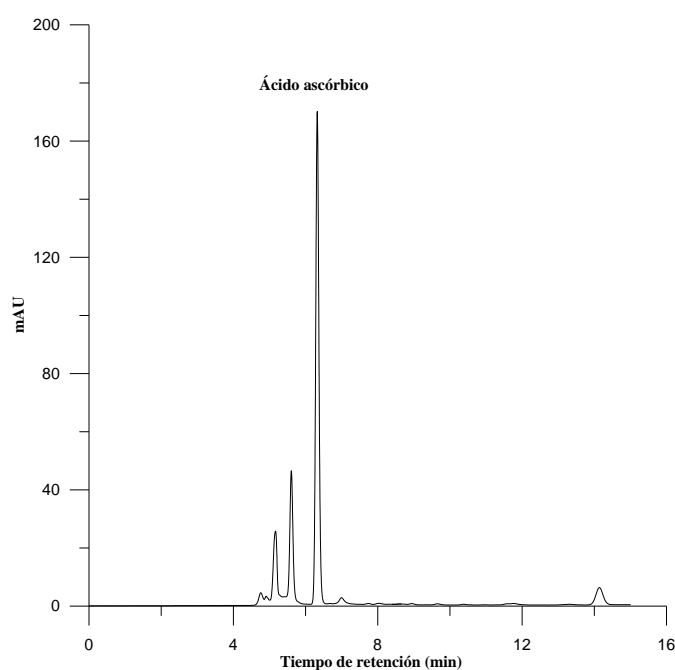
Para la determinación del contenido en ácido ascórbico se utilizó el método descrito por Bernalte et al. (2007) donde, de 3 a 5 g de muestra de brassica fueron homogeneizados en un Omni-Mixer (Omni International, GA, USA) con aproximadamente 20 mL de solución extractora de ácido ortofosfórico al 85% y EDTA al 1%, este homogeneizado se preparó en oscuridad y frío, filtrándose a continuación sobre lana de vidrio y llevándose hasta un volumen final de 100 mL con solución extractora. El EDTA (ácido etilendiaminotretacético) se usa como quelante para ayudar a prevenir que la muestra se oxide. Antes de la inyección en el sistema cromatográfico, la muestra se filtró a través de un filtro de nylon Millipore de 0,45 μm .

La separación e identificación se realizó en un cromatógrafo de líquidos HPLC Agilent 1200 (Agilent Technologies, S.L., Madrid, España) equipado con una columna Zorbax SB-C8 de 5 μm , 250 mm x 4,6 mm, termostatizada a 30 °C. Para la separación cromatográfica se utilizó como fase móvil el tampón ácido acético:acetato sódico (50mM, pH=4), metanol y agua ultrapura MilliQ, siguiendo la elución en gradiente descrita en la Tabla 3.1, con un flujo de 0,5 mL/min y usando volumen de inyección de la muestra de 10 μL .

La detección se llevó a cabo usando un detector de diodo de array (DAD) acoplado al HPLC, usando una $\lambda=260$ nm (Figura 3.10). El contenido en ácido ascórbico de la muestra se determinó por la técnica de patrón externo y los resultados se expresaron como mg ácido ascórbico/100 g peso fresco (pf).

Tabla 3.1: Condiciones de elución en gradiente para la determinación de ácido ascórbico.

Tiempo (min)	% Ácido acético:acetato sódico	% Metanol	% Agua
7	100	0	0
8	0	0	100
10	0	100	0
14	0	100	0
16	0	0	100
19	0	0	100
20	100	0	0
23	100	0	0

**Figura 3.10:** Cromatograma del ácido ascórbico presente en una muestra de brócoli, registrado a 260 nm.

Contenido en ácido ascórbico y dehidroascórbico

Para la determinación conjunta de ácido ascórbico y dehidroascórbico, aproximadamente 5 g de muestra fueron homogeneizados con 10 mL de metanol:agua destilada (5:95) más ácido cítrico (21 g/L) y EDTA (0,5 g/L) en un equipo Ultra Turrax T-18 (IKA, Wilmington, NC, USA) en frío y bajo campana en oscuridad. A continuación el homogeneizado fue filtrado a través de una gasa, ajustándose su pH a 2,2-2,4 con HCl 6N y después se centrifugó a 9000 rpm y 4 °C durante 5 minutos en una centrífuga Thermo (Thermo Scientific, Milán, Italia).

Seguidamente se filtró el sobrenadante a través de un Sep-pak C18 (Waters, Milford, MA, USA) acoplado a un filtro de nylon Millipore de 0,45 μm . Esta determinación del contenido en ácido ascórbico y ácido dehidroascórbico fue realizada siguiendo el método descrito por Zapata y Dufour (1992) con algunas modificaciones (Gil et al., 1999). El análisis cromatográfico se realizó después de la derivatización del ácido dehidroascórbico en el fluoróforo 3-(1,2-dihidroxiethyl)furol[3,4-b]quinoxalina-1-ona (DFQ) con 1,2-fenilendiamina dihidrocloruro (OPDA). Para ello, a 750 μL del extracto obtenido anteriormente se le añadieron 250 μL de OPDA (0,034g/10 mL agua ultrapura) y se incubaron en oscuridad durante 36 minutos. Pasado este tiempo se inyectaron 20 μL de muestra en un HPLC Agilent 1200 (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany), realizándose la separación cromatográfica en una columna Zorbax C18 de 5 μm , 250 mm x 4,6 mm y la detección en DAD a 261 nm para la determinación de ácido ascórbico y a 348 nm para el ácido dehidroascórbico (Figura 3.11). Se utilizó elución isocrática, usando como fase móvil metanol:agua ultrapura MilliQ (5:95, v:v) conteniendo 5 mmol/L de cetrimida y 50 mmol/L de dihidrogenofosfato a pH=4,5. El flujo fue de 1 mL/min. Y el contenido en vitamina C fue expresado como mg ácido ascórbico y dehidroascórbico/100 g pf, utilizando para cada uno su correspondiente recta de calibración por patrón externo.

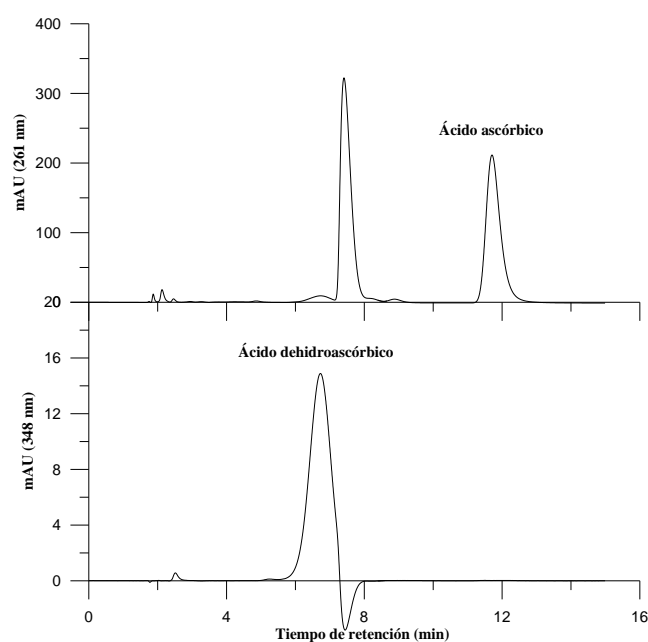


Figura 3.11: Cromatogramas del ácido ascórbico y dehidroascórbico presentes en una muestra de brócoli, registrados a 261 nm y a 348, respectivamente.

3.2.6.2.- Carotenoides

Los pigmentos carotenoides fueron extraídos y determinados mediante el método de Mínguez-Mosquera y Hornero-Méndez (1993) modificado por García et al. (2007). Sobre 10 g de muestra triturada se extrajeron cuatro veces, usando para cada extracción 25 mL de acetona, que posteriormente se eliminó mediante evaporación en rotavapor (Buchi Laboratoy Equipment, Suiza). El extracto seco obtenido se redisolvió en 5 mL de metanol mediante agitación en ultrasonidos (Ultrasons-P, JP Selecta S.A., Barcelona, España) y se sometió a saponificación durante toda la noche usando para ello 100 mL de una disolución de KOH al 20% en metanol. La saponificación se usa para remover clorofilas y lípidos indeseables y para hidrolizar hidroxicarotenoides esterificados con ácidos grasos, liberando así los carotenoides.

Al día siguiente, se añadieron 100 mL de éter etílico y se hicieron varios lavados con agua destilada. Tras los lavados, el extracto hidrofóbico separado se filtró a través de placa filtrante sobre un lecho de sulfato sódico anhidro, para quitar posibles restos de agua. A continuación, el extracto lipofílico obtenido se llevó hasta sequedad en rotavapor (Buchi Laboratoy Equipment, Suiza), eliminándose así todo el éter. A cada extracto seco se le añadieron 5 mL de acetona de grado HPLC para redisolverlo.

El extracto rediseuelto y filtrado a través de un filtro de nylon Millipore de 0,45 μm fue inyectado en un cromatógrafo Agilent 1100 (Agilent Technologies, S.L., Madrid, España) equipado con una columna Agilent Lichrosorb RP-18 de 10 μm , 200 mm x 4,6 mm, termostaticada a 30 °C, y con un detector de diodo de array (DAD) a 460 nm. Como fase móvil se utilizó acetona y agua ultrapura MilliQ, siguiendo la elución en gradiente descrita en la Tabla 3.2. Se usó un flujo de 1 mL/min y un volumen de inyección de 10 μL .

Tabla 3.2: Condiciones de elución en gradiente para la determinación de carotenoides.

Tiempo (min)	% Acetona	% Agua
5	75	25
10	95	5
17	95	5
22	100	0
27	75	25
30	75	25

Se determinaron dos pigmentos carotenoides en las muestras de brassicas analizadas, β -caroteno y luteína (Figura 3.12), se cuantificaron por la técnica de patrón externo y los resultados se expresaron mg β -caroteno/100 g pf y mg luteína/100 g pf, respectivamente. El contenido de carotenoides totales fue dado como suma de ambos compuestos y expresado en mg β -caroteno/100 g pf, puesto que el β -caroteno es el pigmento carotenoide más abundante en las muestras de brassicas estudiadas. Esto pudo hacerse una vez que se comprobó, mediante el método de calibración por mínimos cuadrados parciales (PLS), que las brassicas contenían luteína y no zeaxantina, según los resultados obtenidos en este trabajo y publicados por González-Gómez et al. (2011). Para ello se utilizó el software MATLAB 7.3 (The Math Works Inc., Natick, USA).

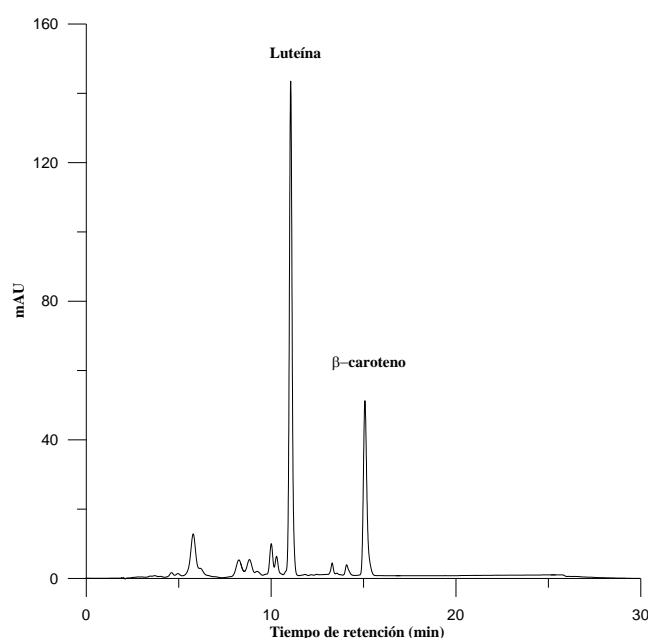


Figura 3.12: Cromatograma de los pigmentos carotenoides presentes en una muestra de brócoli, registrado a 460 nm.

3.2.6.3.- Clorofilas

La extracción de los pigmentos clorofílicos fue realizada siguiendo el método de García et al. (2005). Para ello, se preparó un homogeneizado con 4 g de muestra y 15 mL de acetona usando para ello un Omni Mixer (Omni International, GA, USA). A continuación, los extractos se centrifugaron en una centrífuga Beckman Coulter (Beckman Coulter Inc, CA, USA) durante 15 min a 14000 rpm y 4 °C recogiendo el

sobrenadante. Esta operación se realizó dos veces más, hasta completa decoloración de la muestra, y los sobrenadantes se juntaron y filtraron sobre lana de vidrio llevándolos a un volumen final de 50 mL con acetona. Antes de realizar la medida espectrofotométrica las muestras fueron filtradas por un filtro de nylon Millipore de 0,45 μm . El espectro de absorción fue recogido entre 600 y 700 nm (Figura 3.13) en un espectrofotómetro Shimadzu UV-2450 UV-vis (Shimadzu Corporation, Japón). Las clorofilas A y B fueron determinadas usando el método de calibración de mínimos cuadrados parciales (PLS) utilizando el software MATLAB 7.3 (The Math Works Inc., Natick, USA). Los resultados fueron expresados en mg clorofila A/100g pf y mg clorofila B/100g pf, respectivamente, y como la suma de las dos clorofilas en mg clorofila A/100 g pf, ya que es la clorofila A el pigmento clorofílico más abundante.

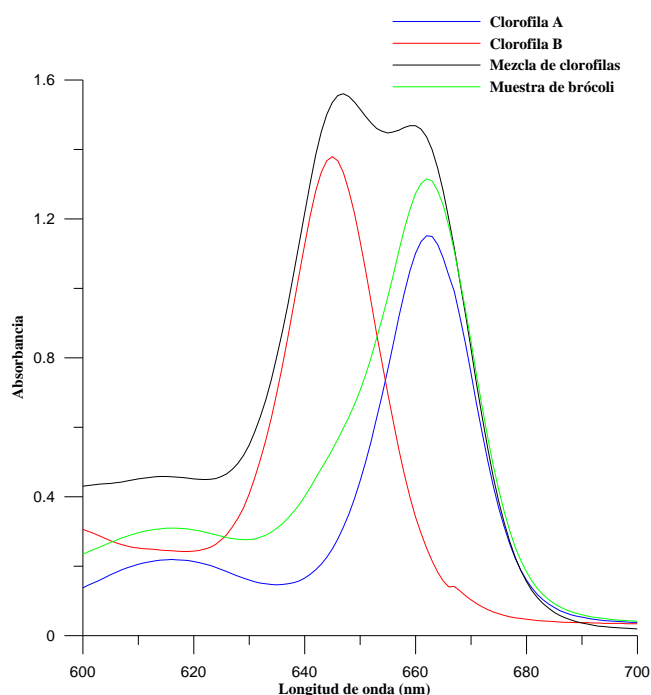


Figura 3.13: Espectros de absorción de patrones de clorofila A, B y mezcla de ambas, así como de una muestra de brócoli, registrados de 600 a 700 nm.

3.2.6.4.- Compuestos fenólicos

Para la determinación del contenido en compuestos fenólicos se utilizaron dos métodos: el primero, usado en la mayor parte de los experimentos, en el que se determinó tanto el contenido fenólico total como el contenido individual de los

compuestos fenólicos más abundantes; y el segundo, usado únicamente para las muestras del experimento de atmósfera modificada en el que solamente se determinó el contenido fenólico total. A continuación se detallan los dos procedimientos analíticos.

Determinación del contenido fenólico total y de los compuestos fenólicos individuales

La determinación del contenido fenólico total se realizó de acuerdo con el método de Lima et al. (2005), donde sobre un peso determinado de muestra (1 ó 5 g, según la muestra de partida estuviera o no liofilizada) se extrajeron con 30 mL de solvente (80% de etanol acuoso con un 1% de HCl concentrado), manteniéndose en agitación durante 20 min, en ausencia de luz y a temperatura ambiente (25 °C), filtrándose a continuación. El proceso de extracción fue repetido tres veces. Los extractos etanólicos se juntaron, se evaporaron y se reconstituyeron hasta un volumen final de 100 mL con agua ultrapura. El contenido total de fenoles fue medido espectrofotométricamente a 760 nm (Bernalte et al., 2007) usando el reactivo de Folin-Ciocalteu (Singleton y Rossi, 1965). Para ello una alícuota de muestra, de 0,5 a 1 mL, se hizo reaccionar con 1 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu, 2 mL de carbonato sódico (al 20% en agua destilada) y agua ultrapura hasta enrase a 20 mL, dándose así la reacción, que fue medida a 760 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV-2450 UV-vis (Shimadzu Corporation, Japón) después de 1 hora aproximadamente en oscuridad. En esta reacción el reactivo de Folin-Ciocalteu, inicialmente de color amarillo, se reduce por la acción de los compuestos fenólicos que son antioxidantes, pasando a color azul, permitiendo así su determinación espectrofotométrica. Los resultados fueron expresados como mg de ácido clorogénico equivalente/100 g pf, una vez realizada la calibración por patrón externo.

Para la determinación de los compuestos fenólicos individuales se utilizaron los extractos etanólicos obtenidos después de la hidrólisis ácida y que, por tanto, contenían las agliconas de dichos compuestos. Estos extractos fueron filtrados a través de un filtro de nylon Millipore de 0,45 µm, inyectándose a continuación 10 µL en un cromatógrafo de líquidos Varian 212-LC (Varian Ibérica SL, Madrid, España) acoplado a un espectrómetro de masas de trampa de iones Varian 500-MS (Varian Ibérica SL, Madrid, España). La separación por HPLC se realizó en una columna Pursuit C18 de 3 µm, 150 mm x 2,0 mm, termostaticada a 40 °C y se utilizó un gradiente de elución similar al

propuesto por Vallejo et al. (2002) (Tabla 3.3), utilizando como fase móvil una mezcla de agua ultrapura Milli Q:ácido fórmico (99:1, v:v) y metanol calidad LC-MS, con un flujo de 200 μ L/min.

Tabla 3.3: Condiciones de elución en gradiente para la determinación de compuestos fenólicos.

Tiempo (min)	% Agua:ácido fórmico	% Metanol
0	90	10
5	85	15
20	70	30
35	50	50
40	10	90
45	90	10

Para la identificación de las agliconas, antes de inyectar las muestras, los parámetros del espectrómetro de masas fueron optimizados mediante la infusión directa de los estándares. Los diferentes parámetros fueron optimizados para alcanzar las señales máximas para los iones precursores y para los fragmentos de iones durante el proceso MS/MS (Tabla 3.4) obteniéndose así, las condiciones de trabajo óptimas para esta determinación en modo SIM (monitorización selectiva de iones).

Tabla 3.4: Parámetros del espectrómetro de masas ajustados para los patrones usados.

Patrones	Ventana de tiempo (min)	Ion precursor (m/z)	Iones de fragmentación (m/z)	Polaridad	Voltaje del capilar (voltios)	Carga de radiofrecuencia (%)	Amplitud de excitación (voltios)
Ácido gálico	0-25	169	125, 85	Negativa	47	96	1,23
Ácido clorogénico	0-25	353	191, 163	Negativa	43	82	0,88
Ácido sinápico	0-25	223	208, 164, 149, 179	Negativa	45	58	1,83
Quercetina	25-45	303	229, 257, 165	Positiva	115	90	1,55
Kaempferol	25-45	287	213, 241, 165	Positiva	110	85	1,60

Antes se ajustó también el sistema de ionización por electrospray (ESI), obteniéndose los siguientes valores de los parámetros optimizados: 5000 voltios de voltaje de aguja; 600 voltios de placa del aerosol o fragmentador; 50 psi de presión del gas nebulizador (N_2); 25 psi de presión del gas de secado (N_2) y 250 °C de temperatura del gas de secado (N_2).

Así pues, con estas condiciones óptimas, en las muestras de brassicas estudiadas se identificaron tres derivados de ácidos fenólicos (ácido gálico, ácido clorogénico y ácido sinápico) y dos flavonoides (quercetina y kaempferol) (Figura 3.14). Para la cuantificación, se utilizaron las rectas de calibración por patrón externo de cada compuesto, expresándose los resultados en mg/100 g pf para cada uno de ellos.

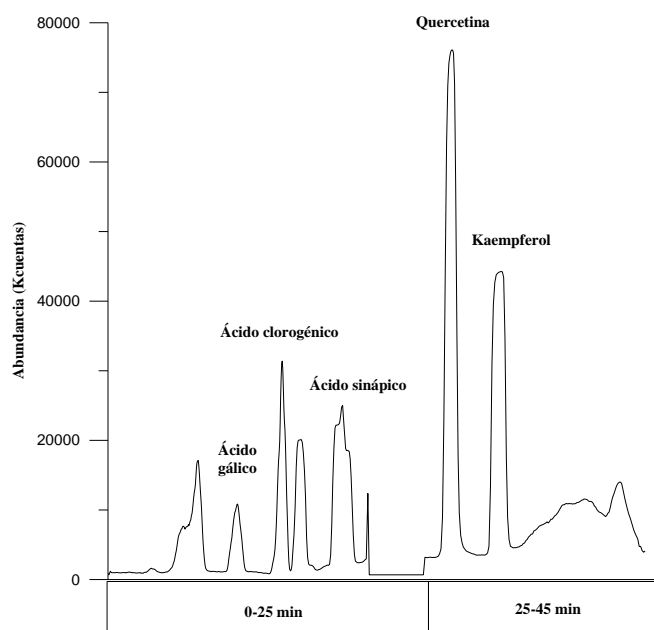


Figura 3.14: Cromatograma de masas en modo SIM de los compuestos fenólicos presentes en una muestra de brócoli.

Determinación del contenido fenólico total

Aproximadamente 3 g de brócoli se homogeneizaron en un Ultra Turrax T-18 (IKA, Wilmington, NC, USA) durante 1 minuto con 20 mL de medio de extracción (disolución 2mM de fluoruro sódico en metanol:agua destilada (80:20, v:v). El homogeneizado se centrifugó durante 5 min a 9000 rpm y 5 °C en una centrífuga Thermo (Thermo Scientific, Milán, Italia). El sedimento se desechó y el sobrenadante se conservó y utilizó como extracto.

El contenido fenólico total se determinó de acuerdo con el método de Singleton y Rossi (1965). Donde, 100 μ L de cada extracto obtenido se mezclaron con 1,58 mL de agua destilada, 100 μ L de reactivo de Folin-Ciocalteu y 300 μ L de solución de carbonato sódico en agua destilada (200 g/L). Después de 2 horas en oscuridad se produjo la

reacción y la absorbancia obtenida se midió a 725 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV-1700 (Shimadzu Corporation, Jiangsu, China). En base a la curva de calibración por patrón externo, los resultados obtenidos se expresaron como mg de ácido clorogénico equivalente/100 g pf.

3.2.6.5.- *Glucosinolatos intactos*

Los glucosinolatos intactos (glucosinolatos sin desulfatar) fueron extraídos siguiendo el método de Kiddle y Vallejo (Kiddle et al., 2001; Vallejo et al., 2003b) con ligeras modificaciones realizadas por nuestro grupo (Fernández-León et al., 2011b). Donde, sobre un peso determinado de muestra (0,2 ó 2 g según la muestra de partida estuviera o no liofilizada) se homogeneizaron en un Utra Turrax T-10 (IKA, Alemania) con 7 mL de una solución de metanol calidad LC-MS:agua ultrapura MilliQ (70:30, v:v) y se mantuvieron tapados y en agitación durante 15 min en un baño termostatzado (Selecta Unitronic OR, JP Selecta S.A., Barcelona, España) con agua a 70 °C para inactivar la enzima mirosinasa (Moreno et al., 2006). Los extractos obtenidos fueron filtrados por lana de vidrio para purificar las muestras y después por un filtro de nylon de Millipore de 0,45 µm antes de la inyección en el cromatógrafo de líquidos Varian 212-LC (Varian Ibérica SL, Madrid, España) que se encuentra acoplado a un detector de masas de trampa de iones Varian 500-MS (Varian Ibérica SL, Madrid, España).

La separación cromatográfica se realizó usando una columna Pursuit C18 de 3 µm, 150 mm x 2,0 mm, termostatzada a 40 °C y un volumen de inyección de 10 µL. Se utilizó una disolución al 0,1% de ácido fórmico en agua ultrapura MilliQ y metanol calidad LC-MS como fase móvil, utilizando el gradiente de elución descrito en la Tabla 3.5 y usando un flujo de 200 µL/min.

Tabla 3.5: Condiciones de elución en gradiente para la determinación de glucosinolatos intactos.

Tiempo (min)	% Disolución al 0,1% de ácido fórmico	% Metanol
0	100	0
15	85	15
20	60	40
25	50	50
30	100	0

Previamente a la inyección de la muestra, las condiciones del espectrómetro de masas fueron optimizadas por infusión directa de una solución patrón de sinigrina, obteniéndose la máxima abundancia con las señales del ión precursor de m/z 358 ($[M-H]^-$) y del ión de fragmentación m/z 97 ($[SO_3H]^-$) (Figura 3.15) según lo descrito por Tian et al. (2005). Obteniéndose en nuestro caso, los siguientes valores de los parámetros optimizados para el espectrómetro de masas: polaridad negativa, 75 voltios de voltaje de capilar, rango de masas (m/z) de 90 a 480 y carga de radiofrecuencia (RF) de 118%.

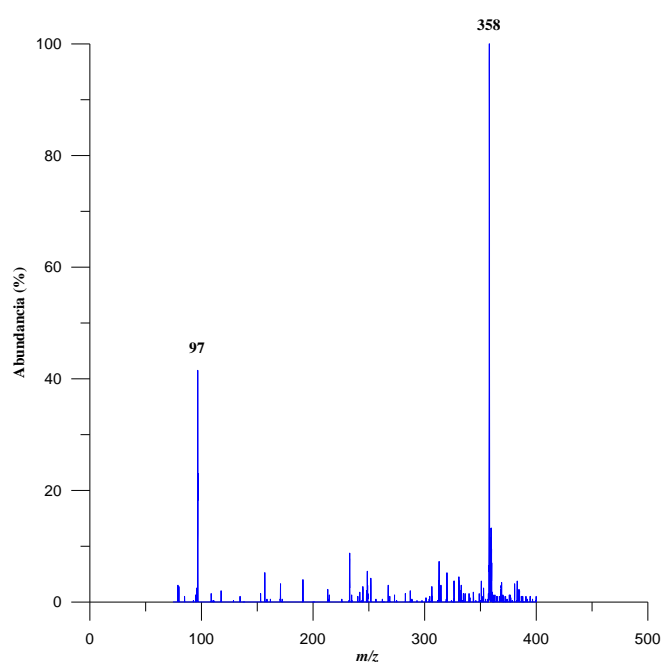


Figura 3.15: Espectro de masas del ión precursor (m/z 358) y del ión de fragmentación (m/z 97) en una muestra patrón de sinigrina.

También se optimizaron las condiciones del sistema de ionización por electrospray (ESI) con el patrón de sinigrina, en este caso los parámetros optimizados fueron: 5000 voltios de voltaje de aguja; 600 voltios de placa del aerosol o fragmentador; 50 psi de presión del gas nebulizador (N_2); 25 psi de presión del gas de secado (N_2) y 250 °C de temperatura del gas de secado (N_2).

Con estas condiciones optimizadas del espectrómetro de masas se pudieron detectar e identificar, en modo Full Scan (barrido completo del espectro), 13 glucosinolatos intactos (Figura 3.16).

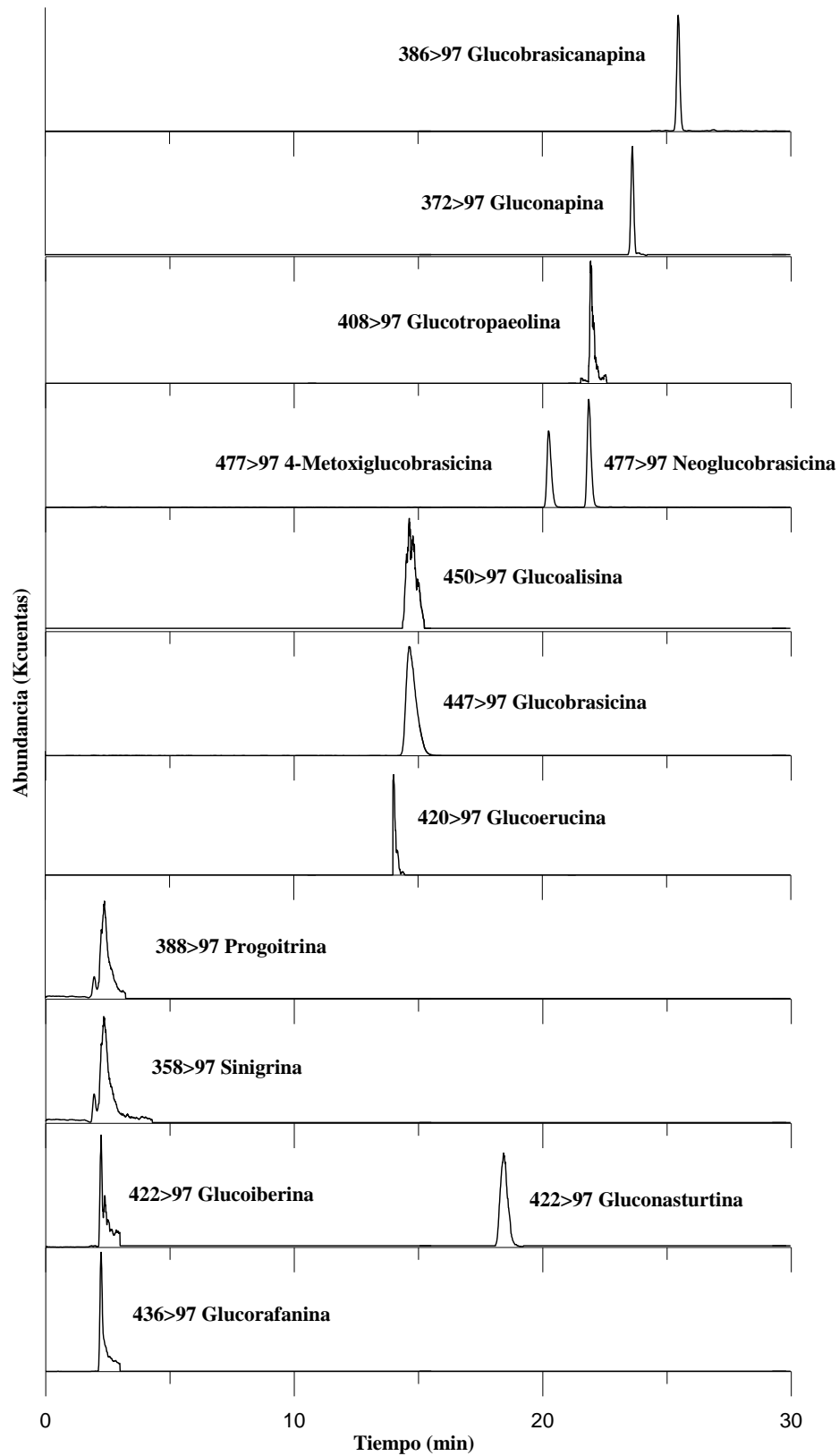


Figura 3.16: Cromatogramas, de las masas extraídas en modo Full Scan, de los glucosinolatos intactos presentes en una muestra de brócoli.

Estos 13 glucosinolatos fueron clasificados en tres grupos o familias químicas:

1. Glucosinolatos alifáticos:
 - a. Alquílicos: glucorafanina (436>97), glucoiberina (422>97), glucoalisina (450>97) y glucoerucina (420>97).
 - b. Alquenílicos: sinigrina (358>97), gluconapina (372>97) y glucobrasicanapina (386>97).
 - c. Hidroxialquenílicos: progoitrina (388>97).
2. Glucosinolatos indólicos: glucobrasicina (447>97), 4-metoxiglucobrasicina (477>97) y neoglucobrasicina (477>97).
3. Glucosinolatos aromáticos: gluconasturtina (422>97) y glucotropaeolina (408>97).

La cuantificación se realizó por el método de patrón externo usando sinigrina como estándar y expresando los resultados como μ moles sinigrina equivalente/100g pf o como mg sinigrina equivalente/100 g pf. Los glucosinolatos intactos totales fueron calculados como suma de todos ellos y expresados de la misma forma que los individuales (Fernández-León et al., 2011b).

3.2.6.6.- Actividad antioxidante

Se utilizaron dos métodos para la determinación de la actividad antioxidante, según el radical cromóforo usado para la reacción. En la mayor parte del trabajo desarrollado se empleó el ABTS (2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (Figura 3.17A), mientras que en los análisis realizados sobre el brócoli en atmósfera modificada se empleó DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) (Figura 3.17B). A continuación se describen los dos métodos detalladamente.

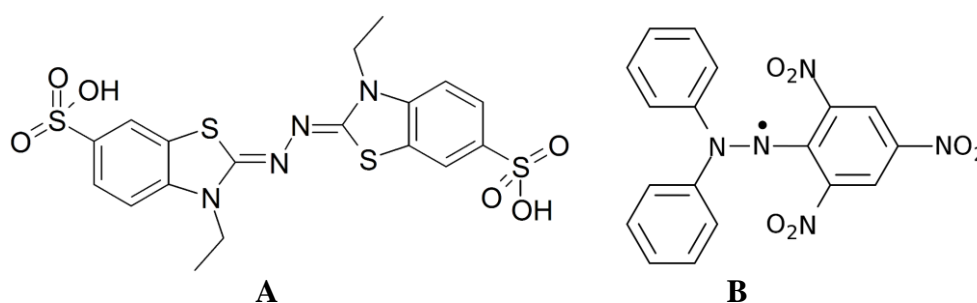


Figura 3.17: Estructura química del ABTS (A) y del DPPH (B).

Determinación de la actividad antioxidante usando ABTS

En este caso se siguió el método descrito por Cano et al. (1998), basado en la caída de absorbancia que provoca un compuesto antioxidante al radical cromóforo ABTS (Figura 3.17A), estable en una disolución de tampón fosfato 50 mM (pH 7,5), peróxido de hidrógeno 0,1 M y enzima peroxidasa tipo VI. El componente antioxidante es la muestra objeto de estudio, de la que se toman 20 μ L (una vez que 1 g de muestra triturada fue homogeneizada con 10 mL de tampón fosfato) que se hacen reaccionar durante 20 minutos sobre 1 mL de ABTS, utilizando para ello un fotómetro de microplacas Thermo Scientific Appliskan (Thermo Fisher Scientific, Madrid, España) a 750 nm o un espectrofotómetro Shimadzu UV-2450 UV-vis (Shimadzu Corporation, Japón) a 730 nm.

La cuantificación se llevó a cabo a partir de la recta de calibrado usando como patrón externo Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico) (Figura 3.18). El Trolox es un compuesto de alta capacidad antioxidante, análogo a la vitamina E, que permite medir capacidad antioxidante. Los resultados se expresaron en mg Trolox/100 g pf.

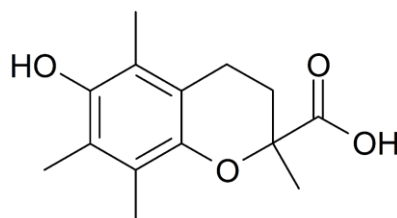


Figura 3.18: Estructura química del Trolox.

Determinación de la actividad antioxidante usando DPPH

Aproximadamente 3 g de brócoli se homogeneizaron en un Ultra Turrax T-18 (IKA, Wilmington, NC, USA) durante 1 minuto con 20 mL de medio de extracción (disolución 2mM de fluoruro sódico en metanol:agua destilada (80:20, v:v). El homogeneizado se centrifugó durante 5 min a 9000 rpm y 5 °C en una centrífuga Thermo (Thermo Scientific, Milán, Italia). El sedimento se desechó y el sobrenadante se conservó y utilizó como extracto.

La determinación del valor de actividad antioxidante en este caso, se realizó siguiendo el método descrito por Brand-Williams et al. (1995) con ligeras modificaciones. Donde, a 50 μ L de extracto, se le añadieron 0,95 mL de una disolución difenilpicrilhidrazilo (DPPH) (Figura 3.17B) para iniciar la reacción. La absorbancia se leyó espectrofotométricamente a 515 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV-2450 UV-vis (Shimadzu Corporation, Japón), después de 30 minutos en oscuridad. El Trolox (Figura 3.18) fue utilizado como el estándar de medición por patrón externo y expresando por tanto, el valor de la actividad antioxidante en mg de Trolox/100 g pf.

3.2.7.- Parámetros de calidad y validación de métodos

Los parámetros de calidad analíticos, tales como el coeficiente de determinación (R^2), el límite de detección (LOD) y el límite de cuantificación (LOQ) se calcularon para cada método analítico propuesto en este trabajo mediante la aplicación del software ACOC propuesto por Espinosa-Mansilla et al. (2005). También se utilizó este software para los cálculos correspondientes a la validación de métodos (% recuperación, repetitividad, precisión).

Para determinar la recuperación de los procedimientos de extracción utilizados para cada grupo de compuestos funcionales determinados por cromatografía, se extrajeron diferentes soluciones estándar siguiendo los procedimientos analíticos correspondientes descritos anteriormente. Para cada uno de los analitos, se compararon las áreas de pico o concentraciones obtenidas por cromatografía de las disoluciones patrones antes y después de la extracción correspondiente.

Todos los patrones usados en las determinaciones descritas fueron adquiridos de Sigma-Aldrich SA., Madrid, España, excepto los de pigmentos carotenoides que fueron suministrados por Extrasynthese, Lyon, Francia.

Los reactivos tanto de calidad HPLC, LC-MS como de análisis fueron adquiridos de Panreac Química S.L.U., Barcelona, España.

El agua destilada y ultrapura MilliQ fueron obtenidas de un equipo Millipore, y al igual que los filtros de nylon de 0,45 μ m fueron suministrados por Millipore Iberica, S.A.U., Madrid, España.

3.2.8.- *Análisis estadístico*

Para el estudio estadístico se utilizó el programa SPSS 15.0 (SPSS Inc. Chicago, IL, USA). Los datos fueron expresados como media \pm desviación estándar de seis análisis y muestras independientes.

En el caso de los resultados de caracterización de brassicas, los valores de las medias fueron analizados por el test de Student para comprobar la existencia de diferencias significativas entre ellos.

En el resto de los experimentos, los valores obtenidos fueron analizados usando el análisis de la varianza de una vía (ANOVA). Cuando el ANOVA detectó diferencias significativas entre los valores, las medias fueron comparadas usando el test de Tukey HSD ($p < 0,05$).

Para estimar la correlación entre los parámetros estudiados se usó el test de Pearson a $p < 0,05$ y a 0,01 como niveles de significación.

4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral fueron divididos en dos partes: una primera parte de caracterización físico-química y funcional de dos tipos de brassicas, brócoli y col de Milán; y una segunda parte de aplicación de técnicas postcosecha al brócoli ‘Parthenon’, así como el estudio de la evolución de los parámetros de calidad físico-química y funcional a lo largo del almacenamiento.

4.1.- Caracterización físico-química y funcional de brassicas. Discusión general

En este apartado se discutirán de forma general los resultados de calidad físico-química y funcional de las brassicas estudiadas en este trabajo. Estos resultados han sido publicados, o enviados para su publicación, en revistas indexadas, y se exponen después de esta discusión general en cuatro secciones, correspondientes a los cuatro artículos elaborados 4.1. a, 4.1.b, 4.1.c y 4.1.d.

La variación en los parámetros de calidad físico-química y funcional es causada por muchos factores, entre los que cabe destacar: cultivar, condiciones ambientales y de cultivo, desarrollo y momento de cosecha y manejo postcosecha (Vallejo et al., 2002). Sin embargo, en este trabajo se va a tener solo en cuenta la variable cultivar, puesto que tanto los brócolis como las coles de Milán fueron producidos bajo las mismas condiciones ambientales y de cultivo, siendo cosechados en febrero y diciembre del 2009 respectivamente, en un estado de desarrollo y madurez óptimos.

4.1.1.- Parámetros de calidad físico-química

Como se observa en la Tabla 4.1 existen diferencias significativas entre los parámetros físico-químicos estudiados, excepto para la firmeza o compacidad de la pella (en caso del brócoli) o la cabeza o pella (en caso de la col de Milán). Este parámetro es utilizado como medida de calidad para saber si dichas brassicas tienen la madurez apropiada (Cantwell y Suslow, 1999; Cantwell y Suslow, 2005).

El porcentaje de humedad, como se observa en la Tabla 4.1, estuvo para las dos brassicas alrededor de un 90% y el contenido en sólidos solubles entre 6 y 10 °Brix, lo normal para los productos vegetales frescos. También se observó que el peso medio por

cabeza fue mayor para las coles de Milán que para los brócolis, siendo por tanto las coles piezas de mayor calibre y tamaño.

A parte de la compacidad, el color (Tabla 4.1) es también un parámetro de calidad muy a tener en cuenta en estos vegetales (Cantwell y Suslow, 1999; Cantwell y Suslow, 2005). Para la determinación del color se usó el espacio de color CIELab, que es utilizado normalmente para describir todos los colores que puede percibir el ojo humano (Figura 4.1).

Tabla 4.1: Parámetros de calidad físico-química de dos cultivares de brócoli y col de Milán.

Parámetros	Brócoli		Col de Milán	
	‘Parthenon’	‘Mónaco’	‘Dama’	‘Leticia’
Peso ¹	538,94±37,99b	526,47±55,45b	1620,24±147,59a	1722,10±180,19a
Firmeza ²	44,78±13,26a	50,24±10,61a	56,76±5,63a	55,67±7,19a
L*	34,45±1,73b	30,39±1,49b	62,63±4,68a	59,39±3,43a
a*	-5,59±0,61b	-3,84±0,52a	-10,69±0,22d	-9,36±0,72c
b*	12,77±0,79b	11,38±1,87b	30,55±1,66a	30,75±2,31a
Humedad ³	87,92±0,06b	89,00±0,29a	88,80±0,05a	88,00±0,12b
CSS ⁴	9,33±0,10b	9,49±0,25b	6,93±0,20c	9,84±0,14a

¹Expresado como g/pella o cabeza.

²Expresado como Newton.

³Expresado como porcentaje.

⁴CSS: contenido en sólidos solubles expresado como °Brix.

Misma letra en la misma fila significa que no existen diferencias significativas entre valores (p<0,05).

Los tres parámetros de color CIELab representan la luminosidad de color (L*, L=0 negro y L=100 blanco), su posición entre rojo y verde (a*, valores negativos indican verde, mientras que valores positivos indican rojo) y su posición entre amarillo y azul (b*, valores negativos indican azul y valores positivos indican amarillo). Por lo tanto, y como se observa en la Figura 4.1, los cultivares de brócoli presentaron un color verde-azulado mientras que los de col de Milán presentaron tonalidad verde-amarillenta, como era de esperar para este tipo de brassicas.

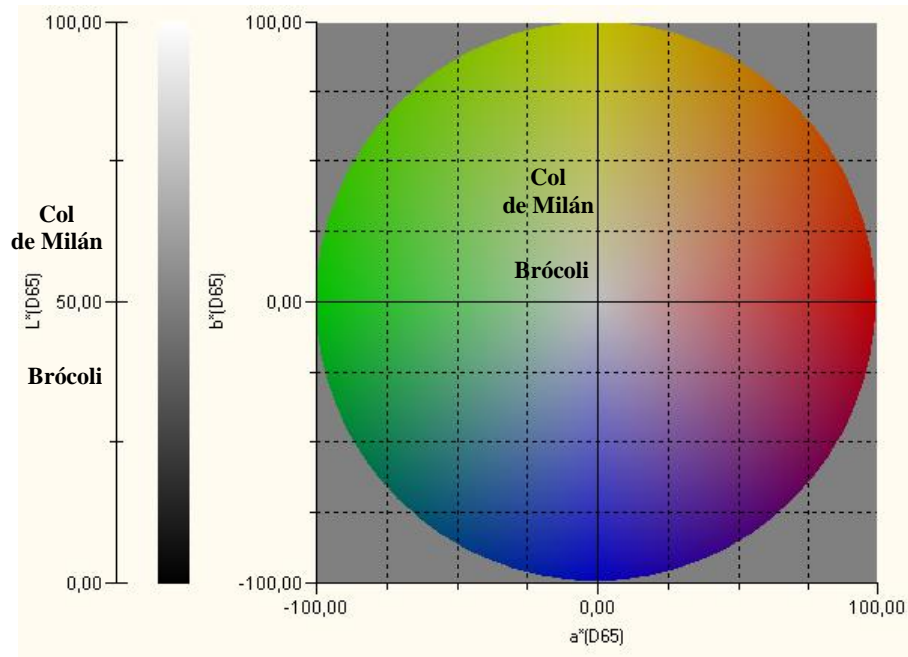


Figura 4.1: Espacio CIELab para las muestras de brócoli y col de Milán.

4.1.2.- Parámetros de calidad funcional

Los datos obtenidos para los parámetros funcionales, evaluados para las dos brassicas, se muestran en la Tabla 4.2. Observándose, que el contenido más elevado de ácido ascórbico fue encontrado en el brócoli ‘Parthenon’ (64,19 mg ac. ascórbico/100 g peso fresco de muestra (pf)). El contenido en ácido ascórbico, y por tanto de vitamina C, en las brassicas varía significativamente entre y dentro de las subespecies (Podsedeck, 2007).

Más del 85% de la vitamina C consumida en la dieta humana procede de frutas y hortalizas (Lee y Kader, 2000). La función biológica del ácido ascórbico puede ser definida como un cofactor enzimático que actúa evitando la oxidación celular (Davey et al., 2000). Por lo tanto, el ácido ascórbico está correlacionado con la actividad antioxidante ($r=0,598$, $p<0,05$) (Tabla 4.3), por lo que el mayor valor de ésta también fue encontrado en el brócoli ‘Parthenon’ (104,79 mg Trolox/100 g pf).

Para la determinación de las clorofilas y de los carotenos se utilizó el método quimiométrico de mínimos cuadrados parciales (PLS). En el caso de las clorofilas, este método fue aplicado a las señales espectrofotométricas conjuntas obtenidas por la clorofila A y la clorofila B, para cuantificar de forma individual las dos clorofilas

(Fernández-León et al., 2010). Para los carotenoides luteína y zeaxantina, que coeluyen en la separación cromatográfica, el método de calibración PLS fue aplicado a los espectros de absorción registrados en el pico cromatográfico en el que coeluyen los dos carotenoides, para poder así cuantificarlos de forma individual (González-Gómez et al., 2011).

Atendiendo a los resultados obtenidos, se pudo observar que en el caso del brócoli y la col de Milán no presentaban zeaxantina (o presentaban en cantidades trazas) y el pico cromatográfico correspondía solo a la luteína (González-Gómez et al., 2011). Mientras que para las clorofilas, se observó que el contenido en clorofila A era 3 veces superior al de clorofila B en ambas brassicas (Fernández-León et al., 2010). Ambas clorofilas son componentes genuinos de las membranas fotosintéticas y están presentes en una proporción 3:1 (Chen y Chen, 1993) como se ha comprobado en este trabajo experimental. Sin embargo, las condiciones de cultivo y los factores mediambientales pueden modificar esta proporción (Lichtenthaler et al., 1982), por lo que esta relación, clorofila A:clorofila B, en ocasiones se considera un parámetro de calidad para hortalizas verdes como las brassicas.

Una vez cuantificados de forma individual los diferentes carotenoides y clorofilas, se observó que los mayores contenidos de β -caroteno, luteína, clorofila A y clorofila B estaban en los dos cultivares de brócoli (Tabla 4.2). Los valores obtenidos, tanto para el brócoli como para la col de Milán, están comprendidos entre los propuestos por otros autores para estas brassicas (Forney y Riji, 1991; García et al., 2005; Khachik et al., 1986; Kurilich et al., 1999; Murkovic et al., 2000).

Como se observa en la Tabla 4.3 tanto los pigmentos carotenoides como las clorofilas están muy relacionados con los parámetros de color a^* y b^* , con valores próximos a 0,9 salvo para la luteína ($r=0,539$, $p<0,05$ y $r=0,703$, $p<0,01$, para los parámetros a^* y b^* , respectivamente). La correlación es directa entre los pigmentos carotenoides y los parámetros de color a^* y b^* , pero es inversa entre las clorofilas y dichos parámetros de color. Esto es debido a que un aumento en el valor del parámetro a^* indica una disminución del color verde, mientras que un aumento en el valor del parámetro b^* indica un incremento del color amarillo.

Además, como sucedía con los parámetros de color (Tabla 4.3), tanto el β -caroteno, como ambas clorofilas están muy correlacionadas con el valor de actividad antioxidante (con valores próximos a 0,9, $p < 0,01$), mientras que la correlación entre el contenido en luteína y el valor de actividad antioxidante es menor ($r = 0,595$, $p < 0,05$). Esta relación entre los pigmentos carotenoides y las clorofilas con la actividad antioxidante ha sido ya explicada por autores como Lai et al. (1980) y Singh et al. (2007).

Con respecto al contenido fenólico total y al contenido en cada uno de los compuestos fenólicos individuales (Tabla 4.2), se observó que el brócoli ‘Parthenon’ presentaba un contenido mayor. Las concentraciones de compuestos fenólicos obtenidas, para todas las muestras de brassicas estudiadas, estuvieron de acuerdo con las propuestas por USDA/ARS (2007).

Tabla 4.2: Parámetros de calidad funcional de los cultivares de brócoli y col de Milán.

Parámetros	Brócoli		Col de Milán		
	‘Parthenon’	‘Mónaco’	‘Dama’	‘Leticia’	
Ácido Ascórbico ¹	64,19±3,65a	45,24±2,97b	49,06±7,52b	43,69±4,86b	
Actividad Antioxidante ²	104,79±0,39a	92,74±0,86b	56,62±2,72c	43,53±5,02d	
β -Caroteno ¹	0,80±0,03a	0,71±0,09a	0,37±0,05b	0,33±0,08b	
Luteína ¹	0,60±0,01a	0,54±0,09ab	0,18±0,02c	0,48±0,03b	
Clorofila A ¹	9,38±1,17a	8,07±0,74b	2,26±0,18c	1,16±0,02cd	
Clorofila B ¹	3,24±0,42a	3,23±0,39a	0,85±0,04b	0,50±0,01bc	
Contenido Fenólico Total ³	147,15±5,86a	81,55±3,02c	102,71±4,10b	50,00±6,51d	
Ácidos Fenólicos	Ac. Gálico ¹	1,80±0,09a	1,85±0,34a	0,89±0,14b	0,22±0,01c
	Ac. Clorogénico ¹	1,38±0,23a	0,96±0,10b	0,20±0,01d	0,54±0,08c
	Ac. Sinápico ¹	1,25±0,56a	0,64±0,01b	1,59±0,27a	0,46±0,07b
Flavonoides	Quercetina ¹	6,02±0,22a	4,44±0,09b	1,21±0,03c	1,27±0,16c
	Kaempferol ¹	3,29±0,32a	2,28±0,14b	1,47±0,03c	1,45±0,15c

¹ Expresado como mg/100 g peso fresco.

² Expresado como mg Trolox/100 g peso fresco.

³ Expresado como mg de ácido clorogénico equivalente/100 g peso fresco.

Misma letra en la misma fila significa que no existen diferencias significativas entre valores ($p < 0,05$).

Hay que señalar que el contenido de ácido gálico fue significativamente mayor en los dos cultivares de brócoli, el de ácido clorogénico en el cultivar de brócoli

‘Parthenon’ y el de ácido sinápico en brócoli ‘Parthenon’ y col de Milán ‘Dama’. En las brassicas estudiadas hay que destacar su alto contenido en compuestos flavonoides (quercetina y kaempferol fundamentalmente), dichos compuestos fenólicos, según autores como Podsedek (2007), poseen una gran capacidad antioxidante, y por tanto, como queda reflejado en los resultados de los estudios de correlaciones de Pearson (Tabla 4.3), la relación encontrada entre ellos y la actividad antioxidante fue elevada, ($r=0,969$, $p<0,01$). Con lo cual, el alto valor de actividad antioxidante del brócoli ‘Parthenon’ (104,79 mg Trolox/100 g pf) será fundamentalmente debido al mayor contenido de quercetina y kaempferol (6,02 y 3,29 mg/100 g pf, respectivamente).

Tabla 4.3: Correlaciones entre los diferentes parámetros estudiados expresados como coeficiente de correlación de Pearson.

	β -Caroteno	Luteína	Clorofila A	Clorofila B	Actividad Antioxidante
a*	0,870**	0,539*	-0,910**	-0,945**	
b*	0,908**	0,703**	-0,945**	-0,967**	
Ácido Ascórbico					0,598*
β -Caroteno					0,946**
Luteína					0,595*
Clorofila A					0,976**
Clorofila B					0,957**
Contenido Fenólico Total					0,918**
Ácidos Fenólicos					0,858**
Flavonoides					0,969**
Glucosinolatos Totales					0,942**

* La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral).

** La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

Además de los carotenoides y de los compuestos fenólicos, los glucosinolatos (GS) son también metabolitos secundarios de las plantas con una gran capacidad antioxidante (Moreno et al., 2006; Verkerk et al., 2009). Así, como se observa en la Tabla 4.3, se encontró una alta correlación entre el contenido en glucosinolatos totales y el valor de actividad antioxidante ($r=0,942$, $p<0,01$).

Hay una gran diversidad de este tipo de compuestos, también llamados tioglucósidos, que están presentes en las hortalizas de la familia de las Crucíferas o Brassicas. Está demostrado, que tanto los glucosinolatos, como algunos de sus

derivados (isotiocianatos) son anticancerígenos (Wong et al., 1998). Los principales isotiocianatos son el sulforafano derivado de la glucorafanina, alil isotiocianato derivado de la sinigrina, crambeno derivado de la progoitrina, indol-3-carbinol derivado de la glucobrasicina y fenetil isotiocianato derivado de la gluconasturtina (Keck y Finley, 2004).

Los glucosinolatos fueron clasificados teniendo en cuenta su estructura química y los valores obtenidos para las brassicas estudiadas (Tabla 4.4) estuvieron de acuerdo con los encontrados por otros autores (Cartea et al., 2008; Ciska et al., 2000; Kushad et al., 1999; Tian et al., 2005; Vallejo et al., 2002).

El contenido total de glucosinolatos alifáticos (Tabla 4.4) fue mayor para los cultivares de col de Milán (aproximadamente 90 μmol sinigrina equivalente/100 g pf) que para los de brócoli (aproximadamente 70 μmol sinigrina equivalente/100 g pf), sin embargo dentro de esta familia química se observaron comportamientos diferentes para los distintos compuestos identificados. Para los GS alquílicos se observó que el contenido de glucorafanina (precursor del sulforafano) fue mayor en los cultivares de brócoli que en los de col de Milán y sin embargo, el contenido de glucoiberina y de glucoalisina fue mayor en los cultivares de col de Milán. Para los GS alquenílicos se observó que el contenido de sinigrina, GS precursor del alil isotiocianato, fue mayor en los cultivares de col de Milán, el contenido de gluconapina fue mayor en la col de Milán 'Leticia' seguido del brócoli 'Mónaco', y el contenido de glucobrasicanapina (GS alifático mayoritario en las brassicas estudiadas) fue significativamente superior en el brócoli 'Parthenon' (53,89 μmol sinigrina equivalente/100 g pf). La progoitrina (precursor del crambeno) fue el único GS identificado dentro del grupo de los GS alifáticos hidroxialquenílicos y su contenido fue considerablemente mayor en los cultivares de col de Milán.

Con respecto a los GS indólicos (Tabla 4.4) se observó que el contenido total de éstos fue mayor en el brócoli 'Pathenon' seguido de la col de Milán 'Dama' (120,73 y 104,41 μmol sinigrina equivalente/100 g pf, respectivamente). Dentro de esta familia de GS, se observó que la glucobrasicina (precursor del indol-3-carbinol) fue el GS más abundante en las brassicas estudiadas y además, su contenido fue superior en los cultivares de brócoli y dentro de éstos en 'Parthenon' (113,93 μmol sinigrina

equivalente/100 g pf). Mientras que el contenido de 4-metoxiglucobrasicina y de neoglucobrasicina fue mayor en los cultivares de col de Milán, concretamente en ‘Dama’ (13,07 y 27,72 μmol sinigrina equivalente/100 g pf, respectivamente).

La gluconasturtina fue el único GS identificado en la familia de los aromáticos y, como se observa en la Tabla 4.4, no fue detectado en los cultivares de col de Milán estudiados. El contenido de gluconasturtina, GS precursor del fenetil isotiocianato, fue superior en el brócoli ‘Parthenon’ (10,83 μmol sinigrina equivalente/100 g pf) que en el ‘Mónaco’ (3,74 μmol sinigrina equivalente/100 g pf).

Tabla 4.4: Contenido en glucosinolatos intactos de dos cultivares de brócoli y col de Milán.

Glucosinolatos (GS)	Brócoli		Col de Milán	
	‘Parthenon’	‘Mónaco’	‘Dama’	‘Leticia’
<i>GS Alquilicos</i>				
Glucorafanina ¹	2,33±0,03a	2,03±0,65a	0,47±0,10b	0,26±0,08bc
Glucoiberina ¹	0,12±0,03c	1,17±0,24b	3,91±0,22a	3,72±0,60a
Glucoalisina ¹	0,57±0,10c	1,39±0,20b	1,84±0,21a	2,10±0,39a
<i>GS Alquenílicos</i>				
Sinigrina ¹	0,57±0,03b	0,23±0,09bc	15,33±0,46a	14,57±1,06a
Gluconapina ¹	13,88±0,33b	15,35±0,97ab	8,11±1,17c	16,85±1,78a
Glucobrasicanapina ¹	53,89±3,00a	46,88±2,40b	47,34±1,17b	35,32±2,76c
<i>GS Hidroxialquenílicos</i>				
Progoitrina ¹	0,92±0,17b	0,77±0,18b	13,81±1,33a	13,79±1,14a
GS Alifáticos Totales¹	72,28±3,35bc	67,83±2,19c	90,82±3,04a	86,61±2,71ab
Glucobrasicina ¹	113,93±0,56a	87,30±8,52b	63,62±2,33c	44,02±3,73d
4-Metoxiglucobrasicina ¹	6,31±0,23bc	5,00±0,43c	13,07±0,86a	7,40±2,04b
Neoglucobrasicina ¹	0,50±0,11c	0,57±0,26c	27,72±0,63a	13,76±0,36b
GS Indólicos Totales¹	120,73±0,59a	92,87±8,96c	104,41±2,24b	65,18±2,19d
Gluconasturtina	10,83±0,18a	3,74±0,31b	nd	nd
GS Aromáticos Totales¹				
Glucosinolatos Totales¹	203,85±3,52a	164,44±9,66c	195,22±3,09b	151,79±3,93d

¹Expresado como μmol sinigrina equivalente/100 g peso fresco.

(nd) no detectado.

Misma letra en la misma fila significa que no existen diferencias significativas entre valores ($p < 0,05$).

El sumatorio de todos los GS identificados y cuantificados se presenta en la Tabla 4.4 como glucosinolatos totales, y como se puede observar, el contenido de éstos fue significativamente mayor en el brócoli ‘Parthenon’ (203,85 μmol sinigrina equivalente/100 g pf).

Por lo tanto, a la vista de los resultados obtenidos en la caracterización de las brassicas estudiadas, con respecto a los parámetros físico-químicos decir que entre los brócolis destaca el cultivar ‘Parthenon’ y entre las coles de Milán el cultivar ‘Dama’. En los parámetros de calidad funcional destacan sobre todo los cultivares de brócoli frente a los de coles de Milán, y entre los de brócoli destaca el ‘Parthenon’, puesto que posee mayor contenido en compuestos funcionales o bioactivos, lo que le aporta un valor funcional mayor.

ARTÍCULOS: Caracterización de brassicas

4.1.a.- Fast and accurate alternative UV-chemometric method for the determination of Chlorophyll A and B in broccoli (*Brassica oleracea Italica*) and cabbage (*Brassica oleracea Sabauda*) plants

Journal of Food Composition and Analysis 23 (2010) 809-813



M.F. Fernández-León^a, M. Lozano^a, M.C. Ayuso^b, A.M. Fernández-León^a, D. González-Gómez^a

^aTechnological Institute of Food and Agriculture (INTAEX), Junta de Extremadura. Ctra San Vicente S/N. Badajoz, Spain.

^bAgriculture Engineering School, University of Extremadura, Ctra. San Vicente S/N, Badajoz, Spain

Abstract

The aim of this work was to establish a multivariate method for the rapid quantification of chlorophyll A and B in broccoli and cabbage plants using photometric signals. A partial least squares (PLS) model was optimized using the UV spectra of a set of calibration samples. Limit of detection (0.174 and 0.304 $\mu\text{g/mL}$ for chlorophyll A and B respectively), selectivity (0.946 and 0.942 respectively) and sensitivity (0.0324 and 0.0183 absorbance $\text{mL}/\mu\text{g}$ respectively) were calculated in order to establish the robustness of the proposed methodology. After method validation, the PLS model was applied to determine the concentration of both pigments in different broccoli and cabbage plants. The concentrations of these pigments, calculated by the optimized chemometric method, were compared with those obtained by a chromatographic and photometric method based on the absorbance of sample at two different wavelengths. The accuracy of our results was comparable with that of results obtained by a chromatographic method improving significantly the accuracy compared with that of previously reported photometric approaches.

Keywords: Chlorophyll A; Chlorophyll B; Chemometric; PLS; Photometric; Broccoli; Cabbage; Food analysis; Food composition.

1.- Introduction

Chlorophylls (Chl) are photosynthetic pigments that are widely distributed in nature. They can be found in a large number of green vegetables, such as broccoli and cabbage plants. These pigments possess a basic skeleton structure of porphyrine with a magnesium ion in the center and a long phytol group in the tail (Schwartz and Lorenzo, 1990). The major chlorophylls in plants include Chl-A and Chl-B. They differ only slightly, in the composition of a side chain (in Chl-A it is $-\text{CH}_3$, in Chl-B it is CHO). Both chlorophylls are genuine components of the photosynthetic membranes, and they are usually present at a ratio of 3:1 (Chen and Chen, 1993). Growth conditions and environmental factors can modify this A/B ratio (Lichtenthaler et al., 1982). Both of these two chlorophylls are very effective photoreceptors because they contain a network of alternating single and double bonds, and the orbitals can delocalise stabilising the structure. Such delocalised polyenes have very strong absorption bands in the visible regions of the spectrum, allowing the plant to absorb the energy from sunlight (Streitweiser and Heathcock, 1981).

Changes of the level of chlorophylls in photosynthetic cells are a good index of senescence, occurring in green vegetables after harvest. Chlorophyll decomposition is strongly connected with the characteristic feature of senescence-peroxidation of cell lipid membranes (Deschene et al., 1991; Zhuang et al., 1995).

Different methods have been proposed for the simultaneous determination of these pigments in vegetables. Khachik et al. (1986) established a chromatographic method for the separation, identification and quantification of major carotenoid and chlorophyll pigments in several green vegetables. Later, Cano (1991) reported a chromatographic method for chlorophyll determination, among other pigments, in kiwi fruit. The main handicaps of these chromatographic methods are the long time needed to complete an analysis (from 15 to 30 min) and analysis costs. On the other hand, the method most often used to determine pigments, such as chlorophylls were developed by Arnon (1949) and Comar and Zscheile (1942), later completed by Vernon (1960) and Lichtenthaler (1987). This method is based on the spectrophotometric measurement of the extinction at two absorption maxima for Chl-A and Chl-B.

The disadvantage of this approach is that the pigment values obtained in one solvent are not comparable with those of another, being this discrepancy particularly large in the values for the ratio of Chl-A/B (Lichtenthaler, 1987). On the other hand, the absorption spectra for Chl-A and Chl-B are very similar, overlapping in the whole absorption range especially for Chl-B, for this reason direct and simultaneously determination of both pigments is not possible using univariate calibration methods, such as ordinary least squares. This photometric method will be easily improved by applying chemometric calibration, such as partial least squares (PLS). In this case, using the whole spectrum information will overcome all the overlapping problems for the simultaneous determination of these pigments.

Partial least squares (PLS) is a factor analysis based method first applied to chemical analysis by Wold et al. (1983) and widely used in analysis during the last decade. As far as we know, only a few authors have reported studies using PLS in the identification and quantification of chlorophyll pigments in fruit and vegetable products, such as tomatoes (Polder et al., 2004), apples (Zude, 2003) and oil (Moberg et al., 2000). Different analytical signals have been proposed for the optimization of PLS calibration models, such as near-infrared spectra (Xie et al., 2009), proton NMR spectra (Alonso-Salces et al., 2010), fluorescence data (Poulli et al., 2007) and absorption spectra (Khanchi et al., 2007). A great advantage of applying multivariate analysis is the reduction of interference problems, the robustness of the calibration model and reduced analysis time; in addition, these methods offer the advantage of speed in the determination of the components of interest in mixtures, because separation steps in the procedures may be avoided.

In this paper for the first time, a chemometric method based on the application of partial least squares (PLS) calibration is proposed for the simultaneous determination of Chls in broccoli and cabbage, using the photometric properties of these compounds. To improve the effectiveness of the multivariate calibration, absorption spectra were preprocessed by first derivate. The proposed method was validated in terms of a set of synthetic samples and applied to the determination and quantification in different broccoli and cabbage cultivars. An elliptical joint confidence test (EJCR) has been

performed in order to compare the proposed PLS model with the HPLC and photometric methods were proposed previously in the bibliography.

2.- Materials and methods

2.1.- Apparatus

Photometric spectra were recorded in a UV-2450 UV–vis spectrophotometer (Shimadzu, Japan). Data acquisition and analysis were performed by the use of UV-probe Shimadzu software (Shimadzu, Japan). An Agilent 1200 series liquid chromatographic instrument (Agilent Technologies, S.L., Madrid, Spain) equipped with a DAD was used for the chromatographic studies. Data processing was done using Agilent ChemStation software (Agilent Technologies, S.L., Madrid, Spain).

2.2.- Chemicals

All solvents used were of analytical reagent quality and purchased from Panreac (Panreac Spain, Spain). Chlorophyll A and B were purchased from Sigma–Aldrich (Sigma–Aldrich Spain, Spain). Standard solutions of each compound (100 µg/mL) were prepared by dilution in acetone (avoiding exposure to direct light), and they were used as soon as they were prepared. Validation samples were prepared following the same procedure as in the calibration standards. Six independent samples were prepared for the standards and validation set (n=6).

2.3.- Plant material

Two broccoli cultivars and a cabbage cultivar were analyzed in this research. Plants were grown in Finca La Orden experimental field belonging to Las Vegas del Guadiana area (Extremadura, Spain). They were harvested in 2009, between January and February. Around 20-30 broccoli florets and cabbage leaves were randomly selected and vacuum packed using plastic bags and stored at -20 °C until pigment extraction and quantification. Chlorophyll extraction was performed the following day. In addition, in order to avoid pigment degradation these compounds were analyzed as soon as they were extracted.

2.4.- Software

All calculations were done using MatLab R2006b (The Math- Works, Inc., MA, USA) using different routines and graphical interfaces: MVC1 (MultiVariate Calibration for first-order), an integrated Matlab toolbox for third-order calibration, developed by Olivieri et al. (2004), which allows performing first-order calibration with different modeling methods. For experimental design, The Unscrambler was used (Unscrambler software, version 6.11 of CAMO, Trondheim, Norway).

2.5.- Chlorophyll extraction

For broccoli and cabbage chlorophyll analyses, six independent homogenates were prepared from previously frozen plant samples, and two measures were done for each homogenate.

Chlorophyll extraction was performed according to our previous work (García et al., 2005). Briefly, to extract chlorophyll pigments from plant tissue around 4 g from plant homogenate was accurately weighted and 15.0 mL of acetone was mixed into a centrifuge flask placed in an ice bath. After 1 min of homogenization using an Omni Mixer homogenizer (Omni International, GA, USA), samples were centrifuged for 15 min at 14,000 rpm at 4 °C. Samples were extracted twice more and supernatants were then filtered into a 50.0 mL volumetric flask using acetone as solvent to complete the final volume. After pigment extraction plant homogenate was completely discolored (color changed from green to whitish). Before spectra measurement, samples were filtered by a 0.45 µm nylon filter.

In order to avoid pigment degradation, chlorophyll extractions were performed under dark conditions and extracts were kept on ice until analysis. Chlorophylls extracts were analyzed as soon as they were extracted from plants.

2.6.- Chlorophyll quantification

2.6.1.- PLS approach

The PLS method involves a calibration step in which the relation between bi-dimensional emission spectra and analyte concentrations is estimated from a set of

reference samples (calibration set), and a prediction step in which the results of the calibration are used to estimate the component concentrations in unknown samples (prediction set). A calibration set was constructed with nine calibration sample according to a central composite design. Chl-A and Chl-B concentrations ranged from 3.00 to 20.0 $\mu\text{g/mL}$ in both cases. The absorption spectra were registered between 600 and 700 nm, and digitized each 1 nm. In order to determine the correct number of loading vectors to be used for data modeling, the Haaland and Thomas (1988) criteria were used and cross-validation calculations were performed to calculate the PRESS error (prediction residual error sum of squares). Moreover, different spectra ranges were studied in order to establish the optimum wavelength range for each compound determination. No significant differences were observed while using the whole or part of the wavelength spectra range. Furthermore, to improve the performance of the multivariate calibration, the system was as well modeled with the first and the second derivate of the recorded spectra. In Fig. 1 are represented the spectra for Chl-A and Chl-B and their mixtures, and the spectrum derivate (first and second derivation). Calibration parameters such as the number of factors, determination coefficients (R^2) and PRESS values are summarized in Table 1 for un-processed and first and second derivate processed spectra. Analytical quality parameters, such as the selectivity (SEL), sensitivity (SEN), limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) (Booksh and Kowalski, 1994; Lorber and Kowalski, 1988) for both sets of data (un-processed and first and second derivate processed data) were calculated to determine the best modeling PLS system.

Briefly, SEL ($\text{SEL}=1/(\|b_k\| \|S_k\|)$), being S_k the part of the signal that relates uniquely to the analyte of interest and is more important than the total signal, and b is the regression vector ranging from 0 to 1, is a measure of how unique the spectrum of the analyte of interest is compared with other species. Therefore, a value of 0 means that analysis is impossible while 1 indicates that the interferences do not interfere. SEN is expressed as $\text{SEN}=1/\|b\|$, and it is proportional to the regression vector, being signal/concentration sensitivity units. SEN is related to the minimum concentration that the model can differentiate in the same analytes. Finally, LOD ($\text{LOD}=3\|\varepsilon\| \|b_k\|$) takes into account the noise instrumental vector, ε , and the regression coefficient. The instrumental noise is generally calculated as the standard deviation of blank samples.

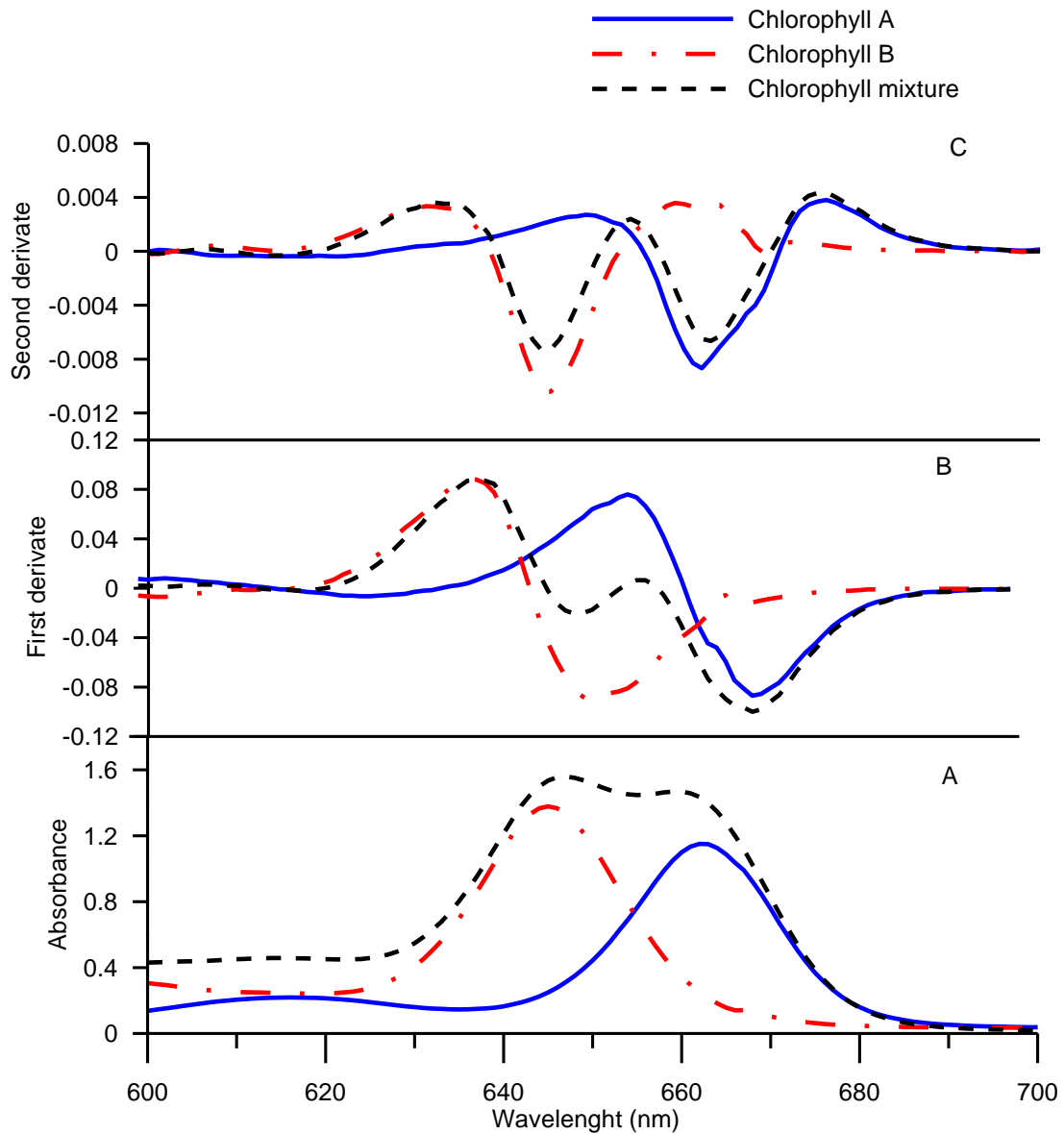


Figure 1: Un-processed (A), first derivative (B) and second derivate (C) UV spectra of chlorophyll A (solid line), chlorophyll B (dash dot line) and chlorophyll A and B mixture (dash line) samples from 600 to 700 nm.

Table 1: Optimum number of factors and calibration statistical parameters by applying PLS algorithm to resolve the mixture chlorophyll A and B using the un-processed and first and second derivative UV spectra.

Statistical parameters	Un-processed spectra		First derivative processed spectra		Second derivative processed spectra	
	Chl-A	Chl-B	Chl-A	Chl-B	Chl-A	Chl-B
Factors	2	3	2	2	2	2
PRESS	7.25	2.34	6.10	2.26	5.59	2.03
R ²	0.982	0.994	0.984	0.995	0.986	0.995
Figures of merit						
SEL	0.854	0.399	0.946	0.942	0.911	0.906
SEN ^a	0.371	0.105	0.0323	0.0184	4.78 x 10 ⁻³	2.74 x 10 ⁻³
LOD ^b	1.48	5.21	0.174	0.304	0.115	0.203
LOQ ^c	4.93	17.3	0.579	1.01	0.382	0.675

PRESS, prediction residual error sum of squares.

SEL, selectivity.

SEN, sensitivity.

LOD, limit of detection.

^a Expressed in absorbance mL/μg.

^b Expressed in μg/mL.

^c Limit of quantification expressed as μg/mL.

2.6.2.- Arnon's photometric approach

This approach (Arnon, 1949) is based on the spectrophotometric measurement of the extinction in the red wavelength region at two absorption maxima for Chl-A and Chl-B. On the basis of the Lambert–Beer law, Arnon developed a linear system of equations with determinants representing the specific extinction coefficients obtained previously (MacKinney, 1941). With the principle of Arnon the sum of extinction of mixed extracts at two different wavelengths was described by equation systems:

$$A_1(\lambda) = K_{11}C_1 \text{ and } A_2(\lambda) = K_{21} + K_{22}C_2$$

Resolving the equations system for C₁ and C₂ (Chl-A and Chl-B concentration respectively) using the determined specific extinction coefficients of the pigment under question (K₁₁ and K₂₁) allows the concentration to be determined in a particular solvent.

In our case, using acetone as solvent and taken into account the concentration range of the studied pigments in broccoli and cabbage plants, the equation systems used were the following:

$$C_{\text{Chl-A}} = 9.342 \times A(662\text{nm}) - 1.612 \times A(645\text{nm})$$

$$C_{\text{Chl-B}} = -3.775 \times A(662\text{nm}) + 18.359 \times A(645\text{nm})$$

where $C_{\text{Chl-A}}$ and $C_{\text{Chl-B}}$ are chlorophyll concentration expressed as mg/L.

2.7.- Chromatographic determination of chlorophyll pigments

The methodology proposed by Cano (1991) was used to determine the concentration of both pigments by means of a chromatographic separation. Briefly, the acetone plant extracts were separated by HPLC using a C-18 reverse-phase column and a linear gradient (70% methanol/water (75:25) and 30% of ethyl acetate). In these conditions chromatographic peaks were monitored at 662 and 645 nm for Chl-A and Chl-B respectively. Finally, the external calibration was applied for pigments quantification.

3.- Results and discussion

3.1.- PLS model

According to the results shown in Table 1, PRESS values are lower in processed spectra, in addition, for this model (first and second derivate spectra), the numbers of predicted factors is equal to the number of components of interests, while in unprocessed data 3 factors are needed to model Chl-B due to its higher overlapping. Taking into account that SEL values range from 0 to 1, more accurate results are obtained when first or second derivate has been applied to original spectra. In addition, SEN values are significantly lower in processed spectra model. Furthermore, LODs are more than 10 times lower in first or second derivate PLS model. As it has been mentioned above, this fact is explained due to less overlapping observed between both pigments spectra when first or second derivate is applied to unprocessed spectra.

3.2.- Validation of PLS model

The PLS model was applied to a data set of simulated problems in order to perform its validation. The samples analyzed of the validation set were composed by random mixtures of variable amounts of both pigments and their concentrations were calculated using the optimized PLS method. The recovery values obtained in the analysis of the validation data set are summarized in Table 2. For both compounds, the recoveries were near to 100% (six replicates for the five samples).

The precision of the method was determined by calculating the intraday repeatability and interday precision. A standard sample containing 9.00 and 7.00 $\mu\text{g/mL}$ of chlorophyll A and B respectively was predicted on the same day (intraday repeatability, $n=6$) and in different days (interday precision, $n=6$). The F statistic criterion was applied to compare the precision for each compound, and no statistical differences were found in the determination of both chlorophylls within the same day or different days.

Comparing the results after applying both optimized PLS models (PLS using first or second derivate spectra) it can be observed how the same results are obtained when the first and second derivate were applied, since the first and second derivations enhance similar to pigment spectra separation compared with un-processed spectra (Fig. 1).

Table 2: Recovery chlorophyll A and B using the optimized PLS models in set of validation samples.

Added ^a	Chlorophyll A				Added ^a	Chlorophyll B			
	Firs derivate		Second derivate			Firs derivate		Second derivate	
	Found±SD ^b	Recovery ^c	Found±SD ^b	Recovery ^c		Found±SD ^b	Recovery ^c	Found±SD ^b	Recovery ^c
10	9.83±0.02	98.3	9.86±0.02	98.6	10	10.0±0.1	100	9.98±0.01	100
5	4.98±0.01	99.6	5.02±0.01	100	5	5.10±0.01	102	5.06±0.01	101
7.5	7.59±0.02	101	7.62±0.02	102	7.5	7.78±0.01	104	7.72±0.03	103
8	8.23±0.03	103	8.29±0.05	104	16	16.6±0.04	104	16.5±0.1	103
10	10.2±0.1	102	10.1±0.1	101	20	20.6±0.1	103	20.2±0.1	101

^a Expressed in µg/mL.

^b n=6.

^c Express as %.

3.3.- PLS model vs. HPLC and Arnon's photometric approach

To compare the proposed PLS multivariate methodology with the chromatographic (Cano, 1991) procedure and equation approaches (Arnon, 1949) and in order to get further insight into the accuracy and precision of these methods herein compared, linear regression analysis of nominal vs. found concentration values was applied for the validation set of samples. The estimated intercept and slope were compared with their ideal values of 0 and 1 using the elliptical joint confidence region (EJCR) test (Gonzalez et al., 1999). Fig. 2 shows the EJCR plots for the PLS, HPLC and equations methods. As can be observed, for both PLS (PLS first and second derivation) and HPLC methods, the two chlorophylls ellipses contain the theoretical ($a=0$, $b=1$) point, while for the equation's approach, the theoretical point is outside of Chl-B ellipse. The conclusion is that this optimized PLS, and HPLC model produce precise and accurate results for the determination of both chlorophylls. Arnon photometric approach is appropriate for Chl-A, being less accurate for Chl-B quantification.

3.4.- Quantification of chlorophyll A and B in broccoli and cabbage

The found concentrations for both Chls are summarized in Table 3. The amount of Chl-A is three times Chl-B concentration for both plants and cultivars. The ratio between the concentrations of both pigments is more related to the growth conditions and environmental factors as we have mentioned in Section 1. High-light and sunexposed plants (high-light chloroplasts) exhibit A/B ratios of 3.2-4, whereas shade plants (low-light chloroplasts) possess lower values for the A/B ratio (e.g., 2.5-2.9) (Lichtenthaler et al., 1982; Seybold and Egle, 1970).

Chlorophyll A was the most abundant pigment found in the studied green vegetables, being this amount higher in both broccoli cultivars than in cabbage plants. Similar results were reported by other authors (Burns et al., 2003; García et al., 2005; Khachik et al., 1986). On the other hand, the amount of chlorophylls found in Milan cabbage is similar to those values found in leaf vegetables such as lettuce (Burns et al., 2003) because both plants exhibit nearly white leaves rather than deep green as broccoli.

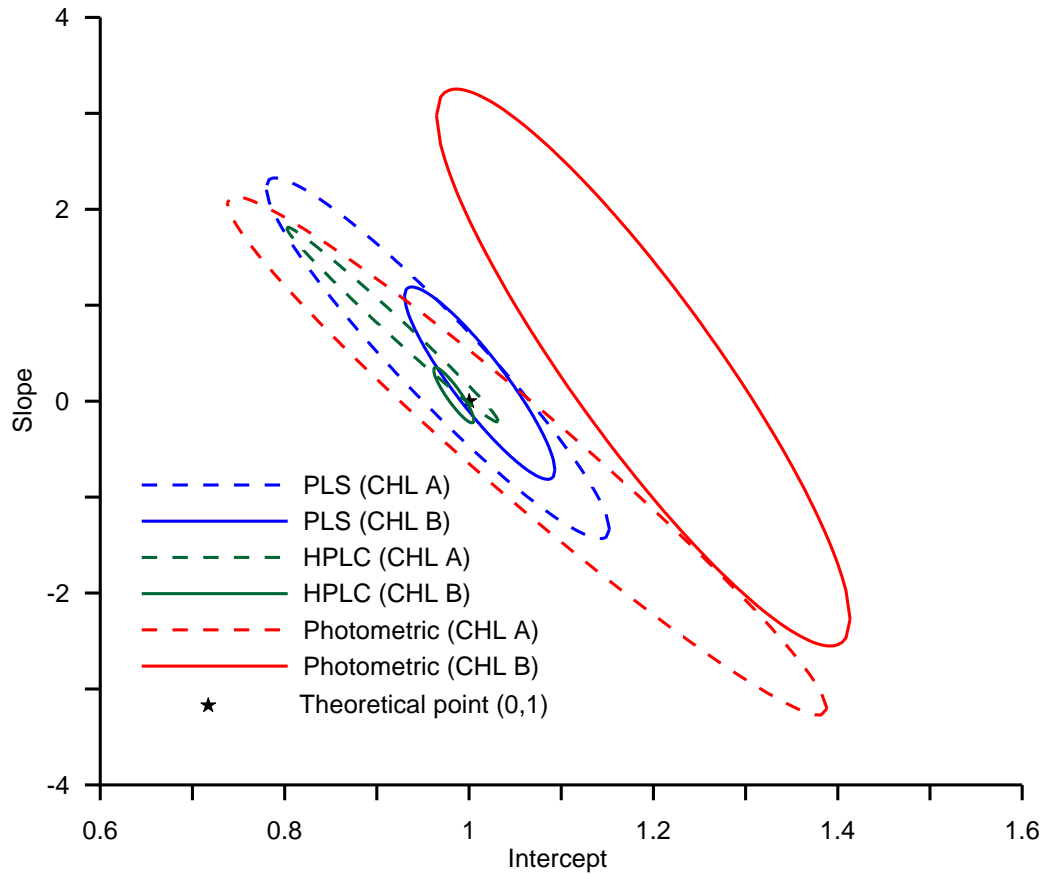


Figure 2: Elliptical joint confidence regions for the slope and intercept corresponding to regressions of predicted vs. actual concentrations of chlorophyll A (dash line) and B (solid line), applying PLS first derivate (blue lines), PLS second derivate (purple lines), HPLC analysis (green lines) and a Photometric assay (red lines). The black star marks the theoretical ($a=0$, $b=1$) point. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article).

Table 3: Analysis of chlorophyll A and B pigment in different broccoli and cabbage cultivars using the optimized PLS models.

Method	PLS				Ratio (A/B)
	Chl-A ^a ±SD ^b		Chl-B ^a ±SD ^b		
Samples	First derivate	Second derivate	First derivate	Second derivate	
‘Parthenon’ broccoli	9.40±1.50	9.42±1.39	3.24±0.54	3.21±0.48	3
‘Monaco’ broccoli	9.15±1.47	9.17±1.40	3.22±0.63	3.25±1.40	3
Milan cabbage	2.17±0.38	2.16±0.33	0.822±0.101	0.820±0.099	3

^a Expressed in mg Chlorophyll/100g fresh weight.

^b n=4.

4.- Conclusions

The proposed multivariate method allows us to determine Chl-A and Chl-B from plant extracts with the same accuracy as a chromatographic method, achieving lower analysis time and significantly decreased use of solvents. The model has been validated by the analysis of a set of synthetic samples containing different amounts of both Chls in different ranges of concentrations. In addition, interday and intraday assays have been carried out in order to establish the analytical robustness of the proposed method, and it has been demonstrated that the model can be applied for multiple analysis on the same day and on different days without losing accuracy. Finally, according to EJCRC tests, the pigment concentrations obtained by the PLS model and a chromatographic separation are comparable, while other photometric assays overestimate Chl-B concentrations due to spectra overlapping and interferences. The optimized PLS model has been applied to the simultaneous determination of both pigments in different broccoli and cabbage cultivars.

Acknowledgments

D. Gonzalez-Gomez and M.F. Fernandez-Leon thank the “Instituto Nacional de Investigación y Tecnologías Agrarias y Alimentarias (INIA)” of Spain for his research contract and her doctoral scholarship respectively.

4.1.b.- PLS Calibration to Resolve Overlapping Peaks of Lutein and Zeaxanthin in Vegetable Samples by LC

Czech Journal of Food Science 4 (2012) 358-363



David González-Gómez¹, Mercedes Lozano¹, Ana María Fernández-León¹, María Fernanda Fernández-León¹ and Florentina Cañada-Cañada²

¹Technological Institute of Food and Agriculture (INTAEX), Junta de Extremadura, Badajoz, Spain

²Department of Sciences and Mathematics Education, Faculty of Education, University of Extremadura, Badajoz, Spain

Abstract

The chromatographic method in combination with a Partial Least Squares (type PLS-1) chemometric tool was developed to analyse simultaneously the carotenoid compounds, lutein and zeaxanthin. Both analytes appear together in the same chromatographic peak. Different calibration matrices were done using the absorbance spectra, obtained in the peak apex. The method was successfully applied to plant material such as cabbage, broccoli, red pepper, yellow pepper, and green pepper. The higher content of lutein was found in the green leafy vegetables such as broccoli and cabbage. On the other hand, zeaxanthin was only found in pepper, with the highest concentration having been found in red pepper.

Keywords: carotenoids; Partial Least Squares; liquid chromatography; pepper; broccoli; cabbage.

1.- Introduction

Carotenoids are a wide group of plant pigments that have an important bioactivity in humans and animals. The intake of foods rich in these compounds is considered to be beneficial in the prevention of some diseases, including certain cancers, atherogenesis, cardiovascular diseases, neuronal damage, and eye disease (Cantuti-Castelvetri et al., 2000; Cooper, 2004; Krinsky and Johnson, 2005). The beneficial effects of carotenoids are thought to be due to their role as antioxidants. Food sources of these compounds include a variety of fruits and vegetables, in addition, egg yolk is a highly bioavailable source of lutein and zeaxanthin (Handelman et al., 1999).

Lutein and zeaxanthin have been suggested to be protective against certain eye diseases. The selective accumulation of lutein and zeaxanthin in the macula of the eye retina and their capability to absorb potentially damaging blue light have raised expectations that their ingestion may reduce the risk of age-related macular degeneration (AMD) and cataracts (Landrum et al., 1997; Vu et al., 2006).

In the literature are presented various analytical methods, such as spectrophotometry, colourimetry, and HPLC, for the determination of carotenoids in food products and biological samples (Schoefs, 2002). The most commonly employed methods are based on liquid chromatography (LC) coupled to different detection techniques, mainly with diodearray or mass spectrometric detection.

The compounds lutein and zeaxanthin are poorly separable on a variety of LC columns and the authors have usually reported the sum of the concentrations of these compounds (Su et al., 1999; Takahashi et al., 2006). In these cases, the pigments could be individually quantified if chemometric calibration was applied to the chromatographic peak signal. Among the existing first-order chemometric calibration methods, Partial Least Squares (PLS) is a factor analysis method first applied to chemical analysis by Wold et al. (1983) and it has been widely used in analysis during the last decade. As far as we know, only few authors have reported studies using PLS in the simultaneous identification of these carotenoid pigments in plant material (Meléndez-Martínez et al., 2003; Pereira et al., 2007), but not in dynamic chromatographic signals.

In this paper, a chemometric method based on the application of partial least squares (PLS) calibration is proposed for the simultaneous determination of lutein and zeaxanthin in cabbage, broccoli, and pepper plants.

A survey of the literature shows that chemometric methods like partial least squares (PLS-1 and PLS-2) and principal component regression (PCR) have been applied to chromatographic signals of co-eluted analytes such as tocopherols and pesticide mixtures (Galeano-Díaz et al., 2007; Gil-García et al., 1997).

The goal of this work is the simultaneous and independent quantification of lutein and zeaxanthin by a reverse phase-HPLC method. Due to the total coincidence of the peaks, a chemometric tool (PLS-1) has been used over the absorbance spectra obtained in the peak. The developed method has been successfully applied to different vegetable samples.

2.- Material and Methods

2.1.- Chemicals

All solvents used were of analytical reagent quality and were purchased from Panreac (Córdoba, Spain). Lutein and zeaxanthin were purchased from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). Standard solutions of each compound (100 µg/ml) were prepared by dilution in acetone, avoiding the exposure to direct light, and keeping at 4°C.

The working standard solutions consisted of the mixtures of the two carotenoids of different concentrations in acetone, and were used immediately after the preparation. HPLC grade water was produced from a Milli-Q system (Millipore, Miford, USA). Plant materials were purchased in local groceries.

2.2.- Apparatus

The HPLC system used was an Agilent 1100 Series (Agilent Technologies, S.L., Madrid, Spain) composed by a G1311A Agilent quaternary pump, a G1322A Agilent vacuum solvent delivery degasser, a G1315B Agilent UV-vis photodiode array detector, and a G1313A ALS autosampler. The liquid chromatographic system was controlled

and the data were collected and processed by the HP ChemStation for LC 3D software (Agilent Technologies, S.L., Madrid, Spain).

2.3.- Chromatographic system

The analysis was performed applying the method proposed by Mínguez-Mosquera and Hornero-Méndez (1993), and modified by García et al. (2007).

Briefly, carotenoids were extracted from the fruits and/or vegetables with acetone, saponified overnight, and the obtained extract was injected into the chromatographic system. The separation was accomplished in a reversed phase C18 column (RP-18 Lichrosorb, 10 μm , 200 mm \times 4.6 mm). The initial mobile phase was acetone:water (75:25, v/v) for 5 min, raised to (95:5, v/v) over 10 min with a flow rate of 1 ml/minute. The chromatograms were recorded at 445 nm. The absorbance spectra, at the peak maximum, were collected from 380 nm to 600 nm (intervals of 2 nm).

2.4.- Chemometric software

The program MVC1 (Olivieri et al., 2004) written in MATLAB 6.0 (1999) (The Math Works Inc., Natick, USA) was used for PLS-1 calibration. For the experimental design, the Unscrambler was used (Unscrambler Software, Vers. 6.11 of CAMO, Trondheim, Norway).

2.5.- Partial least squares approach

Partial least squares (PLS) technique based on factor analysis was first applied to chemical analysis by Wold et al. (1983). PLS uses the full-spectrum information and has the advantage that it is not necessary to explain the variations on the concentrations of the analytes. The PLS-1 method involves a two-step procedure: (1) calibration, where the relation between the spectra and reference component concentrations is established from a set of standard samples, and (2) prediction, in which the calibration results are employed to estimate the component concentrations in unknown samples (Martens and Naes, 1989). Before calibration, the optimum number of factors should be selected in order to avoid overfitting. This has been performed by applying the cross-validation method to calculate the prediction residual error sum of squares (PRESS). To select the

optimum number of factors, the criterion proposed by Haaland and Thomas (1988) was applied.

To quantify the prediction ability of the model, the square of the correlation coefficient (R^2) was used, which is an indication of the quality of the fit of all the data to a straight line.

The estimation of analytical figures of merit, such as sensitivity (SEN), selectivity (SEL), and limit of detection (LOD), were calculated (Booksh and Kowalski, 1994; Ferré and Faber, 2003; Lorber and Kowalski, 1988).

3.- Results and Discussions

3.1.- Chromatographic approach

Carotenoid pigments were extracted from the plant material according to the procedure listed above and the extracts solutions were injected into the chromatographic system for their separation. Figure 1A represents the chromatogram of the carotenoids from a red pepper extract, the chromatograms of the standard solutions of lutein and zeaxanthin are represented in Figures 1B and 1C, respectively. The retention times of the studied compounds are the same, and therefore the peak Lute + Zea in chromatogram 1A corresponds to the sum of both analytes. As both compounds are co-eluted, a PLS approach was proposed for their simultaneous determination using UV spectra recorded in the peak apex. The proposed chromatographic separation allowed us to quantify the identified carotenoids (peaks 1, 3, and 4), however, for lutein and zeaxanthin single quantification further chemometric process needs to be applied to the recorded signals. Figure 2 illustrates the UV spectra extracted from the chromatographic peaks of lutein and zeaxanthin and from their mixture. However, the overlap observed between the absorption spectra of both compounds indicates that univariate methods may not be directly applied to the resolution of the mixtures of these two analytes. For this reason, multivariate methods, such as PLS, may resolve the overlapping bands without physical separations and therefore the chromatographic analysis coupled to the chemometric analysis may resolve all the studied compounds in a single analysis.

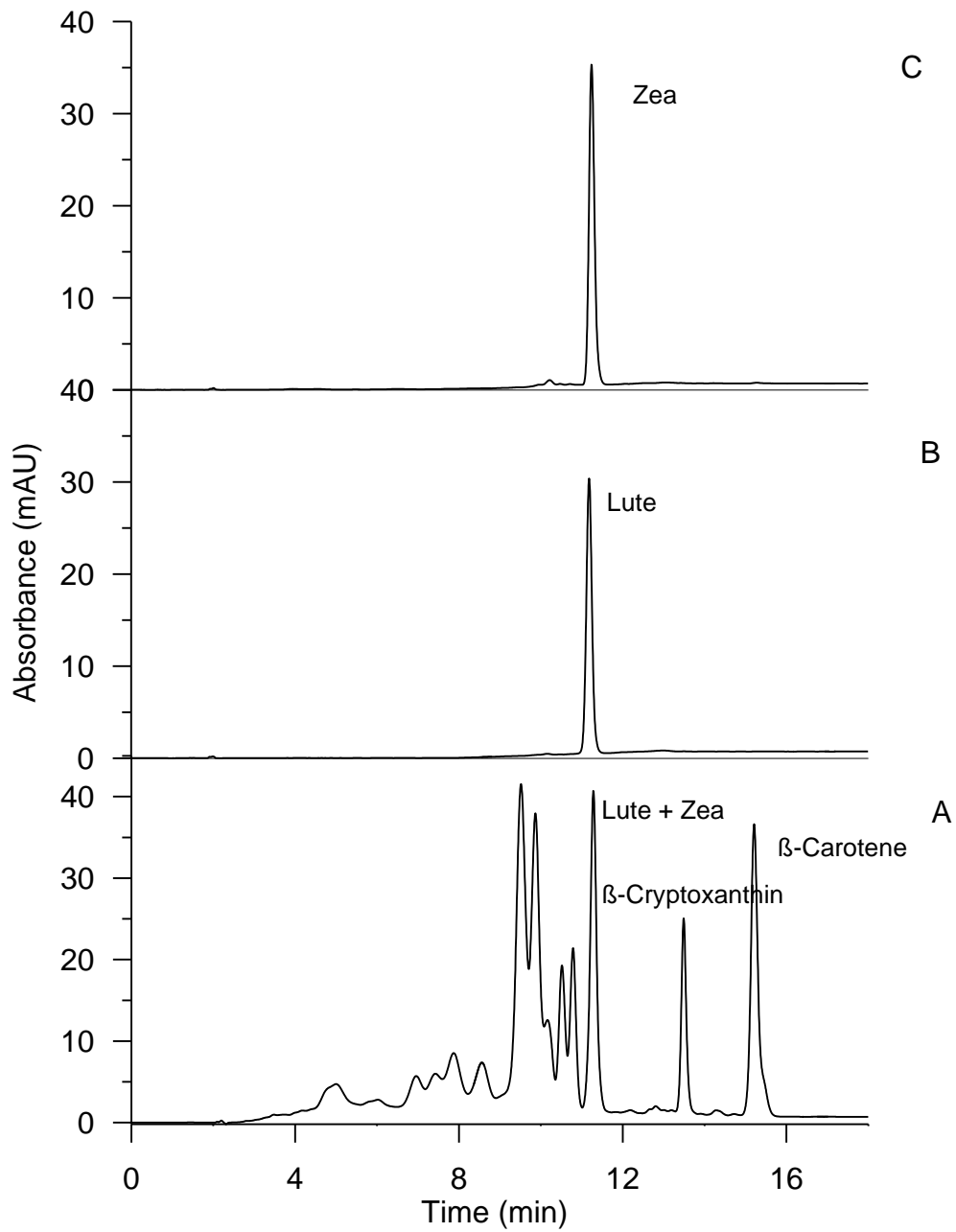


Figure 1: Chromatogram plot of a red pepper extract (A), lutein standard solution (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (B) and zeaxanthin standard solution (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (C), recorded at 445 nm.

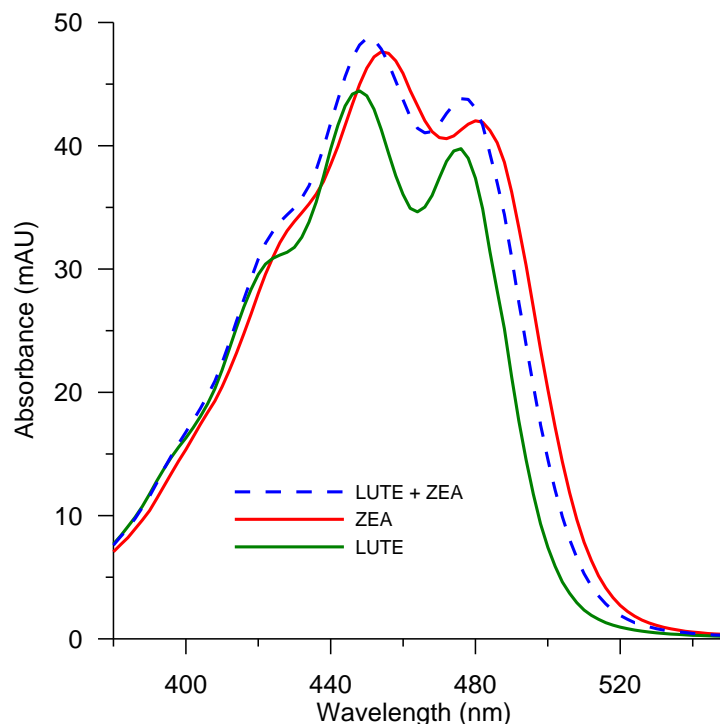


Figure 2: UV spectra of lutein standard solution (5 $\mu\text{g/mL}$), zeaxanthin (10 $\mu\text{g/mL}$) and a mixture of both pigments.

3.2.- PLS optimisation

The PLS method involves the calibration step in which the relation between bi-dimensional emission spectra and analyte concentrations is estimated from a set of reference samples (calibration set), and a prediction step in which the results of the calibration are used to estimate the component concentrations in unknown samples (prediction set). The calibration set was constructed with 9 calibration samples according to a central composite design. Lutein and zeaxanthin concentrations ranged from 0-14 $\mu\text{g/ml}$ and 0-19 $\mu\text{g/ml}$, respectively. The absorption spectra were registered between 380 nm and 600 nm, and digitised each 2 nm. In order to determine the correct number of the loading vectors to be used for data modelling, the Haaland and Thomas (1988) criteria were used and cross validation calculations were performed to calculate the PRESS error. Moreover, different spectra ranges were studied in order to establish the optimum wavelength range for each compound determination. No significant difference was observed while using the whole or part of the wavelength spectra range.

The PLS optimised model is summarised in Table 1, and as can be observed, the optimum number of factors calculated for both pigments was 2, achieving in these conditions a correlation coefficient (R^2) of 0.990 and 0.997 for lutein and zeaxanthin, respectively.

Table 1: Optimum number of factors and calibration statistical parameters in applying PLS algorithm to resolve the mixture of lutein and zeaxanthin using UV spectra.

Statistical parameters	Lutein	Zeaxanthin
Factors	2	2
PRESS*	1.49	1.21
R^2	0.990	0.997
Figures of merit		
SEL*	10.813	8.6887
SEN ¹ *	0.17852	0.17737
LOD ² *	0.266	0.331

¹ Expressed in Absorbance mL/ μ g.

² Expressed in μ g/mL.

* PRESS: Prediction residual error sum of squares.

SEL: Selectivity.

SEN: Sensitivity.

LOD: Limit of detection.

The analytical figures of merit (LOD, SEL, and SEN) were calculated for the optimised model according to the previously published methods (Booksh and Kowalski, 1994; Ferré and Faber, 2003), and the obtained values are summarised in Table 1; according to them, the optimised PLS method is adequate for these pigments quantification in vegetable samples.

3.3.- Validation of PLS model

To test the quality of the optimised model, the PLS model was applied to a data set of varied concentrations of lutein and zeaxanthin mixtures in order to perform its validation. The samples analysed for the validation set were random mixtures of variable amounts of both pigments whose concentrations were calculated using the optimised PLS method. The analytes concentrations were in the calibration set range. In Figure 3, a box-plot diagram of the mean recovery values for each analyte is plotted. It can be observed that recoveries around 100% are found for both carotenoid pigments.

To determine the accuracy of the method, an intraday assay was made using 5 samples containing 5.00 $\mu\text{g/ml}$ and 9.00 $\mu\text{g/ml}$ of lutein and zeaxanthin, respectively. The concentrations were calculated by applying the proposed PLS model. A good intraday repeatability was observed in all cases, with Relative Standard Deviation (RSD%) 1.94 and 2.00 for lutein and zeaxanthin, respectively.

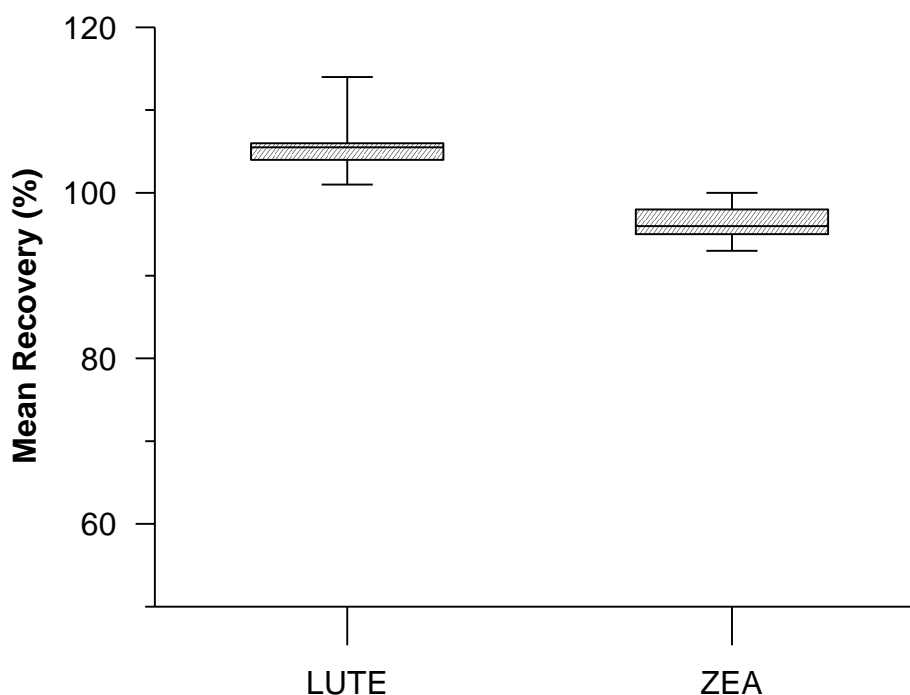


Figure 3: Diagrammatic plot of the mean recovery values calculated by the application of PLS in the analysis of synthetic mixture of lutein (LUTE) and zeaxanthin (ZEA).

3.4.- Lutein and zeaxanthin quantification in vegetables samples

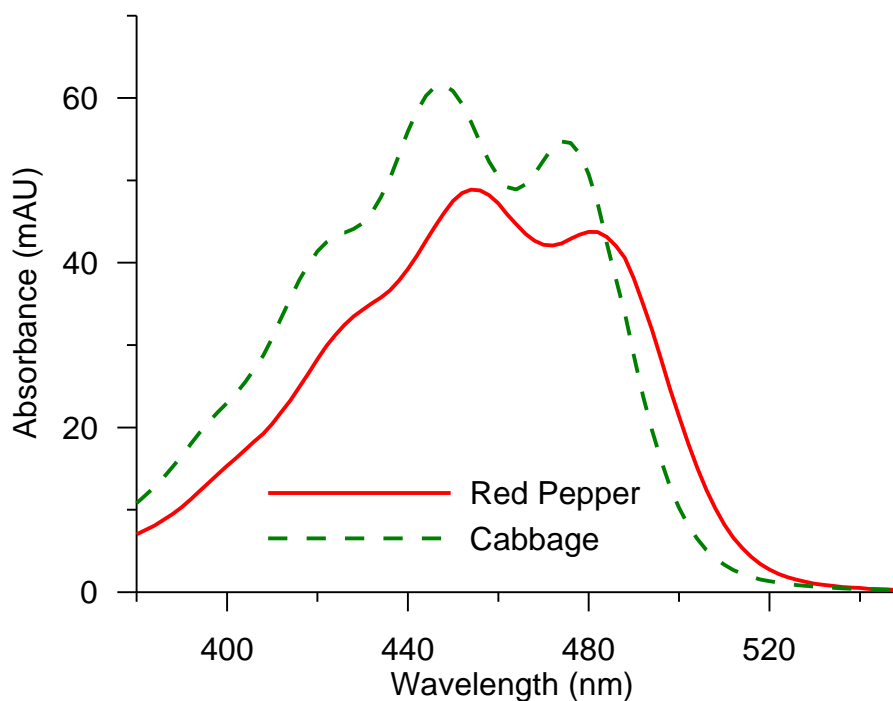
The optimised method was applied to the determination of both pigments in different commercial plant materials, such as cabbage, broccoli, and three types of pepper (green, red, and yellow). The results of the analyses are summarised in Table 2. A higher content of lutein was found in the green leafy vegetables such as broccoli and cabbage. On the other hand, zeaxanthin was only found in pepper, with the highest concentration having been found in red pepper. No amount of this pigment was found in the green leafy plants. Similar results were previously reported (Perry et al., 2009).

Table 2: Analysis of lutein and zeaxanthin pigments in different plant material using the optimized chromatographic-chemometric method.

Sample	Flesh color	Concentration ($\mu\text{g}/100 \text{ g fresh weight}$) ¹	
		Lutein	Zeaxanthin
Cabbage	Green	641 ± 67	traces
Broccoli	Green	1204 ± 73	traces
Pepper	Green	497 ± 47	46 ± 6
Pepper	Red	96 ± 7	277 ± 17
Pepper	Yellow	503 ± 49	53 ± 5

¹ mean of 4 analysis.

To illustrate these results, UV spectra of red pepper and cabbage plants are represented in Figure 4 recorded at the maxima of the chromatographic peaks. In this figure, it can be observed that both spectra are different due to that in cabbage plant only lutein is present while in red pepper zeaxanthin is the main compound. The difference in these compounds spectra allows to make PLS methodology suitable for the simultaneous determination of both pigments.

**Figure 4:** UV spectra of red pepper and cabbage extracts.

4.- Conclusions

The proposed chromatographic-multivariate method allows us to determine simultaneously lutein and zeaxanthin in plant extracts; due to the total overlapping of their chromatographic peaks PLS multivariate method has been used for the resolution. The model has been validated by the analysis of a set of synthetic samples containing different amounts of both pigments in different ranges of concentrations. In addition, interday and intraday assays have been carried out in order to establish the analytical robustness of the proposed method, and it has been demonstrated that the model can be applied for multiple analysis in the same and different days without any loss of accuracy. This method has been satisfactorily applied to vegetable samples, such as cabbage, broccoli, red pepper, yellow pepper, and green pepper.

Acknowledgement

F.C.C., D.G.G. and M.F.F.L. are grateful to the Instituto Nacional de Investigacion y Tecnologia Agrarias y Alimentarias (INIA) of Spain for their research contract (DOC-INIA) and for her doctoral scholarship.

4.1.c.- Identification, quantification and comparison of the principal bioactive compounds and external quality parameters of two broccoli cultivars

Journal of Functional Foods 4 (2012) 465-473



M. Fernanda Fernández-León¹, A.M. Fernández-León¹, M. Lozano¹, M.C. Ayuso², D. González-Gómez¹

¹Technological Institute of Food and Agriculture (INTAEX), Junta de Extremadura. Ctra Cáceres S/N, 06071 Badajoz, Spain.

²Agriculture Engineering School, University of Extremadura, Ctra. Cáceres S/N, 06007 Badajoz, Spain.

Abstract

In this research work, we aim to identify, quantify and compare the phytochemical such as vitamin C, carotenoid and chlorophyll pigments, phenolic compounds and intact glucosinolates, as well as the *in vitro* antioxidant activity and physical quality parameters (colour, firmness, moisture contents, weight/broccoli head and soluble solid contents) of Monaco and Parthenon broccoli cultivars. We found that the bioactive compounds were more abundant in Parthenon compared with Monaco. In fact, higher amount of chlorophylls (12.62 mg/100 g fresh weight), total phenolics compounds (147.15 mg chlorogenic acid equivalent/100 g fresh weight), and total intact glucosinolates (203.85 μ mol of sinigrin equivalent/100 g fresh weight) were found in Parthenon. On the other hand, no significant differences were observed in terms of external quality parameters among the studied cultivars except in the colour and moisture contents.

Keywords: Monaco; Parthenon; health-promoting compounds; phenolic compounds; pigments; glucosinolates.

1.- Introduction

Broccoli, *Brassica oleracea* L. var *italica*, is a floral green vegetable highly valued due to its richness in vitamins, antioxidants, anti-carcinogenic compounds (Nestle, 1998) and health-promoting phytochemicals (Yuan et al., 2010). The potential protective effect of cruciferous vegetables have largely been attributed to the complement of phytochemicals, which include vitamins C and E, the flavonols quercetin, kaempferol, the carotenoids β -carotene, lutein, and the glucosinolates (Podsdek, 2007). Among the most consumed vegetables, broccoli appears to be one of the best inducers of mammalian detoxification enzymes associated with a reduced risk of developing various chronic conditions and diseases. (Dominguez-Perles et al., 2011). In fact, epidemiological studies have shown an inverse association between the consumption of Brassica vegetables and the risk of cancer (Day et al., 1994). Of the case-controlled studies, 56% demonstrate a strong association between increased broccoli consumption and protection against cancer (Verhoeven et al., 1996). In the recent years, health conscious consumers have an increasing demand for young seedlings and florets of broccoli to prevent health conditions (Fahey et al., 2002) beyond basic nutrition. Floral heads of broccoli are composed of hundreds of florets arranged in whorls on top of the stem, and are harvested during the immature stage when florets are composed of male and female reproductive structures surrounded by immature petals and enclosed with chlorophyll-containing sepals.

Apart from the presence of bioactive compounds, it is necessary to characterize each cultivar according to its appearance and texture, what is known as “external quality parameters”. For broccoli plants, the external parameters are basically defined by the broccoli head firmness, tissue turgidity and head colour. The quality loss is visually observed in symptoms such as loss of turgid and yellowing, due to the fact that freshly harvested heads of broccoli contain an abundance of immature, chlorophyll-rich florets, that rapidly senesce (Eason et al., 2005; Eason et al., 2007b; Hansen et al., 2001; Izumi et al., 1996).

The presence and abundance of the bioactive compounds and the alteration of the external parameters after harvest have been described as being dependent on genetic

(cultivar), physiological (organ and age) and abiotic factors (Dominguez-Perles et al., 2011; Fernández-León et al., 2011a).

From an economical point of view the agricultural interests on broccoli crops have risen in the south-west regions of Spain in the last few years. Broccoli has become an interesting alternative for winter productions since the same lands used for summer crops could be used for broccoli cultivation. Thus, the profit of the same land increases notoriously.

This research work was designed to evaluate the main bioactive compounds and the external quality parameters of two broccoli cultivars grown in the south west region of Spain. The selected cultivars represent almost the totality production of broccoli in this region and are widely known worldwide. Having accurate information about the influence of the cultivar on the bioactive compounds and the external quality will be useful for those consumers that demand food products with high nutritional values health benefits, and high quality standards.

2.- Materials and methods

2.1.- Plant material

Broccoli ‘Parthenon’ and ‘Monaco’ plants were grown in an alluvial soil with a sandy-loam texture, slightly acidic, and with a low organic material content. The crop was located at the experimental fields located in Vegas Bajas del Guadiana in Extremadura (Spain). Plants were harvested during the first week of February 2009, and samples were rapidly transported to the laboratory where they were stored according the experimental design. A total of 12 fresh broccoli head samples were analyzed for each broccoli cultivar.

2.2.- Physico-chemical parameters

2.2.1.- Weight

Weight of individual heads was recorded at the harvest day and was expressed as gram per head (g/head).

2.2.2.- Firmness

Firmness was measured using a Stable Micro Systems Texture Analyzer TA-XT2i (Aname, Spain) through a compression assay on the whole broccoli head. The force was applied to produce a 2% deformation by a 100 mm aluminium plate. Force/deformation curves were recorded using the computer programme of the texture analyser and the maximum force (N) was calculated.

2.2.3.- Colour

Colour parameters (L^* , a^* and b^*) were measured in colour space CIELab by a Konica Minolta CM-3500d spectrophotometer (Aquateknica, S.A., Madrid, Spain) using the illuminant D65, diffuse illumination, a viewing angle of 8° and a measurement circular area of 30 mm diameter. Measurements were performed in different locations of each broccoli head.

2.2.4.- Moisture content and soluble solids content

For moisture content determination, a broccoli homogenate was prepared with 10 florets; 5.0 g of that homogenate were weighted before and after keeping it in a Selecta Vaciotem vacuum oven (Andaluza de Instrumentación, S.L., Mairena del Aljarafe, Seville, Spain) at 70°C for 16 hours. Moisture content was determined by difference of both weights, and the result was expressed as percentage.

The soluble solids content (SSC) of the juice from a homogenate, obtained from 10 broccoli florets, was determined by refractometry using an RE40 refractometer (Mettler Toledo, Madrid, Spain), results were expressed as $^\circ\text{Brix}$. A lab blender was used for homogenate preparation (Moulinex, Madrid, Spain).

2.3. Bioactive compounds analysis

2.3.1.- Ascorbic acid and antioxidant activity

Ascorbic acid was determined following a previously published method of our group (Bernalte et al., 2007). The quantification was carried out by the external standard calibration method and the results were expressed as mg of ascorbic acid/100 g of fresh weight (FW).

Antioxidant activity (AA) was evaluated according to the slightly modified procedure proposed by Cano et al. (1998). Results were expressed as mg of Trolox/100 g of fresh weight.

2.3.2.- Carotenoid and chlorophyll pigments determination

Carotenoid pigments were determined by HPLC according to Mínguez-Mosquera and Hornero-Méndez (1993) method slightly modified by García et al. (2007), from the saponified acetone extracts of broccoli plants. The pigments were quantified by external standard calibration, and results were expressed as mg of β -carotene and mg of lutein/100 g of fresh weight (González-Gómez et al., 2011).

Chlorophyll A and B contents were determined using multivariate calibration by means of Partial Least Squares (PLS) (Fernández-León et al., 2010). The results were expressed as mg/100 g of fresh weight.

2.3.3.- Total and individual phenolic compounds determination

The determination of total phenolic content (TPC) was performed according to Bernalte et al. (2007) and Lima et al. (2005) from 1g of lyophilized broccoli powders. The results were expressed as mg of chlorogenic acid equivalent/100 g of fresh weight.

After acidic hydrolysis, the aglycons of individual phenolic compounds were chromatographic determined using a high-performance liquid chromatography instrument coupled to an Ion Trap mass spectrometer (Varian 500-MS, Varian Ibérica S.L., Spain). HPLC separation was performed on a 150 mm x 2.0 mm (3 μ m) Pursuit C18 reversed-phase column following the method published by Vallejo et al. (2002). For aglycons identification, the mass spectrometer was tuned by direct infusion of standards, producing maximum abundant precursor ions and fragment ions signals during MS/MS. Thus, three derivatives of phenolic acids (gallic acid, chlorogenic acid and sinapic acid) and two flavonoids (quercetin and kaempferol) were identified. For the quantification, standard calibration curves were made with these compounds using these mass spectrometric conditions. Results were expressed in mg/100 g of fresh weight, for each compound.

2.3.4.- Intact glucosinolates determination

Intact glucosinolates were extracted following Kiddle and Vallejo slightly modified methods (Kiddle et al., 2001; Vallejo et al., 2003b). A high-performance liquid chromatography instrument coupled to an Ion Trap mass spectrometer (Varian 500-MS, Varian Ibérica S.L., Madrid, Spain) was used for the intact glucosinolates separation and determination from the broccoli extracts.

The chromatographic separation was performed on a 150 mm x 2.0 mm (3 μ m) Pursuit C18 reversed-phase column with a Varian security guard column. The column oven temperature was set at 40 °C and the injected volume was 10 μ L. The composition of the mobile phase varied linearly from 100% A (0.1 mL formic acid/100 mL) to 15% B (methanol MS-MS) in 15 min, to 40% B in 5 min, to 50% B in 5 min, and returned to 100% A in 5 min at a flow rate of 200 μ L/min. The mass spectrometer was tuned by direct infusion of sinigrin standard solution producing maximum abundant precursor ion m/z 358 ($[M-H]^-$) and fragment ion m/z 97 ($[SO_3H]^-$) signals during MS/MS (Tian et al., 2005). The following transitions were used to assay 11 individual glucosinolates: glucoraphanin (436>97), glucoiberin (422>97), sinigrin (358>97), progoitrin (388>97), glucobrassicin (447>97), glucoalysin (450>97), gluconasturtiin (422>97), 4-methoxyglucobrassicin (477>97), neoglucobrassicin (477>97), gluconapin (372>97) and glucobrassicinapin (386>97). These glucosinolates were quantified using the calibration curve of sinigrin (Sigma-Aldrich Spain, Madrid, Spain) as an external standard and expressed as μ mol of sinigrin equivalent/100 g of fresh weight (Fernández-León et al., 2011b).

2.4.- Analytical figures of merit and methods validation

The extraction efficiency and the analytical figures of merit such as coefficient of determination (R^2), limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) were calculated for every analytical method proposed in this work (Espinosa-Mansilla et al., 2005). The chemometric procedure to quantify the amount of chlorophylls was validated in our previously published work (Fernández-León et al., 2010). To establish the extraction recovery rate for each group of bioactive compounds, standard solutions were extracted following the procedure described above. To determine the recovery of

the extraction procedure, the chromatographic peak areas before extraction were compared with the peak areas of same concentration standard solutions.

2.5.- Statistical analysis

For statistical studies SPSS 15.0 software was used (SPSS Inc. Chicago, IL, USA). Correlations were estimated with the Pearson test at $p < 0.05$ and 0.01 significance level. Data are expressed as means \pm SD of six independent analysis and samples. Mean values were analyzed by Student's test.

3.- Results and discussion

Both cultivars were harvested with appropriate maturity indices, with around 20 cm of head diameter and all florets were closed and showed compactness.

All the parameters studied in broccoli were evaluated in order to determine qualitative and quantitative variations among the cultivars grown under similar conditions and using the same analytical procedures.

3.1.- Physico-chemical parameters

3.1.1.- Weight and firmness

Regarding weight and firmness, no statistical differences were observed between the two cultivars (Table 1). Similar behavior was observed in agronomical studies of these cultivars by Salguero et al. (2011) in which there were not significant differences between the weights per head. However, in our study we found that the weight was slightly greater in Parthenon (538.94 g/head) than in Monaco (526.47 g/head).

3.1.2.- Colour

Concerning the colour parameters (Table 1), no significant differences were observed for b^* values in both cultivars. However, significant differences were observed for lightness (L^*) and for a^* values in both cultivars. The value of L^* is statistically higher in Parthenon (34.45) than in Monaco cultivar (30.39). Apart from that, we also observed that the value of a^* was statistically higher in Monaco (-3.84)

than in Parthenon (-5.59). Higher a^* value indicates a decrease in green colour of the vegetable.

According to these results, Parthenon cultivar has a bright green coloration and the heads are more compact (more firmness to pressure) than Monaco cultivar. Therefore, Parthenon presents better quality indices than Monaco cultivar, according to the quality parameters in broccoli proposed by Cantwell and Suslow (1999).

3.1.3.- Moisture content and soluble solids content

Moisture content is summarized in Table 1. Significant differences were observed between the two cultivars studied in this work. Higher values were found in Monaco cultivar, and the values obtained were similar to those obtained by other authors such as Koh et al. (2009). On the other hand, no significant differences were found between the soluble solids values (Table 1) for both cultivars. According to the Pearson's test (Table 4), humidity and firmness values were correlated ($r=0.622$, $p<0.01$), this fact is mainly related to turgid and hydratation (Simón et al., 2008).

Table 1: External quality parameters (weight, firmness, colour, moisture content and soluble solids content) of 'Parthenon' and 'Monaco' broccoli cultivars.

Parameters	'Parthenon'	'Monaco'	Significance
Weight ¹	538.94±37.99	526.47±55.45	ns
Firmness ²	44.78±13.26	50.24±10.61	ns
L*	34.45±1.73	30.39±1.49	**
a*	-5.59±0.61	-3.84±0.52	**
b*	12.77±0.79	11.38±1.87	ns
Moisture content ³	87.92±0.06	89.00±0.29	**
SSC ⁴	9.33±0.10	9.49±0.25	ns

¹ Expressed as g/head.

² Expressed as Newton.

³ Expressed as percentage.

⁴ SSC: soluble solids content expressed as °Brix.

(**) means significantly differences among the values ($p<0.01$) and (ns) means no significance.

3.2. Bioactive compounds

The quality parameters of the proposed chromatographic analytical methods are summarized in Table 2. External standard calibration methods were employed for bioactive compounds quantification. In all cases, adequate coefficients of determination were calculated ($R^2 > 0.990$) and the values of the LOD and LOQ were appropriate for the identification and quantification of the studied compounds. Finally, regarding the extractive procedures, all recoveries were ranged between 88 to 99%. The recovery experiences were achieved by using standards, since not material of reference is available for the studied compounds.

Table 2: Analytical parameters of interest from the external standard method.

Compound	Calibration curve ^a	R ²	LOD ^b	LOQ ^b	Recovery ^c
Ascorbic acid	y=56.21x-19.84	0.998	0.87	2.90	88.24±3.16
β-carotene	y=37.02x+0.12	0.999	1.00	3.33	97.64±1.79
Lutein	y=114.17x+36.76	0.999	0.68	2.27	98.67±4.89
Gallic Acid	y=78350x-5558.1	0.998	0.31	1.03	99.21±1.44
Chlorogenic Acid	y=36161x-1157.3	0.993	0.72	2.41	98.29±3.99
Sinapic Acid	y=85780x+2493.2	0.997	0.44	1.47	95.41±3.23
Quercetin	y=105643x-92517	0.991	0.82	2.74	98.25±1.64
Kaempferol	y=108763x-77250	0.996	0.56	1.85	97.30±1.37
Sinigrin	y=16544x+11001	0.999	1.01	3.36	98.24±2.08

^a y is the signal and x is the concentration in µg/mL.

^b LOD: limit of detection, LOQ: limit of quantification, expressed as µg/mL.

^c expressed as percentage.

Broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*) is distinguished for having a great amount of health-promoting compounds such as phenolics, glucosinolates, carotenoids, chlorophylls and different vitamins (Borowski et al., 2008; Moreno et al., 2006; Tian et al., 2005; Vallejo et al., 2003a; Vallejo et al., 2003b; Vallejo et al., 2003c; Vallejo et al., 2003d). The content of these compounds varies depending on many factors (Kurilich et al., 1999), cultivar being the most important factor to understand bioactive compounds present in broccoli plants.

3.2.1.- Ascorbic acid and antioxidant activity

The contents of ascorbic acid and antioxidant activity (AA) are summarized in Table 3. The abundance of both parameters was statistically higher in Parthenon broccoli. For this cultivar, a concentration of 64.19 mg of ascorbic acid/100 g FW was quantified compared with the 45.24 mg of ascorbic acid/100 g FW quantified for Monaco. On the other hand, AA found in Parthenon (104.79 mg Trolox/100 g FW) was more than double the amount measured in Monaco (45.24 mg Trolox/100 g FW). The range of ascorbic acid and AA levels was similar to other reported values for the same cultivars (Favell, 1998; Koh et al., 2009; Kurilich et al., 1999; Singh et al., 2007; USDA/ARS, 2006; Vallejo et al., 2002; Vallejo et al., 2003a). According the Pearson's test, antioxidant activity and ascorbic acid values were highly correlated ($r=0.958$, $p<0.01$) (Table 4).

3.2.2.- Carotenoid and chlorophyll pigments

The contents of carotenoid and chlorophyll pigments are summarized in Table 3. The results obtained were comparable to other reported values (Fernández-León et al., 2010; García et al., 2005; Kurilich et al., 1999; Singh et al., 2007).

β -carotene was main carotene found in broccoli. Its concentration was significantly higher in Parthenon than in Monaco (0.80 and 0.71 mg β -carotene/100 g FW, respectively). On the other hand, measurable amounts of lutein were also found in both cultivars. For this pigment no significant differences were observed between them.

Lutein and β -carotene are found in the lipid soluble fractions of biological systems. These pigments protect cellular membranes by scavenging/quenching free radicals (Singh et al., 2007). Therefore, both compounds constitute the essential lipid-soluble antioxidants. Thus the amount of β -carotene has to be related to the AA. In fact, the Pearson's correlation test indicates a significant correlation, however the observed correlation was poor ($r=0.599$, $p<0.05$) (Table 4).

Table 3: Mean values of the bioactive compounds found in ‘Parthenon’ and ‘Monaco’ broccoli cultivars.

Parameters		‘Parthenon’	‘Monaco’	Significance
Ascorbic Acid ¹		64.19±3.65	45.24±2.97	**
AA ²		104.79±0.39 ^a	92.74±0.86 ^b	**
β-Carotene ¹		0.80±0.03	0.71±0.09	*
Lutein ¹		0.60±0.01	0.54±0.09	ns
Chlorophyll A ¹		9.38±1.17	8.07±0.74	*
Chlorophyll B ¹		3.24±0.42	3.23±0.39	ns
TPC ³		147.15±5.86	81.55±3.02	**
Phenolic Acids	Gallic Acid ¹	1.80±0.09	1.85±0.34	ns
	Chlorogenic Acid ¹	1.38±0.23	0.96±0.10	**
	Sinapic Acid ¹	1.25±0.56	0.64±0.01	*
Flavonoids	Quercetin ¹	6.02±0.22	4.44±0.09	**
	Kaempferol ¹	3.29±0.32	2.28±0.14	**

¹ Expressed as mg/100 g fresh weight.

² AA: antioxidant activity expressed as mg Trolox/100 g fresh weight.

³ TPC: Total phenolic compounds expressed as mg of chlorogenic acid equivalent/100 g fresh weight.

(*) means significantly differences among the values ($p < 0.05$).

(**) means significantly differences among the values ($p < 0.01$) and (ns) means no significance.

^a 40.0% due to the ascorbic acid.

^b 34.2% due to the ascorbic acid.

With regard of the chlorophyll pigments (Table 3), chlorophyll A was the most abundant pigment found in the studied broccolis, being its amount higher in Parthenon than in Monaco (9.38 and 8.07 mg chlorophyll A/100 g FW, respectively). Similar results were reported by other authors for other green vegetables (Burns et al., 2003; García et al., 2005; Khachik et al., 1986). No significant differences were observed between chlorophyll B according to the broccoli cultivar.

Chlorophylls are the most abundant phytochemical pigments in higher plants. Since Lai et al. (1980) showed a relationship between antimutagenic and antioxidant activity and chlorophyll content of a number of common vegetable extracts, numerous derivatives have been identified as potential antimutagens.

Also, derivatives of chlorophyll A were found to be more effective radical quenchers than those of chlorophyll B (Ferruzzi et al., 2002). Thus in this study,

chlorophyll A content was related to antioxidant activity found in these two cultivars of broccoli ($r=0.590$, $p<0.05$) (Table 4).

Table 4: Correlations among the different studied parameters expressed as Person's correlation coefficients.

	Firmness	β -Carotene	Lutein	Chlorophyll A	Chlorophyll B	AA ¹
Moisture content	0.622**					
a*			0.961**	-0.695**	-0.706**	
b*		0.353*	0.653**			
β -Carotene						0.599*
Chlorophyll A						0.590*
Ascorbic Acid						0.958**
TPC ²						0.987**
Phenolic Acids ³						0.787**
Flavonoids ⁴						0.972**
Total Glucosinolates						0.967**

¹ AA: antioxidant activity.

² TPC: Total phenolic compounds.

³ Phenolic Acids: gallic, chlorogenic and sinapic acids.

⁴ Flavonoids: quercetin and kaempferol.

* Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

** Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

A relationship between the colour parameters, carotenoids and chlorophyll pigments was established. According to the Pearson's correlation test (Table 4), the parameter a* was correlated with chlorophyll A, chlorophyll B and lutein ($r=-0.695$, $r=-0.706$ and $r=0.961$, $p<0.01$, respectively) and the parameter b* was correlated with β -carotene ($r=0.353$, $p<0.05$) and lutein ($r=0.653$, $p<0.01$). These correlations are explained by the fact that the colour changes are related to the yellowing process of broccoli inflorescences and the degradation of carotenoids and chlorophylls pigments (Eason et al., 2007b; King and Morris, 1994).

3.2.3.- Total and individual phenolic compounds

Total phenolic compounds (TPC) are summarized in Table 3 and expressed as mg of chlorogenic acid equivalents/100 g FW. The TPC contents found in both cultivars were in accordance with the values reported in the literature (Koh et al., 2009; Sousa et al., 2008). The measured amounts were statistically different between both cultivars,

being the TPC content in Parthenon higher than in Monaco cultivar (147.15 and 81.55 mg of chlorogenic acid equivalents/100 g FW, respectively). In addition, high values of antioxidant activity were strongly associated (Person's correlation coefficient $r=0.987$, $p<0.01$) with high content of phenolic compounds in this plant (Ou et al., 2002; Podsedek, 2007; Wu et al., 2004) (Table 4).

Considering the individual phenolic compounds (Table 3), our findings are consistent with previously published works (Koh et al., 2009; USDA/ARS, 2007; Vallejo et al., 2003c; Vallejo et al., 2003d) where quercetin was the most abundant followed by kaempferol. Significant differences were observed in the contents of phenolic acids and flavonoids determined between both cultivars of broccoli. The contents were higher in Parthenon (1.38 mg chlorogenic acid, 1.25 mg sinapic acid, 6.02 mg quercetin and 3.29 mg kaempferol per 100 g FW) than in Monaco cultivar (0.96 mg chlorogenic acid, 0.64 mg of sinapic acid, 4.44mg quercetin and 2.28 mg kaempferol per 100 g FW), except in the case of gallic acid, where are no statistically difference was observed between the two cultivars.

Table 4 summarizes the correlations, according to the Pearson's test, between antioxidant activity values and phenolic acid contents ($r=0.787$, $p<0.01$) and flavonoid contents ($r=0.972$, $p<0.01$). Flavonoid compounds are very abundant in the brassicas and therefore contribute most to the antioxidant activity of these vegetables (Fernández-León et al., 2011a; Ou et al., 2002; Podsedek, 2007; Wu et al., 2004).

3.2.4.- *Intact glucosinolates*

Isothiocyanates are derived from the hydrolysis of glucosinolates (GS) and have been confirmed to show protective effects against cancer (Fahey, et al., 2001; Keck et al., 2002; Keck and Finley, 2004; Verhoeven et al., 1996). Some of them are sulforaphane derived from glucoraphanin, phenethyl isothiocyanate derived from gluconasturtiin, allyl isothiocyanate from sinigrin; indole-3-carbinol from glucobrassicin and crambene from progoitrin (Keck and Finley, 2004; Schreiner et al., 2006; Schreiner et al., 2007). According to this, glucosinolates have been arranged in Table 5 taking into account their chemical structure. The reported results are in agreement with previous

studies for other broccoli cultivars (Kushad et al., 1999; Tian et al., 2005; Vallejo et al., 2002).

Table 5: Intact glucosinolates contents measured in ‘Parthenon’ and ‘Monaco’ broccoli cultivars.

Glucosinolates	‘Parthenon’	‘Monaco’	Significance
<i>Alkyl GS</i>			
Glucoraphanin ¹	2.33±0.03	2.03±0.65	ns
Glucoiberin ¹	0.12±0.03	1.17±0.24	**
Glucoalyssin ¹	0.57±0.10	1.39±0.20	**
<i>Alkenyl GS</i>			
Sinigrin ¹	0.57±0.03	0.23±0.09	**
Gluconapin ¹	13.88±0.33	15.35±0.97	**
Glucobrassicinapin ¹	53.89±3.00	46.88±2.40	**
<i>Hydroxyalkenyl GS</i>			
Progoitrin ¹	0.92±0.17	0.77±0.18	ns
Total Aliphatic GS¹	72.28±3.35	67.83±2.19	*
Glucobrassicin ¹	113.93±0.56	87.30±8.52	**
4-Methoxyglucobrassicin ¹	6.31±0.23	5.00±0.43	**
Neoglucobrassicin ¹	0.50±0.11	0.57±0.26	ns
Total Indole GS¹	120.73±0.59	92.87±8.96	**
Gluconasturtiin	10.83±0.18	3.74±0.31	**
Total Aromatic GS¹			
Total Glucosinolates¹	203.85±3.52	164.44±9.66	**

¹ Expressed as μmol of sinigrin equivalent/100 g fresh weight.

(*) means significantly differences among the values ($p < 0.05$).

(**) means significantly differences among the values ($p < 0.01$) and (ns) means no significance.

Significant differences were observed between broccoli cultivars in terms of total aliphatic glucosinolates. For this group of compounds, Parthenon exhibited higher amounts than Monaco cultivar (72.28 and 67.83 μmol sinigrin equivalent/100 g FW, respectively). However, within the aliphatic glucosinolates different behaviours could be observed depending on the alkyl, alkenyl or hydroxyalkenyl chemical structure. Glucoiberin, glucoalyssin (alkyl GS) and gluconapin (alkenyl GS) abundances were higher in Monaco (1.17, 1.39 and 15.35 μmol sinigrin equivalent/100 g FW, respectively) than in Parthenon cultivar (0.12, 0.57 and 13.88 μmol sinigrin equivalent/100 g FW, respectively). Nevertheless, sinigrin and glucobrassicinapin

(alkenyl GS) were most abundant in Parthenon (0.57 and 53.89 μmol sinigrin equivalent/100 g FW, respectively) than in Monaco cultivar (0.23 and 46.88 μmol sinigrin equivalent/100 g FW). On the other hand, no significant differences were observed for glucoraphanin (alkyl GS) and progoitrin (hidroxyalkenyl GS), anticarcinogenic isothiocyanates precursors. In contrast to other studies (Tian et al., 2005; Verkerk et al., 2009) glucoraphanin was not the most abundant glucosinolate founded in the broccoli cultivars studied in our work.

Indole derivates constitutes the most numerous glucosinolates in both cultivars (Table 5). Higher concentratios of total indole glucosinolates were quantified in Parthenon (120.73 μmol sinigrin equivalent/100 g FW), while in Monaco a total of 92.87 μmol sinigrin equivalent/100 g FW was measured. Getting into details, indole glucosinaltes exhibit two different behaviors: the contents of glucobrassicin and 4-methoxyglucobrassicin were higher in Parthenon cultivar (113.93 and 6.31 μmol sinigrin equivalent/100 g FW, respectively) than in Monaco cultivar (87.30 and 5.00 μmol sinigrin equivalent/100 g FW, respectively); and for neoglucobrassicin no statistically differences were found. Glucobrassicin is the precursor of the indol-3-carbinol (anticarcinogenic isothiocyanate) and as it is shown in Table 5, this compound is the most abundant glucosinolate in both cultivars. Similar results were reported for other broccoli cultivars (Vallejo et al., 2002).

Among the aromatic glucosinolate, gluconasturtiin was determinant in both cultivars (Table 5). It was observed that gluconasturtiin content was higher in Parthenon (10.83 μmol sinigrin equivalent/100 g FW) than in Monaco cultivar (3.74 μmol sinigrin equivalent/100 g FW).

Finally, the results summarized in Table 5 show significant differences in the concentration of total glucosinolates for the studied cultivars, being higher in Parthenon (203.85 μmol sinigrin equivalent/100 g FW) than in Monaco cultivar (164.44 μmol sinigrin equivalent/100 g FW).

In Brassica vegetables, different species of the same genus and different cultivars of the same species have highly variable GS concentrations (Ciska et al., 2000; Fahey et al., 2001; Kushad et al., 1999). Additionally, glucosinolates are characterized

by their high antioxidant capacity (Moreno et al., 2006; Verkerk et al., 2009). Therefore, as shown in Table 4, exist a strong correlation between the total content of glucosinolates and antioxidant activity ($r=0.967$, $p<0.01$).

4. Conclusions

After comparing the results obtained in this research work, in general, no significant differences were observed in the external quality parameters among the studied cultivars, except in the colour and in the moisture content. Parthenon florets are greener and brighter than Monaco, an important factor highly valued by consumers. Regarding the bioactive compounds, we found that Parthenon was richer in phenolic compounds, carotenoids, phenolic acids, flavonoids and glucosinolates. In addition, this cultivar exhibited higher values of Vitamin C and *in vitro* antioxidant activity. The highest differences were observed for the total phenolic compounds, where the amount in Parthenon was around 50% higher than in Monaco. In addition, it was remarkable the elevated amounts of gluconasturtiin found in Parthenon, this glucosinolate is the precursor of the anticancer compound phenethyl isothiocyanate.

Acknowledgements

D.G.G. and M.F.F.L. are grateful to the “Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria” (INIA) of Spain for his research contract (DOC-INIA) and for her doctoral scholarship. Part of this research has been fund by Junta de Extremadura and FEDER (Project GR10006) and Project “Red de Investigación Transfronteriza Extremadura-Centro-Alentejo (RITECA-II)”.

4.1.d.- Quality evaluation of two Savoy cabbage cultivars: physicochemical parameters and bioactive compounds

Journal of Food Quality (under revision)

M.F. Fernández-León¹, A.M. Fernández-León¹, M. Lozano¹, M.C. Ayuso², D. González-Gómez^{1,3}

¹Technological Institute of Food and Agriculture (INTAEX), Junta de Extremadura. Ctra Cáceres S/N, 06071 Badajoz, Spain.

²Agriculture Engineering School, University of Extremadura, Ctra. Cáceres S/N, 06007 Badajoz, Spain.

³Current address: Department of Analytical Sciences, Science School, The National University of Distance Education (UNED), Paseo Senda del Rey, 9, 28040 Madrid, Spain.

Abstract

The aim of this research work was to identify, quantify and compare the quality parameters of two Savoy cabbage cultivars grown in west of Spain, under similar conditions. For this study, the physicochemical parameters and bioactive compounds content, as well as the *in vitro* antioxidant activity of ‘Dama’ and ‘Leticia’ Savoy cabbage cultivars were evaluated. According to the bioactive compounds, we found that ‘Dama’ presented in general better results when compared with ‘Leticia’. ‘Dama’ exhibited higher concentrations of chlorophyll A (2.26 mg/100 g fresh weight), total phenolic content (102.71 mg of chlorogenic acid equivalent/100 g fresh weight) and total intact glucosinolates (195.22 µmol of sinigrin equivalent/100 g fresh weight). There were also differences on the physicochemical parameters between the two studied cultivars; ‘Dama’ cultivar showed a significantly higher negative colour a* value (-10.69), and ‘Leticia’ cultivar stood out in crunchiness (104.00 N/g) and soluble solid content (9.84 °Brix).

Keywords: antioxidant activity; *Brassica oleracea* L. var. *sabauda*; crunchiness; glucosinolates; phenolic compounds; pigments.

1. Introduction

In recent years, increasing attention has been paid to the role of diet in human health. Several epidemiological studies have indicated that a high intake of plant products is associated with a reduced risk of a number of chronic diseases, such as atherosclerosis and cancer (Gossiau and Chen, 2004; Gundgaard et al., 2003; Temple, 2000). These beneficial effects have been partly attributed to the compounds, which possess antioxidant activity. The major antioxidants of vegetables are vitamins C, carotenoids, chlorophylls, phenolic compounds and glucosinolates (Podsdek, 2007).

Those antioxidants may act together to reduce reactive oxygen species level, more effectively than single dietary antioxidants, because they can act as synergists (Ohr, 2004; Rossetto et al., 2002; Trombino et al., 2004).

Brassica is a wide plant family that include different genus of cultivated plants, collectively called Brassica vegetables. Within the *Brassica oleracea* species, various types of cabbages are comprised (white, red, Savoy, Chinese), cauliflower, broccoli, Brussels sprouts and kale. These vegetables possess antioxidant and anticarcinogenic properties (Chu et al., 2002; Cohen et al., 2000).

Cabbage is one of the most important vegetables grown worldwide. The different cultivated types of cabbage show great variation in respect of size, shape and colour of leaves as well as size, shape, colour and texture of the head (Singh et al., 2006). Nieuwhof (1969) categorized the different forms of cultivated cabbage into white cabbage, red cabbage and Savoy cabbage.

According to the statistical figures in Spain the acreage and production of Savoy cabbage were 1738 ha and 70664 kg/ha, respectively in the year 2009, and both, acreage and production have increased by 35% and 53%, respectively from 2006 to 2009 (MAGRAMA, 2010). Moreover, according to FEPEX (Spanish Federation of Producers and Exporters of Fruits and Vegetables) consumption of cabbage in Spain has also increased from 1.64 to 1.99 kg per person from 2006 to 2010, this may be because the benefits of these vegetables are becoming better known by the consumers.

The variation in quality parameters of Brassica vegetables is caused by many factors such as cultivar, maturity at harvest, growing conditions, and post-harvest storage conditions (Jeffery et al., 2003; Singh et al., 2007; Vallejo et al., 2002; Van der Berg et al., 2000).

Thus, this study was planned to quantify the antioxidants compounds (vitamin C, carotenoids, chlorophylls, phenolic compounds and glucosinolates) and physicochemical parameters in two Savoy cabbage cultivars. Having accurate information about the influence of the cultivar on the bioactive compounds and the external quality will be useful for those consumers that demand food products with high nutritional values health benefits, and high quality standards.

2. Materials and methods

2.1. Plant material

Savoy cabbages ‘Dama’ and ‘Leticia’ (Syngenta Seeds BV, Netherland) plants were grown under the same conditions. The crop was located at the experimental fields of “La Orden-Valdesequera” placed in Extremadura (south west region of Spain), in an alluvial soil with a sandy-loam texture, slightly acidic, and with a low organic material content. Plants were harvested during the second week of December 2009, and samples were rapidly transported to the laboratory. A total of 12 fresh Savoy cabbage heads were analyzed for each cultivar. Some determinations were performed on the complete cabbage head (colour and compactness). Another determination were done in fresh samples, the day after harvest, and around 20 to 30 Savoy cabbage leaves were randomly selected, external, middle and internal leaves from the cabbage heads, and vacuum packed using plastic bags and stored at -80 °C for further analysis.

2.2. Physico-chemical parameters

2.2.1. Colour

Colour parameters (L^* , a^* and b^*) were measured in the colour space CIELab by a Konica Minolta CM-3500d spectrophotometer (Aquateknica, S.A., Madrid, Spain) using the illuminant D65, diffuse illumination, a viewing angle of 8° and a measurement

circular area of 30 mm diameter. Measurements were performed in five different location of each Savoy cabbage head, after removing the external wrapper leaves.

2.2.2. Compactness and Crunchiness

Compactness was measured using a Stable Micro Systems Texture Analyzer TA-XT2i (Aname, Madrid, Spain) through a compression assay on the whole Savoy cabbage head. The force was applied to produce a 2% deformation by a 100 mm diameter aluminium plate. Force/deformation curves were recorded using the computer programme of the texture analyser and the maximum force (N) was registered.

Crunchiness was measured using Kramer test in a Micro Systems Texture Analyzer TA-XT2i with 5-blade and slotted box attachments and the 30-kg load cell (Aname, Madrid, Spain). About 4 g of leaves, from different depths of the Savoy cabbage head, were placed in the Kramer box, squared cut with its dimensions. Peak force (N) was recorded and crunchiness was reported as N/g.

2.2.3. Moisture and soluble solids content

Firstly, a Savoy cabbage homogenate was prepared with around 20 to 30 fresh Savoy cabbage leaves, with a lab blender (Moulinex, Madrid, Spain). For moisture content determination, about 5 g of that homogenate were weighted before and after keeping it in a Selecta Vaciotem vacuum oven (Andaluza de Instrumentación, S.L., Mairena del Aljarafe, Seville, Spain) at 70 °C for 16 hours. Moisture content was determined by difference of both weights, and the result was expressed as percentage. The soluble solid content (SSC) of the juice from the homogenate was determined by refractometry using an RE40 refractometer (Mettler Toledo, Madrid Spain), results were expressed as °Brix.

2.2.4. pH

An automatic pH titrator (Mettler Toledo DL50 Rondolino, S.A., Madrid, Spain) was used for pH measurements, about 3 g of the prepared homogenate were mixed with 60 mL of deionized water to make this determination.

2.3. Bioactive compounds analysis

2.3.1. Ascorbic acid and antioxidant activity

For the determination of ascorbic acid, 5 g of fresh tissue was homogenized in a blender and extracted with a solution of phosphoric acid (5%) and EDTA (1%) according to Bernalte et al. (2007) method. The separation and identification was achieved in a HPLC Agilent 1200 chromatograph with a Zorbax SB-C8 column of 5 μ m, 250 mm x 4.6 mm. For the chromatographic separation an acetic-acid/acetate (50 mM pH=4) buffer was used as mobile phase, and a diode-array system was used as detector (λ =260 nm). Ascorbic acid was quantified by the external standard calibration method and the results were expressed as mg of ascorbic acid/100 g of fresh weight (FW).

Antioxidant activity (AA) was evaluated according to Cano et al. (1998) procedure with slight modifications. Briefly, 1 mL of the radical cation ABTS (2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazolone 6-sulphonate)) was placed in a spectrometric cuvette and 20 μ L of the cabbage fresh juice was added. The measurement was carried out in a UV-2450 PC Shimadzu UV-vis spectrophotometer (Shimadzu Corporation, Japan). The initial absorbance value at 730 nm was then compared with the absorbance obtained after 20 min of reaction. The results were expressed as mg of Trolox/100 g of fresh weight.

2.3.2. Carotenoid and chlorophyll pigments determination

The carotenoid composition was determined by HPLC (Mínguez-Mosquera and Hornero-Méndez, 1993). About 10 g of Savoy cabbage leaves were extracted with acetone, saponified overnight to remove the chlorophylls, and the obtained extracts were injected in an Agilent 1100 chromatograph, equipped with an RP-18 Lichrosorb column of 10 μ m, 200 mm x 4.6 mm, and diode-array detector (460 nm). The initial mobile phase was acetone:water (75:25) for 5 min, raised to 95:5 over 10 min (García et al., 2007). The pigments were quantified by external standard calibration, and results were expressed as mg of β -carotene and mg of lutein/100 g FW (González-Gómez et al., 2011).

Chlorophyll extraction was performed according to our previous work (García et al., 2005). Briefly, to extract chlorophyll pigments from plant tissue around 4 g from plant homogenate was accurately weighted and 15.0 mL of acetone was mixed into a centrifuge flask placed in an ice bath. After 1min of homogenization using an Omni Mixer homogenizer (Omni International, GA, USA), samples were centrifuged for 15 min at 14,000 rpm at 4 °C. Samples were extracted three times and supernatants were then filtered into a 50.0 mL volumetric flask using acetone as solvent to complete the final volume. After pigment extraction plant homogenate was completely discolored (color changed from green to whitish). Before spectra measurement, samples were filtered through a 0.45 µm nylon filter. Photometric spectra were recorded between 600 nm and 700 nm in a UV-2450 UV-vis spectrophotometer (Shimadzu Scientific Instruments, Inc., Columbia, MD, USA). Chlorophyll A and B contents were determined using multivariate calibration by means of Partial Least Squares (PLS) (Fernández-León et al., 2010). The results were expressed as mg/100 g of fresh weight.

2.3.3. Total and individual phenolic compounds determination

The determination of total phenolics compounds (TPC) was performed according to Lima et al. (2005). Briefly, about 1g of lyophilized cabbage powder was extracted with 30 mL of extractive solvent (80% aqueous ethanol, containing 1% concentrated HCl) and the sample was stirred using a magnetic mixer for 20 min, in the absence of light, at room temperature (25 °C) and filtered. The extraction process was repeated three times. The ethanolic extracts were combined, evaporated and reconstituted to a final volume of 100 mL with ultrapure water. The total phenolics content was measured spectrophotometrically at 760 nm (Bernalte et al., 2007) using the Folin-Ciocalteu reagent (Singleton and Rossi, 1965). The results were expressed as mg of chlorogenic acid equivalent/100 g FW.

After acidic hydrolysis, the aglycons of individual phenolic compounds were chromatographic determined using a high-performance liquid chromatography instrument coupled to an Ion Trap mass spectrometer (Varian 500-MS, Varian Ibérica S.L., Madrid, Spain). HPLC separation was performed on a Pursuit C18 reversed-phase column of 3 µm, 150 mm x 2.0 mm, following the chromatographic method published by Vallejo et al. (2002). For aglycons identification, the mass spectrometer was tuned

by direct infusion of standards, producing maximum abundant precursor ions and fragment ions signals during MS/MS. Thus, three derivatives of phenolic acids (gallic acid, chlorogenic acid and sinapic acid) and two flavonoids (quercetin and kaempferol) were identified. Standard calibration curves were made with these compounds using these mass spectrometric conditions, for the quantification and the results were expressed in mg/100 g FW, for each compound.

2.3.4. Intact glucosinolates determination

Intact glucosinolates were extracted following Kiddle and Vallejo slightly modified methods (Kiddle et al., 2001; Vallejo et al., 2003b). Briefly, 0.2 g of lyophilized Savoy cabbage powder was mixed with 7 mL of 70% methanol solution and it was heated and mixed at 70 °C for 10 min, after that, it was filtered using glass wool. The collected extracts were filtered through 0.45 µm nylon filter before injected into the chromatographic system. A high-performance liquid chromatography instrument coupled to an Ion Trap mass spectrometer (Varian 500-MS, Varian Ibérica S.L., Madrid, Spain) was used for the intact glucosinolates separation and determination from the cabbage extracts.

The chromatographic separation was performed on a Pursuit C18 reversed-phase column of 3 µm, 150 mm x 2.0 mm, with a Varian security guard column. The chromatographic conditions used were described by Fernández-León et al. (2012) and Tian et al. (2005). The identified glucosinolates were quantified using the calibration curve of sinigrin (Sigma-Aldrich) as an external standard and expressed as µmol of sinigrin equivalent/100 g FW (Fernández-León et al., 2011b).

2.4. Statistical analysis

For statistical studies SPSS 15.0 software was used (SPSS Inc. Chicago, IL, USA). Correlations were estimated with the Pearson test at $p < 0.05$ and at 0.01 significance level. Data are expressed as means \pm SD of six independent analysis and samples. Mean values were analyzed by Student's test.

3. Results and discussion

Both cultivars were harvested according the head size and when they were compact and firm to the touch. All the parameters studied in Savoy cabbage were evaluated in order to determine qualitative and quantitative variations among the cultivars grown under similar conditions and using the same analytical procedures.

3.1. Physico-chemical parameters

3.1.1. Colour

Concerning the colour parameters (Table 1), no significant differences were observed for lightness (L^*) and b^* values in both cultivars. However, significant differences were observed for a^* values. ‘Leticia’ presenten a statistically higher a^* value (-9.36) in comparison with ‘Dama’ cultivar (-10.69), that presented the most intense green color as it showed the higher negative a^* value.

After trimming the external wrapper leaves, cabbage heads should exhibit the typical color of the cultivar (green, red, or pale yellow-green), according to the quality indices in cabbage proposed by Cantwell and Suslow (2005). Based on these results, Dama cultivar has greener coloration than Leticia cultivar, whose typical color is pale yellow-green.

3.1.2. Compactness and crunchiness

The compactness and crunchiness values are shown in Table 1. No significant differences were observed for compactness in both cultivars studied. Maturity is based on head compactness, a compact and firm head can be only slightly compressed with moderate hand pressure, and can be harvested; and a very loose head is immature (Cantwell and Suslow, 2005).

On the other hand, significant differences were observed for crunchiness. The leaves of the Savoy cabbage are crinkled and thinner than common cabbage, and should be crisp and turgid according to the quality indices in cabbage proposed by Cantwell and Suslow (2005). Therefore, according to these results, ‘Leticia’ cultivar had greater crunchiness value (104.00 N/g) than ‘Dama’ cultivar (71.98 N/g).

Table 1: External quality parameters (colour, compactness, crunchiness, moisture content, soluble solids content and pH) of ‘Dama’ and ‘Leticia’ Savoy cabbage cultivars.

Parameters	‘Dama’	‘Leticia’	Significance
L*	62.63±4.68	59.39±3.43	ns
a*	-10.69±0.22	-9.36±0.72	*
b*	30.55±1.66	30.75±2.31	ns
Compactness ¹	56.76±5.63	55.67±7.19	ns
Crunchiness ²	71.98±7.64	104.00±14.28	**
Moisture content ³	88.80±0.05	88.00±0.12	*
SSC ⁴	6.93±0.20	9.84±0.14	**
pH	6.21±0.08	5.92±0.08	**

¹ Expressed as N.

² Expressed as N/g.

³ Expressed as percentage.

⁴ SSC: soluble solids content expressed as °Brix.

(*) means significantly differences among the values ($p < 0.05$).

(**) means significantly differences among the values ($p < 0.01$) and (ns) means no significance.

3.1.3. Moisture and soluble solids content

Water is the main component of *Brassica* spp. Moisture contents values were summarized in Table 1. Significant differences were observed between the two cultivars studied in this work. A value slightly higher was found in ‘Dama’ cultivar (88.80%) than in ‘Leticia’ cultivar (88.00%), and these values obtained for both cultivars were similar to those obtained by other authors such as Martínez et al., (2010), Podsedek et al., (2006) and Salunkhe and Kadam (1998) for Savoy cabbage.

According to the Pearson’s test (Table 2), moisture and crunchiness values were inversed correlated ($r = -0.813$, $p < 0.01$). Therefore, the cultivar ‘Leticia’ is crisper and has a lower in moisture content, thus ‘Leticia’ cultivar has better aptitude than the ‘Dama’ cultivar for its used in fresh-cut products and fresh salads.

The sugar content is a basic parameter used in evaluating quality attributes of vegetables and is commonly estimated as soluble solids content (SSC), although there are other constituents as organic acids, amino acids and pectins, that also contribute to SSC. These components are often evaluated in fruit and vegetables, since they are critical to the overall sensory quality (Ayaz et al., 2006).

The results revealed significant differences in the soluble solid contents between the studied cultivars. The highest contents of soluble solids were found in ‘Leticia’ cultivar (9.84 °Brix). According to the Pearson’s test (Table 2), moisture and SSC values were inversed correlated ($r=-0.961$, $p<0.01$).

Table 2: Correlations among the different studied parameters expressed as Person’s correlation coefficients.

	Crunchiness	SSC ¹	Lutein	Chlorophyll A	Chlorophyll B	AA ²
Moisture content	-0.813**	-0,961**				
a*			0.789**	-0.766**	-0.749**	
Lutein				-0.975**	-0.981**	0.856**
Chlorophyll A						0.876**
Chlorophyll B						0.894**
Ascorbic Acid						0.450*
TPC ³						0.913**
Phenolic Acids ⁴						0.844**
Flavonoids ⁵						0.904**
Total Glucosinolates						0.884**

¹ SSC: soluble solids content expressed as °Brix.

² AA: antioxidant activity.

³ TPC: total phenolic compounds.

⁴ Phenolic Acids: gallic, chlorogenic and sinapic acids.

⁵ Flavonoids: quercetin and kaempferol.

* Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

** Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

3.1.4. pH

The results of this study revealed statistical different pH values (Table 1) between the studied cultivars. The pH value was statistically higher in ‘Dama’ Savoy cabbage (6.21) than in ‘Leticia’ Savoy cabbage (5.92). These results are consistent with those of Lo Scalzo et al. (2007) and Mondragón-Portocarrero et al. (2006), who reported that pH values were around 6 for *B. oleracea*.

3.2. Bioactive compounds

3.2.1. Ascorbic acid and antioxidant activity

More than 85% of vitamin C in human diets is supplied by fruits and vegetables (Davey et al., 2000; Lee and Kader, 2000). Biological function of ascorbic acid can be defined as an enzyme cofactor, a radical scavenger, and as a donor/acceptor in electron transport at the plasma membrane. Ascorbic acid is able to scavenge the superoxide and hydroxyl radicals (Davey et al., 2000). The content of vitamin C among Brassica vegetables varies significantly between and within their subspecies (Podsdek, 2007). In this study, vitamin C has been quantified as ascorbic acid in the two Savoy cabbage cultivars, and their contents are summarized in Table 3. No significant differences were observed in both studied cultivars regarding the ascorbic acid contents. These values were higher than values measured before in Savoy cabbage by Martínez et al. (2010) and similar to those obtained by Podsdek et al. (2006). Generally, among Brassica vegetables, white cabbage and Savoy cabbage are the poorest source of vitamin C, however, in many countries, are the most popular species of Brassica vegetables (Podsdek, 2007).

On the other hand, antioxidant activity (AA) found in ‘Dama’ (56.62 mg Trolox/100 g FW) was statistically higher than in ‘Leticia’ (43.53 mg Trolox/100 g FW). The values were similar to those obtained for other authors such as Podsdek et al. (2006). The percentage of antioxidant activity due to ascorbic acid was 76.14% for ‘Dama’ cultivar and 72.33% for ‘Leticia’ cultivar (Table 3).

According the Pearson’s test, antioxidant activity and ascorbic acid values were correlated ($r=0.450$, $p<0.05$) (Table 2), because ascorbic acid content is indicative of vitamin C content, antioxidant compound (Fernández-León et al., 2012).

Table 3: Mean values of the bioactive compounds found in ‘Dama’ and ‘Leticia’ Savoy cabbage cultivars.

Parameters		‘Dama’	‘Leticia’	Significance
Ascorbic Acid ¹		49.06±7.52	43.69±4.86	ns
AA ²		56.62±2.72	43.53±5.02	**
β-Carotene ¹		0.37±0.05	0.33±0.08	ns
Lutein ¹		0.18±0.02	0.48±0.03	**
Chlorophyll A ¹		2.26±0.18	1.16±0.02	**
Chlorophyll B ¹		0.85±0.04	0.50±0.01	**
TPC ³		102.71±4.10	50.00±6.51	**
Phenolic Acids	Gallic Acid ¹	0.89±0.14	0.22±0.01	**
	Chlorogenic Acid ¹	0.20±0.01	0.54±0.08	**
	Sinapic Acid ¹	1.59±0.27	0.46±0.07	**
Flavonoids	Quercetin ¹	1.21±0.03	1.27±0.16	ns
	Kaempferol ¹	1.47±0.03	1.45±0.15	ns

¹ Expressed as mg/100 g FW.

² AA: antioxidant activity expressed as mg Trolox/100 g FW.

³ TPC: Total phenolic compounds expressed as mg of chlorogenic acid equivalent/100 g FW.

(**) means significantly differences among the values ($p < 0.01$) and (ns) means no significance.

3.2.2. Carotenoid and chlorophyll pigments

The contents of carotenoid and chlorophyll pigments are summarized in Table 3. The results obtained were comparable to other reported values (Fernández-León et al., 2010; Kurilich et al., 1999; Martínez et al., 2010; Singh et al., 2006; Singh et al., 2007).

No significant differences were observed for β-carotene concentration in ‘Dama’ and ‘Leticia’ Savoy cabbage cultivars. However, lutein concentration was significantly higher in ‘Leticia’ (0.48 mg lutein/100 g FW) than in ‘Dama’ (0.18 mg lutein/100 g FW).

β-Carotene and lutein are found in the lipidic soluble fraction of biological systems. These pigments protect cellular membranes by scavenging/quenching free radicals (Singh et al., 2007). Therefore, both compounds constitute the essential lipid-soluble antioxidants in Savoy cabbage. We have found that the amount of lutein was related to the AA, in fact, the Pearson’s correlation test indicates a significant correlation ($r=0.856$, $p < 0.01$) (Table 2), and there was no correlation with β-Carotene.

With regard of the chlorophyll pigments (Table 3), chlorophyll A was the most abundant pigment found in the studied Savoy cabbage, being its amount higher in ‘Dama’ than in ‘Leticia’ cultivar (2.26 and 1.16 mg chlorophyll A/100 g FW, respectively).

There were also significant differences between the two cultivars of Savoy cabbage studied, for chlorophyll B, being also higher the value in ‘Dama’ cultivar (0.85 mg chlorophyll B/100 g FW) than in ‘Leticia’ cultivar (0.50 mg chlorophyll B/100 g FW). Similar concentrations were reported by other authors for other green vegetables (Burns et al., 2003; García et al., 2005; Khachik et al., 1986).

It must be noted that chlorophyll and chlorophyll-containing vegetables exhibit antimutagenic activities, chlorophyll is ubiquitous in plants and is not known to be toxic (Lai et al., 1980). So in this study, chlorophyll A and B contents are related to the values of antioxidant activity found in these two cultivars of Savoy cabbage ($r=0.876$ and $r=0.894$, $p<0.01$, respectively) (Table 2).

A relationship between the colour parameters, carotenoids and chlorophyll pigments was established. According to the Pearson’s correlation test (Table 2), the parameter a^* was correlated with chlorophyll A, chlorophyll B and lutein ($r=-0.766$, $r=-0.749$ and $r=0.789$, $p<0.01$, respectively). And lutein was inversely correlated with chlorophyll A and B ($r=-0.975$ and $r=-0.981$, $p<0.01$, respectively). This inverse correlation between carotenoids and chlorophyll pigments is explained by other authors (Eason et al., 2007b; King and Morris, 1994). As observed in this research work, a higher content of lutein indicates a less green coloration and therefore lower chlorophylls content, this is the case of ‘Leticia’ cultivar.

3.2.3. Total and individual phenolic compounds

Total phenolic compounds (TPC) are summarized in Table 3 and expressed as mg of chlorogenic acid equivalents/100 g FW. The measured amounts were statistically different between both cultivars, being the TPC content in ‘Dama’ higher than in ‘Leticia’ cultivar (102.71 and 50.00 mg of chlorogenic acid equivalent/100 g FW, respectively). The content of polyphenols and other phytochemicals in vegetables can be influenced by various factors such as cultivars, climatic conditions and cultural

practices, maturity at harvest and storage conditions. In the case of phenolic compounds, which are highly reactive species, sample preparation method is also very important (Singh et al. 2007).

The values obtaining in this study were similar to values obtaining by Martínez et al. (2010) and Podsedek et al. (2006) for Savoy cabbage, and similar to that obtained for Chinese cabbage by Bahorun et al. (2004), ranging the phenolic contents from 15.3 mg/100 g FW in white cabbage to 337.0 mg/100 g FW in broccoli (Chu et al., 2002; Wu et al., 2004).

In addition, phenolic compounds possess different biological activities, but the most important are antioxidant activity, capillary protective effect and inhibitory effect elicited in various stages of tumor (Czeczot, 2000; Kuntz et al., 1999). Phenolics are able to scavenge reactive oxygen species due to their electron donating properties. In many in vitro studies, phenolic compounds demonstrated higher antioxidant activity than antioxidant vitamins and carotenoids (Re et al., 1999; Vinson et al., 1995). Thus, in this study high values of antioxidant activity were strongly associated (Person's correlation coefficient $r=0.913$, $p<0.01$) with the content of phenolic compounds in this vegetable (Ou et al., 2002; Podsedek, 2007; Wu et al., 2004) (Table 2).

Considering the individual phenolic compounds (Table 3), our findings are consistent with previously published works (Martínez et al., 2010; USDA/ARS, 2007). Significant differences were observed in the contents of phenolic acids, being higher the gallic and sinapic acids values in 'Dama' cultivar (0.89 mg gallic acid/100 g FW and 1.59 mg sinapic acid/100 g FW) than in 'Leticia' cultivar (0.22 mg gallic acid/100 g FW and 0.46 mg sinapic acid/100 g FW), however the chlorogenic acid content was higher in 'Leticia' than in 'Dama' cultivar (0.54 and 0.20 mg chlorogenic acid/100 g FW, respectively). For flavonoids concentrations no significant differences were observed between both cultivars of Savoy cabbage.

Table 2 summarizes the correlations, according to the Pearson's test, between antioxidant activity values and phenolic acid contents ($r=0.844$, $p<0.01$) and flavonoid contents ($r=0.904$, $p<0.01$). Flavonoid compounds are very abundant in the brassicas

and therefore contribute in an important way to the antioxidant activity of these vegetables (Chu et al., 2000; Fernández-León et al., 2011a).

3.2.4. *Intact glucosinolates*

Brassica vegetables are the main source of glucosinolates (GS) in human diet. It is known that particular species, varieties, and cultivars differ with regard to the type and amount of the GS present. Irrespective of the genetic factors determining the identity of GS and their content of particular vegetables, the latter is also modified by environmental factors, for example, soil and agronomic treatments and postharvest conditions (Fenwick et al., 1983). It should be noted that isothiocyanates are derived from hydrolysis of glucosinolates and have been confirmed to show protective effects against cancer (Fahey et al., 2001; Keck et al., 2002; Keck and Finley, 2004; Verhoeven et al., 1996). Some of them are: sulforaphane derived from glucoraphanin; phenethyl isothiocyanate derived from gluconasturtiin; allyl isothiocyanate from sinigrin; indole-3-carbinol from glucobrassicin and crambene from progoitrin (Keck and Finley, 2004; Schreiner et al., 2006; Schreiner et al., 2007).

The determined glucosinolates compounds, in the two Savoy cabbage cultivars, have been arranged in Table 4 taking into account their chemical structure. The reported results are in agreement with previous studies for other Savoy cabbage cultivars (Cartea et al., 2008; Ciska et al., 2000).

Significant differences were observed between Savoy cabbage cultivars in terms of total aliphatic glucosinolates (Table 4). For this group of compounds, ‘Dama’ exhibited higher amounts than ‘Leticia’ cultivar (90.82 and 86.61 μmol sinigrin equivalent/100 g FW, respectively). However, within the aliphatic glucosinolates different behaviors could be observed depending on the alkyl, alkenyl or hydroxyalkenyl chemical structure. Glucoraphanin (alkyl GS, sulforaphane precursor) and glucobrassicinapin (alkenyl GS) abundances were higher in ‘Dama’ (0.47 and 47.34 μmol sinigrin equivalent/100 g FW, respectively) than in ‘Leticia’ cultivar (0.26 and 35.32 μmol sinigrin equivalent/100 g FW, respectively). Nevertheless, gluconapin (alkenyl GS) was most abundant in ‘Leticia’ (16.85 μmol sinigrin equivalent/100 g FW, respectively) than in ‘Dama’ cultivar (8.11 μmol sinigrin equivalent/100 g FW). On the

other hand, no significant differences were observed for glucoiberin and glucoalysin (alkyl GS), sinigrin (alkenyl GS, allyl isothiocyanate precursor) and progoitrin (hidroxyalkenyl GS, crambene precursor).

Indole derivates constitutes the most numerous glucosinolates in both cultivars (Table 4). Higher concentrations of total indole glucosinolates were quantified in 'Dama' (104.41 μmol sinigrin equivalent/100 g FW), than in 'Leticia', with 65.18 μmol sinigrin equivalent/100 g FW. The same behavior was observed for the individual compounds, the contents of glucobrassicin, 4-methoxyglucobrassicin and neoglucobrassicin were significantly higher in 'Dama' (63.62, 13.07 and 27.72 μmol sinigrin equivalent/100 g FW, respectively) than in 'Leticia' (44.02, 7.40 and 13.76 μmol sinigrin equivalent/100 g FW, respectively). Glucobrassicin is the precursor of the indol-3-carbinol (anticarcinogenic isothiocyanate) and as it is shown in Table 4, this compound is the most abundant glucosinolate in both cultivars. Glucobrassicin, is the dominating GS in all vegetables of *B. oleracea* species, and depending on cultivar, this GS accounted for 10% to >65% of the total (Ciska et al., 2000), in this study glucobrassicin GS represent for 33% of the total GS for 'Dama' cultivar and 29% for 'Leticia' cultivar.

Among the aromatic glucosinolate, gluconasturtiin (phenethyl isothiocyanate) no was detected in both cultivars of Savoy cabbage (Table 4), this happens in other varieties of cabbage (Ciska et al., 2000) and also according to the results reported by Cartea et al. (2008) the concentration range of this GS in cabbages ranges goes from 0.00 to 1.38 μmol sinigrin equivalents/100 g FW.

Finally, the results summarized in Table 4 show significant differences in the concentration of total glucosinolates for the studied cultivars, being higher in 'Dama' (195.22 μmol sinigrin equivalent/100 g FW) than in 'Leticia' cultivar (151.79 μmol sinigrin equivalent/100 g FW).

Table 4: Intact glucosinolantes contents measured in ‘Dama’ and ‘Leticia’ Savoy cabbage cultivars.

Glucosinolates	‘Dama’	‘Leticia’	Significance
<i>Alkyl GS</i>			
Glucoraphanin ¹	0.47±0.10	0.26±0.08	**
Glucoiberin ¹	3.91±0.22	3.72±0.60	ns
Glucoalyssin ¹	1.84±0.21	2.10±0.39	ns
<i>Alkenyl GS</i>			
Sinigrin ¹	15.33±0.46	14.57±1.06	ns
Gluconapin ¹	8.11±1.17	16.85±1.78	**
Glucobrassicinapin ¹	47.34±1.17	35.32±2.76	**
<i>Hydroxyalkenyl GS</i>			
Progoitrin ¹	13.81±1.33	13.79±1.14	ns
Total Aliphatic GS¹	90.82±3.04	86.61±2.71	*
Glucobrassicin ¹	63.62±2.33	44.02±3.73	**
4-Methoxyglucobrassicin ¹	13.07±0.86	7.40±2.04	**
Neoglucobrassicin ¹	27.72±0.63	13.76±0.36	**
Total Indole GS¹	104.41±2.24	65.18±2.19	**
Gluconasturtiin	nd	nd	ns
Total Aromatic GS¹	nd	nd	ns
Total Glucosinolates¹	195.22±3.09	151.79±3.93	**

¹ Expressed as μmol of sinigrin equivalent/100 g FW.

(*) means significantly differences among the values ($p < 0.05$).

(**) means significantly differences among the values ($p < 0.01$) and (ns) means no significance.

(nd) means no detected.

In Brassica vegetables, different species of the same genus and different cultivars of the same species have highly variable GS concentrations (Ciska et al., 2000; Fahey et al., 2001; Kushad et al., 1999). Additionally, glucosinolates are characterized by their high antioxidant capacity (Moreno et al., 2006; Verkerk et al., 2009). Therefore, as shown in Table 2, exist a strong correlation between the total content of glucosinolates and antioxidant activity ($r=0.884$, $p < 0.01$).

4. Conclusions

After comparing the results obtained in this research work, significant differences were found in most of physicochemical parameters and bioactive compound contents evaluated. According to physicochemical parameters ‘Dama’ cultivar had greener coloration, higher moisture percentage and pH values than ‘Leticia’ cultivar; and ‘Leticia’ cultivar had the highest crunchiness value and soluble solids content than ‘Dama’ cultivar. Regarding the bioactive compounds, we found that ‘Dama’ cultivar had higher contents of most of the studied phytochemicals than ‘Leticia’ Savoy

cabbage cultivar. In addition, ‘Dama’ cultivar exhibited higher values of *in vitro* antioxidant activity, because this cultivar had higher values, almost double, in the main antioxidants compounds, such as total phenolic compounds, chlorophyll A and total indole glucosinolates.

In addition, it was remarkable the elevated amounts of glucobrassicin found in ‘Dama’, this glucosinolate is the precursor of the anticancer compound indole-3-carbinol. Finally, it was observed that glucoraphanin content (sulforaphane precursor) was about 50% higher in ‘Dama’ than in ‘Leticia’ cultivar.

Acknowledgements

D.G.G. and M.F.F.L. are grateful to the “Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria” (INIA) of Spain for his research contract (DOC-INIA) and for her doctoral scholarship. Part of this research has been fund by Junta de Extremadura and FEDER (Project GR10006) and Project “Red de Investigación Transfronteriza Extremadura-Centro-Alentejo (RITECA-II)”. Authors thank to the experimental field “La Orden-Valdesequera” (Junta de Extremadura) for the supply of cabbage samples.

4.2.- Aplicación de diferentes tecnologías postcosecha al brócoli ‘Parthenon’.

Discusión general

En esta parte se discutirán las diferencias encontradas en los parámetros de calidad físico-química y funcional, así como las diferencias en la apariencia externa y olor del brócoli ‘Parthenon’ almacenado mediante la aplicación de diferentes tecnologías postcosecha, con el objetivo fundamental de prolongar la vida útil de este vegetal. La mayoría de los resultados obtenidos ya se han publicado en revistas indexadas, y se exponen después de esta discusión general en tres secciones, correspondientes a los tres artículos elaborados (4.2.a, 4.2.b y 4.2.c) de las tres tecnologías postcosecha empleadas: atmósfera controlada (AC), aplicación de 1-metilciclopropeno (1-MCP) y envasado en atmósfera modificada (AM).

Para la elección del material vegetal, utilizado en las aplicaciones de técnicas postcosecha, se ha tenido en cuenta el mayor valor funcional del brócoli ‘Parthenon’, puesto que el valor añadido que se le aporta al producto, al ser sometido a alguna de estas técnicas, está recompensado por sus características funcionales o beneficiosas para la salud.

El hecho de que el brócoli ‘Parthenon’ tenga mayor valor funcional y también mejores características agronómicas (Salguero et al., 2011), unido a que en general los brócolis presentan una menor vida útil y por tanto más rápida senescencia que las coles, hace que sea este cultivar ‘Parthenon’ el elegido para la aplicación de diferentes tecnologías postcosecha en este trabajo.

4.2.1.- Alteración de las condiciones comerciales de atmósfera controlada usadas para el almacenamiento de brócoli ‘Parthenon’ (*Brassica oleracea* L. var *italica*). Influencia sobre los parámetros de calidad externa y sobre los biocompuestos

Se sabe que atmósferas con un contenido del 1-2% de O₂ y del 5-10% de CO₂, en un intervalo de temperatura de 0-5 °C, resultan beneficiosas para mantener la calidad del brócoli (Cantwell y Suslow, 1999). Aunque en condiciones controladas, estas bajas concentraciones de O₂ extienden la vida del brócoli, sin embargo las fluctuaciones de temperatura durante el manejo comercial hacen que estas concentraciones sean peligrosas, pues el brócoli puede producir volátiles azufrados de olor desagradable

(Figura 4.2). Para que esto no ocurra, se recomienda una tasa de recambio de aire alta en las cabinas o contenedores donde estén almacenados los brócolis en estas condiciones de atmósfera controlada.

Esto, unido al uso de estas condiciones de gases tan estrictas y tan diferentes a las del arie (21% O₂ y 0,03% CO₂) hace que sea una técnica cara debido a las instalaciones y al consumo de gases.

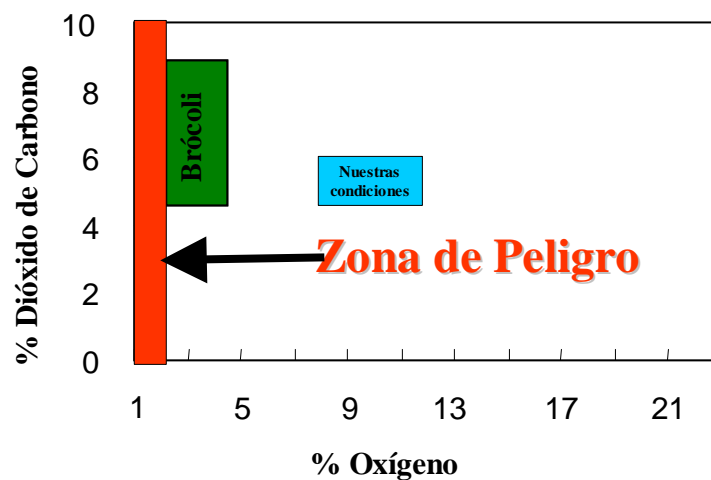


Figura 4.2: Concentraciones de gases usadas generalmente para almacenar brócoli en atmósfera controlada (verde), zona de peligro (naranja) y condiciones propuestas en nuestro trabajo (azul).

Además de para extender el almacenamiento, el estudio de atmósferas controladas se utiliza como primer paso a la hora de diseñar un envase para almacenamiento en atmósfera modificada. La mayoría de los envases, usados para el almacenamiento en atmósfera modificada del brócoli, están diseñados para mantener concentraciones del 3-10% de O₂ y del 5-10% de CO₂ que evitarían el desarrollo de esos volátiles de olores indeseables dentro de los envases.

Debido a estos dos motivos (económico y diseño de envases) se eligieron las condiciones de 10% O₂ y 5% CO₂ (Figura 4.2), con una temperatura de 1-2 °C y con una humedad relativa (HR) del 85-90% para almacenar las pellas de brócoli durante 21 días, y se compararon con las muestras control almacenadas a la misma temperatura y humedad relativa pero al aire. Tomando siempre de referencia la muestra fresca o recién cosechada.

Se observó que los parámetros de calidad físico-química o calidad externa, tales como pérdida de peso, firmeza, color y sólidos solubles de las muestras almacenadas en atmósfera controlada (AC) se mantenían significativamente más similares a las muestras en fresco (recién cosechadas) que los de las muestras control, a lo largo del almacenamiento (Tabla 4.5).

Hay que señalar que no se detectaron olores anómalos en las cabinas de atmósfera controlada tras el almacenamiento de brócoli.

La pérdida de peso fue debida fundamentalmente a la pérdida de humedad, además estuvo inversamente correlacionada ($r=-0,72$, $p<0,01$) con la firmeza de la pella de brócoli, debido a la pérdida de turgencia por la deshidratación (Simón et al., 2008).

El color verde característico del brócoli se mantuvo en las muestras AC mientras que en las control se observó un amarilleamiento, esto también ha sido discutido por otros autores como Eason et al. (2007b) y King y Morris (1994).

Con respecto a los parámetros de calidad funcional estudiados, se observó también que la disminución de éstos a lo largo del almacenamiento era menor en las muestras AC que en las muestras control. Este comportamiento se puede observar en los resultados presentados en la Tabla 4.6 para el contenido de vitamina C (ácido ascórbico) y el valor de actividad antioxidante en las muestras estudiadas, cuyos valores fueron similares a los obtenidos por Vallejo et al. (2003c).

En la Figura 4.3 se observa la evolución de los pigmentos carotenoides (β -caroteno y luteína) (A) y de las clorofilas (clorofila A y B) (B) a lo largo del almacenamiento postcosecha.

Como se puede observar en la Figura 4.3A, para los carotenoides hay escasas diferencias entre las muestras control y las muestras de AC, salvo al final del almacenamiento (21 días), cuando sí se aprecian pequeñas diferencias, siendo el contenido de estos pigmentos menor en la muestra control que en la muestra AC.

Tabla 4.5: Evolución de los parámetros pérdida de peso, firmeza, color y contenido en sólidos solubles (CSS) a lo largo del almacenamiento en atmósfera controlada (AC) y al aire (Control), ambas a 1-2 °C y 85-90% HR.

Periodo de almacenamiento (días)	0	3		9		21	
Muestras	Fresca	Control	AC	Control	AC	Control	AC
Pérdida de peso ¹	---	8,81±0,58d	2,33±0,50ef	20,60±0,90b	4,80±1,09e	41,38±3,28a	11,70±2,82c
Firmeza ²	44,78±13,26a	19,75±6,00b	38,16±16,41a	6,77±1,47c	37,40±12,13a	1,28±0,38c	4,19±2,13c
L*	34,45±1,73a	32,12±0,61bc	30,93±1,11c	30,76±1,28c	32,07±1,28bc	33,53±0,44ab	32,55±0,70bc
a*	-5,59±0,61c	-4,57±0,46b	-4,68±0,54b	-3,35±0,54a	-4,49±0,50b	-3,07±0,49a	-4,22±0,20b
b*	12,77±0,79b	10,80±0,69c	10,61±0,58c	10,53±0,27c	10,34±1,38c	15,27±2,36a	10,65±0,39c
CSS ³	9,33±0,103c	9,37±0,16c	8,62±0,12d	10,60±0,28b	8,52±0,13d	15,38±0,44a	9,47±0,22c

¹ Expresado como g/100 g peso fresco.

² Expresado como Newton.

³ Expresado como °Brix.

Misma letra en la misma fila significa que no existen diferencias significativas entre los valores (p<0,05).

Tabla 4.6: Evolución del contenido de vitamina C (ácido ascórbico) a lo largo del almacenamiento en atmósfera controlada (AC) y al aire (Control), ambas a 1-2 °C y 85-90% HR.

Periodo de almacenamiento (días)	0	3		9		21	
Muestras	Fresca	Control	AC	Control	AC	Control	AC
Ácido Ascórbico ¹	64,19±3,65a	58,90±6,79ab	63,85±3,13a	52,06±1,98cd	55,10±2,98bc	47,66±1,25d	52,41±1,68cd
Actividad Antioxidante ²	104,79±0,39a	83,84±0,78c	94,44±0,81b	75,02±3,98d	84,61±1,81c	54,83±4,64f	69,06±2,39e

¹ Expresado como mg/100 g peso fresco.

² Expresado como mg Trolox/100g peso fresco.

Misma letra en la misma fila significa que no existen diferencias significativas entre los valores (p<0,05).

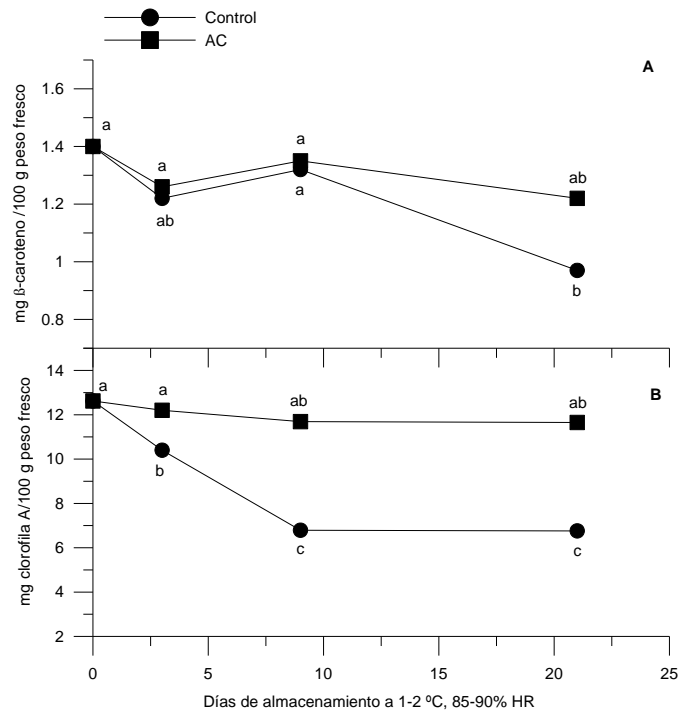


Figura 4.3: Evolución del contenido de pigmentos carotenoides (A) y clorofilas (B) a lo largo del almacenamiento en atmósfera controlada (AC) y al aire (Control), ambas a 1-2 °C y 85-90% HR. Misma letra significa que no existen diferencias significativas entre valores ($p < 0,05$).

Sin embargo para las clorofilas totales (Figura 4.3B) sí que se observó una diferencia significativa entre las muestras AC y las control a lo largo de todo el almacenamiento. El contenido de las clorofilas en las muestras AC permanece prácticamente invariable, mientras que en las muestras control va disminuyendo progresivamente hasta el día 9 y permanece constante a lo largo del almacenamiento hasta los 21 días. Estos resultados estuvieron de acuerdo con los encontrados por Forney y Riji (1991) y Wang (1979) para concentraciones mucho más altas de CO_2 , donde se observó que el almacenamiento en atmósfera controlada evitaba la senescencia del brócoli. Los cambios de color están relacionados con el amarilleamiento del brócoli y por tanto con la degradación de los pigmentos carotenoides y fundamentalmente de las clorofilas (Eason et al., 2007b; King y Morris, 1994).

En la Figura 4.4 se muestra la evolución del contenido fenólico por familias químicas. La Figura 4.4A corresponde a la evolución de los ácido fenólicos (ácidos gálico, clorogénico y sinápico), cuantificados como mg ácido clorogénico/100 g peso

fresco (pf), y la Figura 4.4B corresponde a la evolución de los flavonoides (quercetina y kaempferol), cuantificados como mg quercetina por 100 g pf.

Como se puede observar en la Figura 4.4, tanto la disminución del contenido en ácidos fenólicos (4.4A) como del contenido en flavonoides (4.4B) fue estadísticamente superior en las muestras control que en las muestras AC a lo largo del almacenamiento. El hecho de que las muestras AC presenten mayor contenido en compuestos fenólicos hace también que presenten mayor valor de actividad antioxidante (Tabla 4.6), debido sobre todo a los compuestos flavonoides, los cuales poseen una gran capacidad antioxidante (Podsdek, 2007).

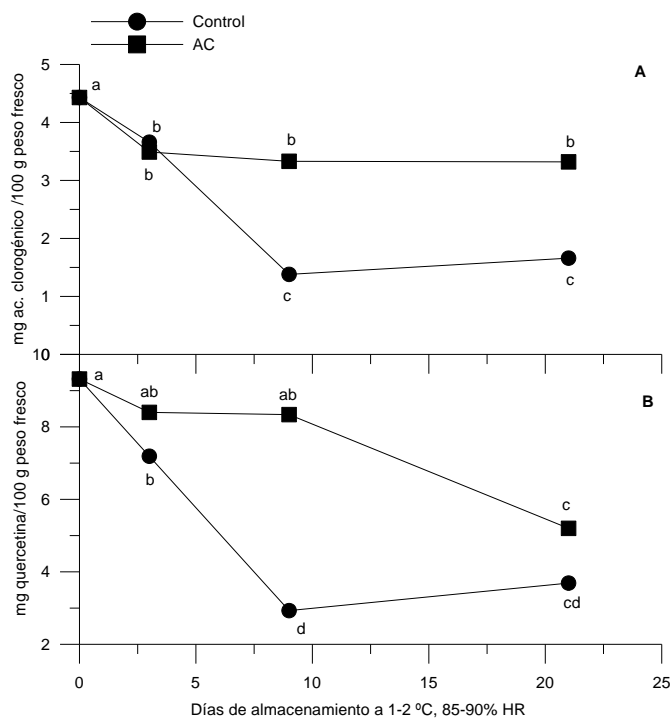


Figura 4.4: Evolución del contenido de ácidos fenólicos (A) y flavonoides (B) a lo largo del almacenamiento en atmósfera controlada (AC) y al aire (Control), ambas a 1-2 °C y 85-90% HR. Misma letra significa que no existen diferencias significativas entre valores ($p < 0,05$).

Para las muestras AC al final del almacenamiento se observaron pérdidas de alrededor de un 25% y un 45% en el contenido de ácidos fenólicos y flavonoides, respectivamente. Vallejo et al. (2003c) encontraron pérdidas de alrededor del 50% y

60% de ácidos fenólicos y flavonoides, respectivamente, utilizando una atmósfera del 17% CO₂ y 2% O₂ a 1 °C.

Con respecto al contenido en glucosinolatos intactos (GS) (Tabla 4.7) se observaron dos comportamientos diferentes tanto para las muestras control como para las AC. Algunos GS disminuyeron a lo largo del almacenamiento, debido fundamentalmente a su degradación o hidrólisis catalizada por enzimas tioglucosidasas endógenas, llamadas mirosinasas (Mikkelsen et al., 2002; Schreiner et al., 2007). Y sin embargo, el contenido de otros GS aumentó debido a la inducción de la síntesis de GS en respuesta a un estrés, siendo el mecanismo de dicha síntesis todavía desconocido (Mithen et al., 2000; Xu et al., 2006). Esta puede ser la causa por la cual el contenido total en glucosinolatos intactos es estadísticamente similar en las muestras control y en las muestras AC a lo largo del almacenamiento. Si se tiene en cuenta la evolución del GS más abundante en el brócoli ‘Parthenon’, la glucobrasicina, que además es precursor de un compuesto con gran capacidad anticancerígena (idol-3-carbinol) (Vallejo et al., 2002), se puede observar (Figura 4.5) que su disminución es estadísticamente menor en las muestras AC que en las muestras control a lo largo del almacenamiento, por lo que las muestras AC podrían tener mayor acción beneficiosa para la salud que las control.

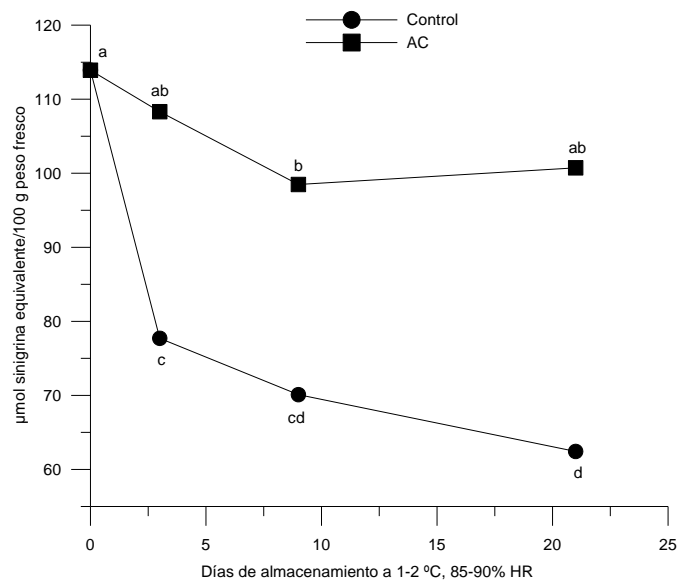


Figura 4.5: Evolución del contenido de glucobrasicina a lo largo del almacenamiento en atmósfera controlada (AC) y al aire (Control), ambas a 1-2 °C y 85-90% HR. Misma letra significa que no existen diferencias significativas entre valores ($p < 0,05$).

Tabla 4.7: Evolución del contenido de glucosinolatos intactos (GS) a lo largo del almacenamiento en atmósfera controlada (AC) y al aire (Control), ambas a 1-2 °C y 85-90% HR.

Periodo de almacenamiento (días)	0	3		9		21	
Muestra	Fresca	Control	AC	Control	AC	Control	AC
<i>GS Alquílicos</i>							
Glucorafanina ¹	2,33±0,03e	11,34±1,18a	5,92±0,17c	10,28±0,48b	5,16±1,09cd	1,35±0,12f	4,39±0,09d
Glucoiberina ¹	0,12±0,03d	1,43±0,10a	0,37±0,05c	0,49±0,01b	0,11±0,03d	0,07±0,02d	0,05±0,02d
Glucoalisina ¹	0,58±0,10c	0,75±0,05c	0,60±0,05c	2,84±0,31a	1,67±0,25b	0,15±0,01d	0,52±0,05c
<i>GS Alquenílicos</i>							
Sinigrina ¹	0,57±0,03b	0,97±0,09a	0,92±0,07a	0,58±0,03b	0,59±0,09b	0,22±0,04c	0,58±0,04b
Gluconapina ¹	13,91±0,33d	15,29±1,10cd	13,70±0,71d	18,17±1,31b	14,85±2,43d	22,41±1,95a	17,05±0,71bc
Glucobrasicanapina ¹	54,01±3,02c	58,92±4,10c	56,50±2,60c	70,13±5,60b	56,88±7,94c	81,57±8,71a	60,18±2,44c
<i>GS Hidroxialquenílicos</i>							
Progoitrina ¹	0,93±0,17e	8,17±0,63a	4,29±0,36b	1,97±0,12c	1,27±0,11de	1,21±0,19de	1,55±0,17cd
GS Alifáticos Totales¹	72,45±3,71c	96,87±7,25a	82,30±4,01bc	104,46±7,86a	80,53±11,83bc	106,98±11,04a	84,32±3,52b
Glucobrasicina ¹	113,92±0,56a	77,71±3,45c	108,31±3,68ab	70,10±3,30cd	98,48±11,32b	62,43±7,10d	100,74±2,88ab
4-Metoxiglucobrasicina ¹	6,29±0,63c	5,04±0,29d	3,60±0,46e	3,10±0,18e	1,23±0,37f	14,30±1,55a	12,94±0,94b
Neoglucobrasicina ¹	0,51±0,42d	2,08±0,30c	2,14±0,16c	5,68±0,34a	2,07±0,18c	2,80±0,39b	0,64±0,19d
GS Indólicos Totales¹	120,72±1,61a	84,83±4,04c	114,05±4,30ab	78,88±3,82c	101,78±11,87b	79,53±9,04c	114,32±4,01ab
Gluconasturtina							
GS Aromáticos Totales¹	10,83±0,18ab	6,27±0,40d	8,31±0,49c	8,19±0,25c	11,10±0,38a	8,19±0,13c	10,51±0,36b
Glucosinolatos Totales¹	204,00±5,50ns	187,97±11,69ns	204,66±8,80ns	191,53±11,93ns	193,41±24,19ns	194,70±20,21ns	209,15±7,89ns

¹ Expresada como μmol sinigrina equivalente/100 g peso fresco.

Misma letra significa que no existen diferencias significativas entre valores ($p < 0,05$). (ns) no significativo.

Por lo tanto, en este trabajo queda comprobado que no es necesario el uso de condiciones de atmósfera controlada tan estrictas para el mantenimiento de la calidad físico-química y funcional del brócoli a lo largo del almacenamiento en frío. Utilizando las condiciones estudiadas (10% O₂, 5% CO₂, 1-2 °C y 85-90% HR) se han obtenido resultados semejantes a los de otros autores (Cantwell y Suslow, 1999; Jones et al., 2006; Toivonen y Forney, 2004), los cuales recomiendan que la atmósfera ideal para mantener la calidad postcosecha del brócoli sea 1-2% O₂, 5-10% CO₂ cuando la temperatura se mantiene entre 0 y 5°C con 98-100% HR, condiciones que resultan más costosas y conllevan un alto riesgo de aparición de olores extraños.

4.2.2.- Aplicación de diferentes estrategias postcosecha para preservar la calidad del brócoli durante el almacenamiento y vida útil: atmósfera controlada y aplicación de 1-MCP

En este estudio se compararon diferentes tratamientos postcosecha aplicados a pellas de brócoli ‘Parthenon’ para alargar tanto su almacenamiento en refrigeración (durante 2, 6, 13, 20 y 27 días) como su vida útil a 20 °C:

- 1) Almacenamiento en refrigeración a 1-2 °C y 85-90% HR (muestra control).
- 2) Almacenamiento en la atmósfera controlada propuesta anteriormente (10% O₂ y 5% CO₂, 1-2 °C y 85-90% HR) (muestra AC).
- 3) Aplicación de 0,6 µL/L de 1-MCP y posterior almacenamiento a 1-2 °C y 85-90% HR (muestra 1-MCP), según las recomendaciones comerciales hechas por AgroFresh Inc.

Estas muestras se compararon con la muestra recién cosechada (muestra fresca) con el fin de observar la evolución de la apariencia externa, los parámetros físico-químicos y funcionales a lo largo del almacenamiento y tras 2 y 4 días de vida útil a 20 °C.

Con respecto a la apariencia externa, se observó un mayor deterioro para las muestras 1-MCP y control que para las muestras AC, fijándonos tanto en el límite de comercialización como en el de comestibilidad (Figura 4.6), tanto durante el almacenamiento como tras un periodo de vida útil de 2 ó 4 días a 20 °C. Sin embargo,

otros autores (Yuan et al., 2010) obtuvieron resultados diferentes, ya que las muestras tratadas con 1-MCP mantenían la apariencia externa, esto puede ser debido a que en nuestro caso la pérdida de peso (debida fundamentalmente a la deshidratación) fue determinante para valorar la apariencia externa y sin embargo, en el estudio de Yuan et al. (2010) la apariencia externa fue valorada en base al color.

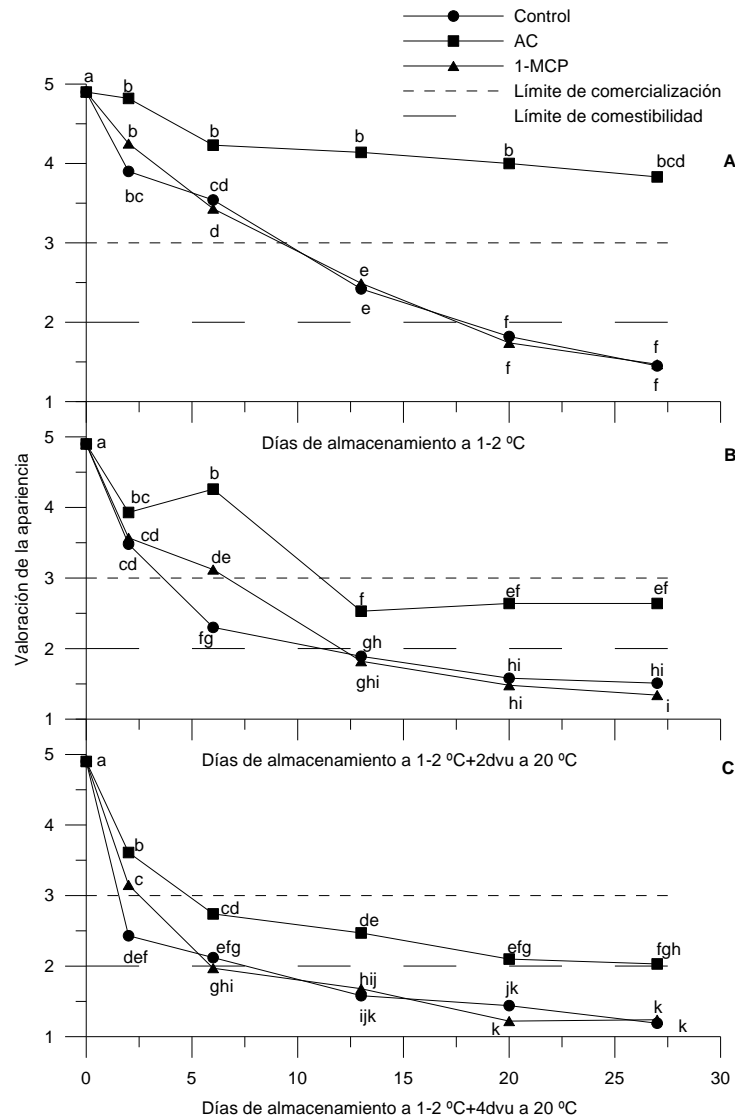


Figura 4.6: Evolución de la apariencia externa para los tres tratamientos postcosecha (Control, Atmósfera controlada (AC) y 1-MCP) a la salida del almacenamiento en refrigeración a 1-2 °C, tras el almacenamiento en refrigeración más 2 días de vida útil (2dvu) a 20 °C y tras el almacenamiento en refrigeración más 4 días de vida útil (4dvu) a 20 °C. De 5, excelente, a 1, no comestible. Misma letra significa que no existen diferencias significativas entre valores ($p < 0,05$).

En el caso de las muestras almacenadas en la atmósfera controlada estudio no se detectó la presencia de olores anómalos en las cabinas donde se había llevado a cabo el almacenamiento de brócoli.

Se observó la aparición de podredumbres para las muestras control y 1-MCP tanto al final del periodo de almacenamiento como tras los correspondientes 2 y 4 días de vida útil, cuando la puntuación de la apariencia era próxima a 1 (Figura 4.6). Para estas muestras, también se observó una gran deshidratación y pérdida de compacidad, como se muestra en la Figura 4.7, comprobándose esto también analíticamente por medio de la pérdida de peso y la firmeza, respectivamente.



Figura 4.7: Deshidratación y pérdida de compacidad de la pella de brócoli.

Para los parámetros de calidad físico-química (pérdida de peso, firmeza, color y contenido en sólidos solubles) se observó un mejor mantenimiento de éstos para las muestras AC, tanto a salida de refrigeración como después de 2 y 4 días de vida útil (Tablas 4.8, 4.9 y 4.10). Sin embargo, las muestras tratadas con 1-MCP mantuvieron el color verde característico durante el periodo de almacenamiento en frío pero no en vida útil. La retención del color verde por el efecto del 1-MCP ha sido descrita por otros autores como Fan y Mattheis (2000) y Ku y Wills (1999).

Tabla 4.8: Evolución de los parámetros físico-químicos (pérdida de peso, firmeza, color y contenido en sólidos solubles) para los tres tratamientos postcosecha (Control, Atmósfera controlada (AC) y 1-MCP) a la salida del almacenamiento en refrigeración a 1-2 °C.

Días de almacenamiento	Muestra	Pérdida de peso ¹	Firmeza ²	L*	a*	b*	CSS ³
0	Fresca	---	54,41±1,88a	34,65±0,73h	-5,46±0,22bc	12,46±0,35def	8,13±0,10g
2	Control	5,19±0,44g	33,69±2,97d	36,72±0,36cdefg	-5,30±0,33b	14,68±0,32bc	8,33±0,27g
	AC	1,35±0,14gh	54,00±2,66a	36,75±0,24cdefg	-5,70±0,29bc	11,27±0,82f	7,75±0,14gh
	1-MCP	2,36±0,34gh	37,88±4,86c	35,48±0,44fg	-5,72±0,24bc	12,41±1,01def	8,42±0,08fg
6	Control	10,20±2,00d	14,81±3,71f	36,49±0,35efgh	-4,68±0,19a	15,49±0,37b	8,40±0,53fg
	AC	2,06±0,24gh	46,95±1,27b	36,65±0,65defg	-5,76±0,37bc	12,36±0,98def	7,28±0,20h
	1-MCP	8,73±1,80de	14,97±1,03f	38,70±1,09abc	-5,53±0,30bc	13,61±0,65cde	8,18±0,12g
13	Control	19,89±2,97c	1,84±0,53g	37,89±0,66cde	-4,52±0,29a	18,03±0,38a	9,92±0,21e
	AC	2,23±0,70gh	35,71±1,44d	37,39±1,28cdef	-5,73±0,14bc	13,75±0,80cde	7,25±0,19h
	1-MCP	18,21±3,46c	4,06±0,52g	37,36±0,65cdef	-5,49±0,22bc	14,86±0,36bc	9,02±0,18f
20	Control	29,75±2,84b	2,01±0,19g	38,49±0,77bcd	-4,71±0,17a	17,27±1,10a	10,75±0,24d
	AC	6,95±1,29de	28,87±0,62e	35,32±0,93gh	-5,90±0,31c	12,34±0,80ef	8,38±0,29fg
	1-MCP	32,42±2,23b	1,06±0,44g	37,14±0,52efg	-5,44±0,21bc	13,94±0,82bc	13,58±0,51a
27	Control	39,54±4,42a	1,37±0,10g	39,89±2,00ab	-4,30±0,29a	17,52±1,14a	12,72±0,55b
	AC	5,64±2,06g	17,10±1,64f	36,83±1,58cdefg	-5,67±0,22bc	14,16±1,04bc	8,23±0,21g
	1-MCP	37,59±3,73a	0,89±0,12g	40,55±1,14a	-5,63±0,32bc	14,71±0,59bc	12,00±0,68c

¹ Expresado como %.

² Expresado como Newton.

³ CSS: contenido en sólidos solubles, expresado como °Brix.

Misma letra en la misma columna significa que no existen diferencias significativas entre valores ($p < 0,05$).

Tabla 4.9: Evolución de los parámetros físico-químicos (pérdida de peso, firmeza, color y contenido en sólidos solubles) para los tres tratamientos postcosecha (Control, Atmósfera controlada (AC) y 1-MCP) tras el almacenamiento en refrigeración más 2 días de vida útil (2dву) a 20 °C.

Días de almacenamiento	Muestra	Pérdida de peso ¹	Firmeza ²	L*	a*	b*	CSS ³
0	Fresca	---	54,41±1,88a	34,65±0,73g	-5,46±0,22hi	12,46±0,35ef	8,13±0,10ef
2+2dву	Control	10,83±0,39de	26,11±0,69d	37,36±0,33ef	-5,20±0,16efgh	13,30±0,30e	8,25±0,16ef
	AC	6,48±0,69f	51,13±0,97b	37,29±1,17ef	-5,56±0,24i	11,94±0,39f	8,02±0,24f
	1-MCP	7,42±0,35ef	24,04±2,03d	36,70±0,56f	-5,36±0,10fghi	12,63±0,26ef	7,93±0,23f
6+2dву	Control	14,33±3,51d	12,01±1,25f	39,85±1,12abc	-5,02±0,05fgh	14,77±0,37cd	7,97±0,08f
	AC	7,42±0,48ef	34,25±1,58c	36,55±0,51f	-5,40±0,22ghi	12,08±0,21f	8,60±0,31def
	1-MCP	11,92±2,04de	10,67±1,12f	37,91±0,86def	-5,35±0,10fghi	12,68±0,30ef	9,10±0,63d
13+2dву	Control	28,80±1,89c	1,47±0,55h	38,54±0,93de	-4,52±0,18abc	15,66±0,46bc	11,42±0,10c
	AC	13,09±1,47d	23,94±2,79d	37,42±0,49e	-5,14±0,10fgh	12,20±0,27f	8,87±0,21de
	1-MCP	29,72±5,14bc	1,88±0,31h	40,12±0,84ab	-4,83±0,12bcd	15,14±0,76bcd	11,13±0,27c
20+2dву	Control	34,59±3,73b	1,92±0,46h	38,42±0,30de	-4,43±0,26a	15,92±0,24ab	12,27±0,97b
	AC	13,38±1,42d	15,19±0,66e	37,23±0,33ef	-5,05±0,28defg	14,36±0,38d	9,30±0,34d
	1-MCP	41,22±4,09a	1,68±0,17h	39,19±0,83bcd	-4,49±0,15ab	15,28±1,03bcd	13,77±0,51a
27+2dву	Control	42,19±4,36a	1,12±0,31h	40,84±0,59a	-4,58±0,10abc	16,01±0,32ab	13,90±0,24a
	AC	13,41±0,90d	9,02±1,33g	38,51±0,38cde	-4,87±0,14cde	14,59±0,52d	9,23±0,30d
	1-MCP	44,69±2,86a	0,44±0,12h	38,59±1,34bcde	-4,47±0,18a	16,60±0,30a	12,42±0,45b

¹ Expresado como %.

² Expresado como Newton.

³ CSS: contenido en sólidos solubles, expresado como °Brix.

Misma letra en la misma columna significa que no existen diferencias significativas entre valores (p<0,05).

Tabla 4.10: Evolución de los parámetros físico-químicos (pérdida de peso, firmeza, color y contenido en sólidos solubles) para los tres tratamientos postcosecha (Control, Atmósfera controlada (AC) y 1-MCP) tras el almacenamiento en refrigeración más 4 días de vida útil (4dvu) a 20 °C.

Días de almacenamiento	Muestra	Pérdida de peso ¹	Firmeza ²	L*	a*	b*	CSS ³
0	Fresca	---	54,41±1,88a	34,65±0,73f	-5,46±0,22ef	12,46±0,35i	8,13±0,10ij
2+4dvu	Control	14,24±1,50fg	13,81±2,90e	39,76±0,62cde	-5,19±0,20def	17,90±0,28cd	8,28±0,31ij
	AC	9,60±0,49h	47,85±3,22b	41,30±0,49bc	5,40±0,33ef	14,52±0,30h	7,75±0,24j
	1-MCP	11,60±1,48gh	15,69±2,21de	40,20±0,63cd	-5,60±0,33f	17,68±0,33cdef	8,67±0,34hi
6+4dvu	Control	23,65±1,22e	4,97±0,64fg	39,76±0,59cde	-4,61±0,20abc	17,54±0,60def	10,67±0,20e
	AC	14,75±1,20fg	32,18±3,73c	41,19±0,42bc	-5,52±0,23ef	15,29±0,30gh	7,97±0,27ij
	1-MCP	25,82±1,39e	6,84±0,50f	39,83±0,77cde	-4,75±0,34bcd	16,97±0,34ef	10,38±0,85ef
13+4dvu	Control	37,71±3,59cd	2,01±0,77gh	41,18±0,87bcd	-4,54±0,29abc	17,97±0,66cd	12,75±0,19bc
	AC	13,86±1,18fg	18,97±2,67d	42,30±0,55ab	-5,70±0,32f	15,86±0,31g	9,73±0,69fg
	1-MCP	35,76±0,79d	1,34±0,39gh	39,84±1,03cde	-4,57±0,15abc	17,83±0,63cde	12,00±0,18cd
20+4dvu	Control	38,55±0,96cd	0,86±0,46h	38,29±0,39e	-4,13±0,09a	18,45±0,31bc	11,77±0,48d
	AC	15,03±0,73f	5,65±0,47f	40,86±0,34bcd	-5,05±0,16cde	15,47±0,50g	9,47±0,60gh
	1-MCP	43,06±0,36ab	1,30±0,15h	39,58±0,46de	-4,16±0,35a	17,90±0,69cd	13,57±0,54b
27+4dvu	Control	46,02±3,25a	1,24±0,54h	43,17±0,87a	-4,60±0,21abc	20,08±0,50a	14,57±0,35a
	AC	17,18±0,41f	7,72±0,75f	40,15±1,39cd	-4,39±0,27ab	16,81±0,30f	9,57±0,36fg
	1-MCP	39,78±2,59bc	0,91±0,09h	43,15±1,37a	-4,44±0,13ab	19,29±0,34ab	12,58±0,35cd

¹ Expresado como %.

² Expresado como Newton.

³ CSS: contenido en sólidos solubles, expresado como °Brix.

Misma letra en la misma columna significa que no existen diferencias significativas entre valores (p<0,05).

Para los parámetros de calidad funcional (ácido ascórbico, pigmentos carotenoides, clorofilas, fenoles totales y glucosinolatos totales, así como la actividad antioxidante relacionada con estos compuestos) se observó una mayor disminución del contenido de éstos en las muestras control y 1-MCP durante el almacenamiento, mientras que esta disminución fue menor en las muestras AC, esto también fue observado anteriormente por otros autores aunque para condiciones de aplicación de AC y 1-MCP distintas (Nath et al., 2011; Vallejo et al., 2003c; Yuan et al., 2010). Además esta tendencia también se observó después de 2 y 4 días de vida útil a 20 °C.

Este comportamiento puede observarse en la evolución del contenido en ácido ascórbico (vitamina C) (Figura 4.8A) y el valor de la actividad antioxidante (Figura 4.8B) de las muestras estudiadas a lo largo del almacenamiento.

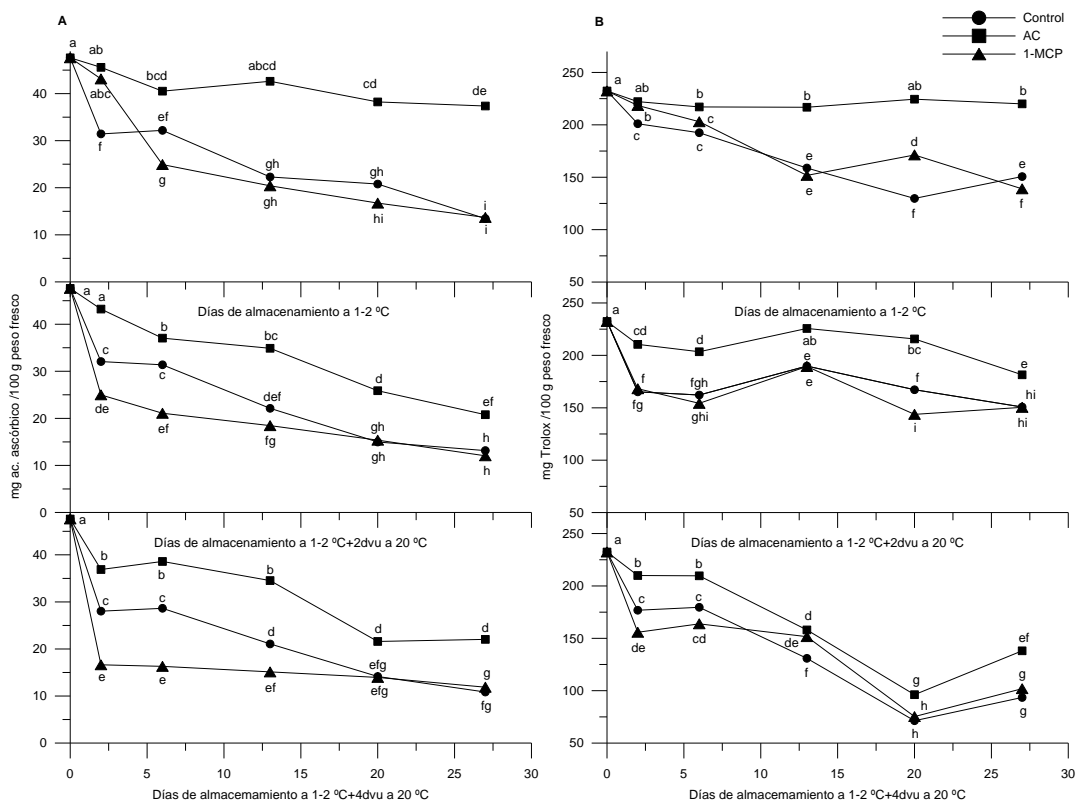


Figura 4.8: Evolución del contenido de ácido ascórbico (A) y del valor de actividad antioxidante (B) para los tres tratamientos postcosecha (Control, Atmósfera Controlada (AC) y 1-MCP) a la salida del almacenamiento en refrigeración a 1-2 °C, tras el almacenamiento en refrigeración más 2 días de vida útil (2dvu) a 20 °C y tras el almacenamiento en refrigeración más 4 días de vida útil (4dvu) a 20 °C. Misma letra significa que no existen diferencias significativas entre valores (p<0,05).

Para los carotenoides, la disminución del contenido en β -caroteno fue mayor para las muestras control y 1-MCP que para las muestra AC, tanto a la salida de refrigeración como después de 2 días de vida útil (Figura 4.9A), sin embargo después de 4 días de vida útil todas las muestras (control, AC y 1-MCP) presentaban contenidos similares de β -caroteno, siendo significativamente algo mayor el encontrado en la muestra AC.

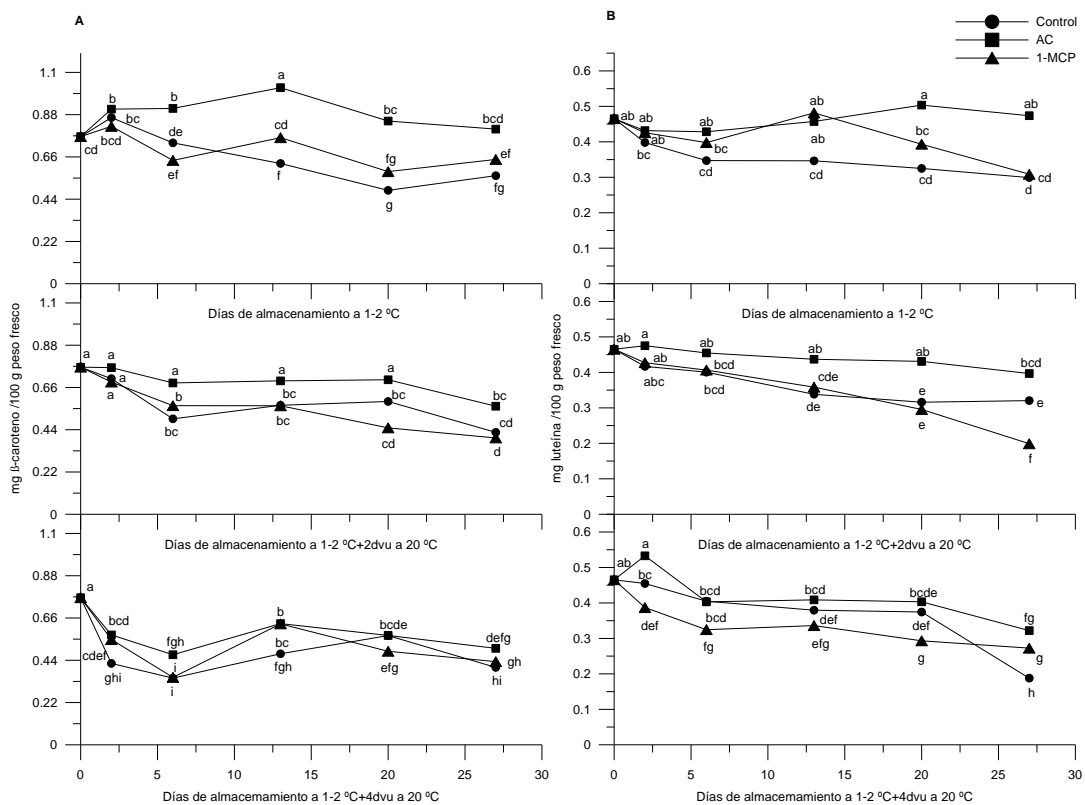


Figura 4.9: Evolución del contenido de β -cartoneno (A) y luteína (B) para los tres tratamientos postcosecha (Control, Atmósfera Controlada (AC) y 1-MCP) a la salida del almacenamiento en refrigeración a 1-2 °C, tras el almacenamiento en refrigeración más 2 días de vida útil (2dvu) a 20 °C y tras el almacenamiento en refrigeración más 4 días de vida útil (4dvu) a 20 °C. Misma letra significa que no existen diferencias significativas entre valores ($p < 0,05$).

La disminución del contenido en luteína (Figura 4.9B) fue mayor para las muestras 1-MCP y control, y menor para las muestras AC, donde el contenido permaneció prácticamente constante, a la salida de la refrigeración y después de 2 días de vida útil. Sin embargo, después de 4 días de vida útil se observó que el contenido en

luteína para las muestras AC también disminuía a lo largo del almacenamiento, aunque esta disminución era menor que para las muestras 1-MCP y control.

El contenido en clorofila A (Figura 4.10A) y en clorofila B (Figura 4.10B) disminuyó significativamente en menor medida en las muestras AC que en las muestras 1-MCP y control, tanto a la salida del almacenamiento en refrigeración, como después de 2 ó 4 días de vida útil. Estos resultados contrastan con la evolución de los parámetros de color a^* y b^* , para los que la evolución en las muestras AC y 1-MCP fue escasa, es decir, mantuvieron su color verde durante el almacenamiento refrigerado (Tabla 4.8).

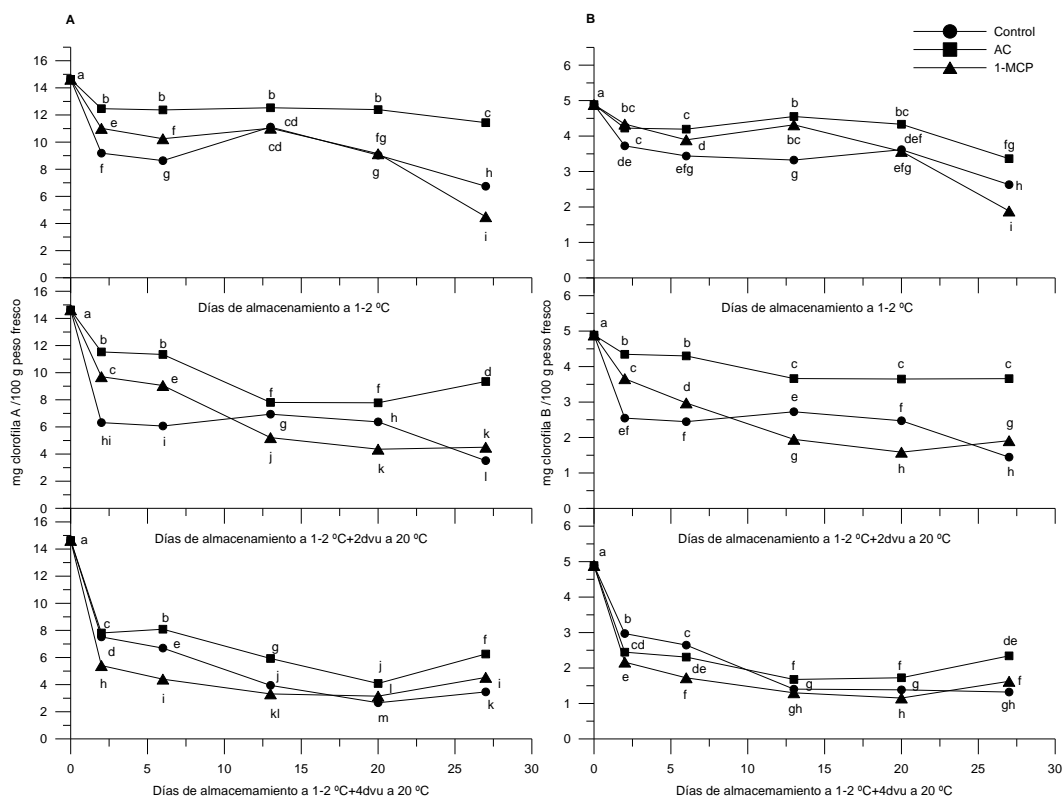


Figura 4.10: Evolución del contenido de clorofila A (A) y clorofila B (B) para los tres tratamientos postcosecha (Control, Atmósfera Controlada (AC) y 1-MCP) a la salida del almacenamiento en refrigeración a 1-2 °C, tras el almacenamiento en refrigeración más 2 días de vida útil (2dvu) a 20 °C y tras el almacenamiento en refrigeración más 4 días de vida útil (4dvu) a 20 °C. Misma letra significa que no existen diferencias significativas entre valores ($p < 0,05$).

Por lo tanto, la aplicación de 1-MCP fue siempre menos eficaz que la técnica de AC para evitar pérdidas en el contenido de clorofilas, si bien la disminución en las muestras 1-MCP fue menor que en las muestras control hasta los 6 días de almacenamiento en refrigeración y hasta los 6 días de almacenamiento en refrigeración más 2 días de vida útil (Figura 4.10).

Con respecto al contenido fenólico total, como se puede observar en la Figura 4.11, sucede prácticamente mismo que lo descrito anteriormente para los otros compuestos funcionales, es decir, la AC preserva a la muestra de la oxidación y deterioro, produciéndose una disminución del contenido fenólico menor en las muestras AC que en las muestras control y 1-MCP, tanto en el almacenamiento en refrigeración como tras 2 y 4 días de vida útil a 20 °C.

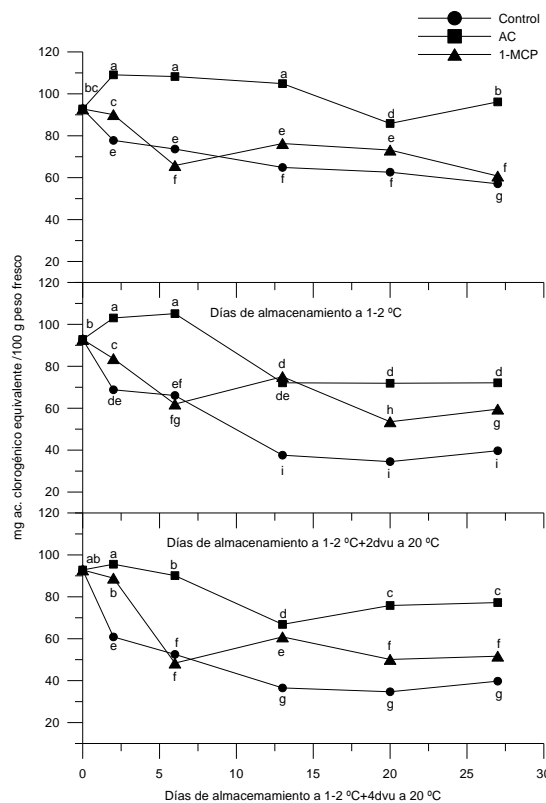


Figura 4.11: Evolución del contenido fenólico total para los tres tratamientos postcosecha (Control, Atmósfera Controlada (AC) y 1-MCP) a la salida del almacenamiento en refrigeración a 1-2 °C, tras el almacenamiento en refrigeración más 2 días de vida útil (2dvu) a 20 °C y tras el almacenamiento en refrigeración más 4 días de vida útil (4dvu) a 20 °C. Misma letra significa que no existen diferencias significativas entre valores (p<0,05).

Para finalizar, en la Figura 4.12 se muestra la evolución del contenido en glucosinolatos por familias químicas, expresados como mg de sinigrina equivalente/100 g de peso fresco de muestra.

Como se observa en las Figuras 4.12A, B y C, para los glucosinolatos (GS) alifáticos, indólicos y aromáticos, respectivamente, se produjo en general una disminución del contenido de éstos a lo largo del almacenamiento en refrigeración, que resultó todavía mayor después de 2 y 4 días de vida útil. Esta disminución fue menor en las muestras AC que en las 1-MCP y control, y es debida fundamentalmente a la hidrólisis de los GS por la enzima mirosinasa (Mikkelsen et al., 2002; Schreiner et al., 2007). Para las muestras AC sin embargo, se observó un ligero aumento del contenido de glucosinolatos alifáticos y aromáticos pero solo al comienzo del almacenamiento en refrigeración (Figura 4.12A y C).

Este aumento también fue observado en el contenido de fenoles totales (Figura 4.11). Esto puede ser debido, como explican Bennett y Wallsgrove (1994) y Verkerk et al. (2001), a que las muestras comienzan a adaptarse a las condiciones de atmósfera controlada y por tanto, sintetizan metabolitos secundarios, como polifenoles y glucosinolatos, en respuesta al estrés inicial al que son sometidas.

Por lo tanto, como se demuestra en este trabajo de investigación, el almacenamiento en atmósferas controladas estudiado (10% O₂, 5% CO₂ a 1-2 °C y 85-90% HR) fue el tratamiento postcosecha más eficaz para preservar la calidad y aumentar la vida útil de las pellas de brócoli 'Parthenon', en comparación con el tratamiento con 1-MCP (0,6 µL/L) y al almacenamiento control (1-2 °C y 85-90% HR).

El tratamiento con 1-MCP, si bien los primeros días consigue mantener los parámetros de color y evitar la pérdida de clorofilas, su eficacia no va más allá de los 6 días de almacenamiento.

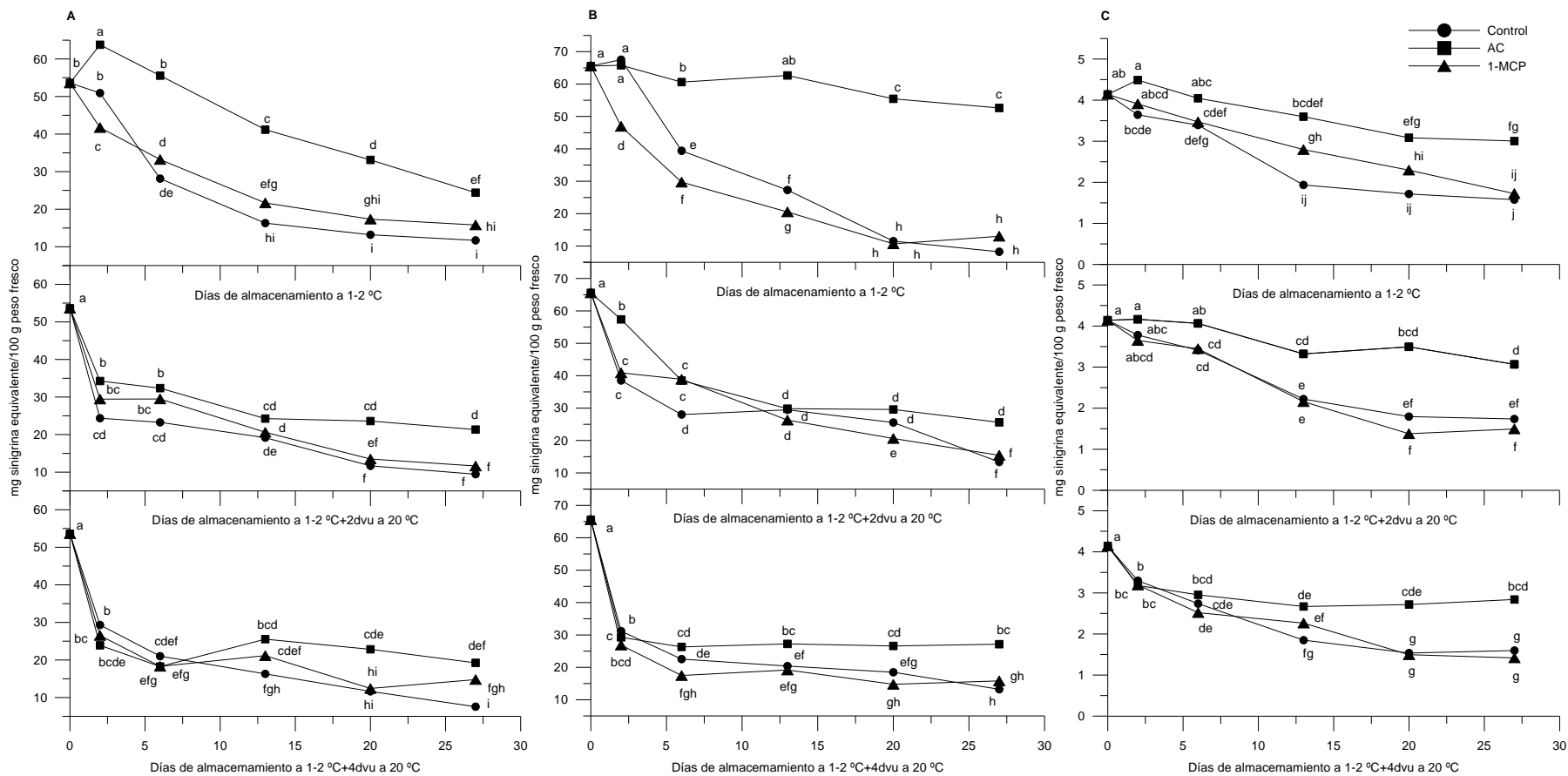


Figura 4.12: Evolución del contenido de los glucosinolatos alifáticos (A), indólicos (B) y aromáticos (C) para los tres tratamientos postcosecha (Control, Atmósfera Controlada (AC) y 1-MCP) a la salida del almacenamiento en refrigeración a 1-2 °C, tras el almacenamiento en refrigeración más 2 días de vida útil (2dvu) a 20 °C y tras el almacenamiento en refrigeración más 4 días de vida útil (4dvu) a 20 °C. Misma letra significa que no existen diferencias significativas entre valores ($p < 0,05$).

4.2.3.- Mantenimiento de la calidad y de los compuestos funcionales del brócoli 'Parthenon' almacenado mediante envasado en atmósfera modificada

En este apartado se discutirán los resultados obtenidos en el ensayo de almacenamiento de floretes de brócoli 'Parthenon' en bolsas de polipropileno microperforado, en las que se alcanzó una atmósfera modificada de equilibrio de 10% O₂ y 5% CO₂, y se estudió la evolución de los parámetros físico-químicos, funcionales y de apariencia externa y olor a lo largo del almacenamiento a 5 °C (temperatura óptima para almacenar los productos vegetales frescos en atmósfera modificada).

El primer paso fue la elección del envase adecuado, para ello hay que tener en cuenta los siguientes aspectos:

- 1) La respiración y la cantidad de producto a envasar.

En nuestro caso, la respiración del brócoli control, es decir almacenado en aire, fue de 60,16 mL CO₂/Kg x h a 5 °C, y la cantidad de producto a envasar fue de 250 g en cada bolsa.

- 2) Elegir el plástico o film más adecuado en base a su permeabilidad y espesor.

Teniendo en cuenta la tasa de respiración descrita en la bibliografía (Cantwell y Suslow, 1999) y según las medidas realizadas experimentalmente, se eligió el polipropileno (PP) microperforado, ya que es comúnmente utilizado en el envasado en atmósfera modificada (AM) de productos con alta tasa respiratoria como el brócoli. Además, también se sabe que las microperforaciones regulan el intercambio de gases en la película de polímero (Oliveira et al., 1998).

Se utilizó PP microperforado de 30 μm de espesor, cuya medida de permeabilidad fue de 1250 mL CO₂/m² x día y de 1130 mL O₂/m² x día a 5 °C. Por lo tanto, la relación de permeabilidad de la película al CO₂ y O₂, conocida como Beta, fue de aproximadamente 1 (β =Permeabilidad CO₂/Permeabilidad O₂), este valor es normal para películas microperforadas, cuyos β están entre 0,8 y 1 aproximadamente. El tener un β próximo a 1 significa que la rapidez de difusión de los gases a través del film (salida del CO₂ del envase y entrada del O₂ al envase) va a ser muy parecida,

permitiendo atmósferas con bajo contenido en O₂ (5% como mínimo) y alto contenido en CO₂ (15% como máximo) (Kader, 1992; Toivonen y Forney, 2004).

- 3) Dimensionar el envase para que en su interior se den las condiciones buscadas o deseadas de atmósfera modificada.

Se propuso que las dimensiones de las bolsas usadas fueran de 25 x 25 cm y que la concentración final de gases dentro de ellas fuera la estudiada anteriormente como atmósfera controlada (10% O₂, y 5% CO₂). Para alcanzar esta concentración final de gases no era posible usar la atmósfera modificada pasiva, es decir sellado de la bolsa con aire como gas inicial y modificación de la atmósfera por la respiración del brócoli. Por lo que dadas las características del plástico, se tuvo que calcular la concentración inicial de estos gases que hay que insuflar en la bolsa (atmósfera modificada activa), para lo que se utilizó la fórmula propuesta por González et al. (2008) y Massey (2003):

$$\text{Permeabilidad} = \frac{R \times t \times P}{A \times (\Delta G)}$$

donde:

La permeabilidad vendrá dada como mL de CO₂ o de O₂/ m² x día (valor por mil).

R = tasa de respiración (producción de CO₂ o consumo de O₂ en mL/Kg x día, respectivamente).

t = espesor del film (µm).

P = peso del producto envasado (Kg).

A = área del film, es decir, dimensiones de la bolsa (m²).

ΔG = diferencia entre la concentración de gases inicial y final (para el O₂ y el CO₂, respectivamente) dentro de la bolsa (en tanto por 1).

En esta fórmula hay que tener en cuenta que la permeabilidad hay que ponerla por 1000 µm y la que nosotros obtuvimos por medidas experimentales fue por 30 µm. Además, como dato de consumo de oxígeno se usó el de producción de dióxido de carbono, porque lo normal es que el coeficiente respiratorio de los vegetales (Producción CO₂/Consumo O₂) sea 1, ya que la reacción de respiración es debida fundamentalmente al consumo de hidrocarburos (Kader, 2002).

Por lo tanto, con todas estas consideraciones y haciendo uso de la fórmula propuesta, se obtuvo que la concentración inicial de gases que había que inyectar en las bolsas en el momento de sellarlas era de aproximadamente 10% CO₂ y 5% O₂, para obtener así la concentración final buscada (5% CO₂ y 10% O₂), que será finalmente la atmósfera modificada de equilibrio.

Una vez establecidas las condiciones de atmósfera modificada usadas, se prepararon los envases con floretes de brócoli y se almacenaron durante 3, 6, 9 y 12 días a 5 °C (muestras AM), comparando los resultados con los obtenidos en las muestras control (almacenadas a 5 °C pero al aire, es decir, en envases sin sellar) y con la muestra fresca o recién cosechada.

Además, para las muestras AM se hicieron medidas de la composición de gases internos de la bolsa a lo largo del almacenamiento (Figura 4.13). Como se observa en dicha figura, la atmósfera modificada buscada se alcanza el primer día del almacenamiento a 5 °C, manteniéndose constante a lo largo de los 12 días de ensayo.

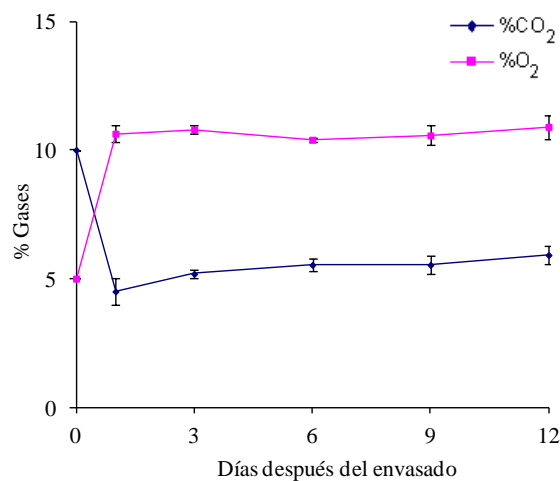


Figura 4.13: Evolución del porcentaje de gases en el interior de la bolsa de floretes de brócoli a 5 °C.

Por lo general, la variación del contenido de gases en los envases es contrario al obtenido en nuestro trabajo, es decir, aumenta el porcentaje de dióxido de carbono y disminuye el porcentaje de oxígeno. Esto se debe a que comúnmente se utiliza el

envasado en atmósfera modificada pasiva (sellar la bolsa sin insuflar gases, y por tanto quedará con aire en su interior). Con el fin de lograr una reducción de la tasa respiratoria desde el principio del almacenamiento e impedir una acumulación excesiva de CO₂ al final del mismo, que podría causar generación de volátiles indeseables (Cantwell y Suslow, 1999), se optó por el envasado en atmósfera modificada activa utilizando un plástico con la permeabilidad adecuada (PP microperforado). En nuestro caso por lo tanto, en el sellado de la bolsa se inyecta una mezcla de gases, de composición conocida (10% CO₂ y 5% O₂) calculada, como ya se ha mencionado, en base a la composición de gases a la que se pretende llegar a lo largo del almacenamiento refrigerado (atmósfera de equilibrio con un 5% CO₂ y 10% O₂).

Se observó que la tasa de respiración se vio muy afectada en las muestras AM, como confirman otros trabajos (Lange, 2000). Al principio del almacenamiento a 5 °C con 5% O₂ y 10% de CO₂ fue de 39,60 mL CO₂/Kg x h y, a lo largo del almacenamiento a 5 °C con 10% O₂ y 5% de CO₂ fue de 52,36 mL CO₂/Kg x h. Comparando estos datos con los obtenidos con la muestra control (almacenada a 5 °C pero al aire) (60,16 mL CO₂/Kg x h) se observó una disminución de aproximadamente un 35% en la tasa respiratoria al inicio del envasado y de aproximadamente un 13% a lo largo del almacenamiento a 5 °C.

Por lo tanto, el hecho de que los floretes de brócoli respiren más lentamente en el envasado en atmósfera modificada en bolsas de polipropileno microperforado (muestras AM), hace que su calidad físico-química y funcional, así como su apariencia externa y olor, se deteriore en menor medida que en las muestras control, siendo más semejantes las muestras AM a la muestra inicial o fresca, como se puede observar con los datos obtenidos en este trabajo de investigación.

Durante el almacenamiento a 5 °C todas las muestras de los diferentes tratamientos postcosecha (control y AM) presentaron un deterioro en su apariencia externa con respecto a la muestra en fresco (Figura 4.14A), esto también fue observado por otros autores (Cefola et al., 2010; Jia et al., 2009).

También se apreció una disminución en la valoración dada al olor (Figura 4.14B), no detectándose olores anómalos al abrir las bolsas de las muestras AM. Sin

embargo, la disminución en la valoración del olor fue estadísticamente significativa en el noveno día de almacenamiento para las muestras AM y en el tercer día para las muestras control. Al final del almacenamiento, las muestras AM presentaron valoraciones por encima del límite de comercialización (puntuación 3), mientras que las muestras control se encontraban en el límite de comestibilidad (puntuación 2). Por lo tanto, las condiciones de AM hicieron que se mantuvieran las características organolépticas de los floretes de brócoli en mejores condiciones durante todo el almacenamiento.

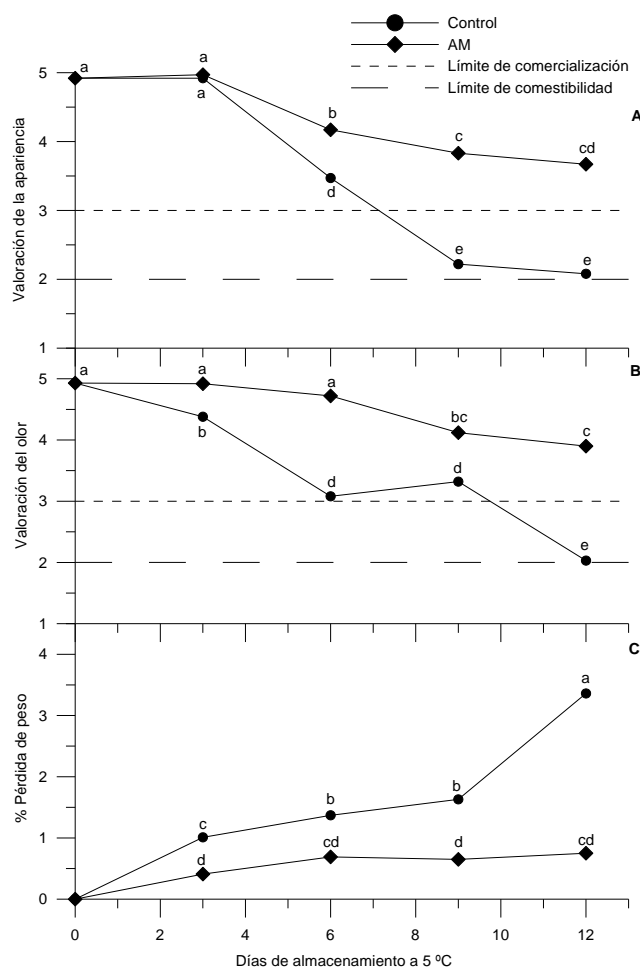


Figura 4.14: Evolución de la apariencia externa (A), olor (B) y pérdida de peso (C) para las muestras almacenadas al aire (Control) y las almacenadas en atmósfera modificada (AM) a lo largo del almacenamiento a 5 °C. La apariencia va de 5, excelente, a 1, no comestible, y el olor va de 5, olor típico, a 1, olor a enmohecimiento. Misma letra significa que no existen diferencias significativas entre valores ($p < 0,05$).

Correlacionada con la apariencia externa estuvo la pérdida de peso ($r=-0,811$, $p<0,01$, correlación de Pearson), debido a que juega un papel muy importante en el deterioro de la textura de los vegetales como consecuencia de la deshidratación de los tejidos (Serrano et al., 2006). Uno de los principales problemas durante el almacenamiento del brócoli es la pérdida de peso, la cual afecta a su comercialización. Como se observa en la Figura 4.14C, las muestras control tuvieron una pérdida de peso del 3,36% mientras que las muestras AM solo tuvieron una reducción de peso de 0,75% al final del almacenamiento a 5 °C. El efecto del almacenamiento en AM, en la reducción de la pérdida de peso, fue debido a la limitación de la difusión de vapor de agua por la película plástica, generándose a su vez una presión de vapor de agua y una mayor humedad relativa dentro del envase (Serrano et al., 2006).

Como parámetro de calidad externa también se evaluó el color de las muestras, observándose (Figura 4.15) que tanto los valores de L^* (Figura 4.15A), como de a^* (Figura 4.15B) y de b^* (Figura 4.15C) aumentaron significativamente al final del almacenamiento en la muestra control, mientras que en la muestra AM se mantuvieron significativamente similares a los de la muestra en fresco. Esto indica que en la muestra control se produjo un aumento de la coloración amarilla, la cual denota aparición de senescencia (Cefola et al., 2010; Izumi et al., 1996).

Además de los parámetros físico-químicos o de calidad externa, se evaluaron los parámetros de calidad funcional, observándose que las muestras almacenadas en AM presentaban una menor disminución del contenido de compuestos funcionales que las muestras control. También se observó, con respecto a la muestra fresca, que la disminución en el valor de actividad antioxidante (Figura 4.16) fue mayor en las muestras control (aproximadamente un 44% de disminución) que en las muestras AM (aproximadamente un 25% de disminución), esto fue debido fundamentalmente a que los compuestos funcionales estudiados, tanto hidrofóbicos (pigmentos carotenoides y clorofilas) como hidrofílicos (vitamina C, fenoles y glucosinolatos), presentan gran capacidad antioxidante (Podsdek, 2007) y por tanto, su contenido está muy correlacionado con el valor de actividad antioxidante total de la muestra (una correlación de Pearson de aproximadamente 0,9, $p<0,01$).

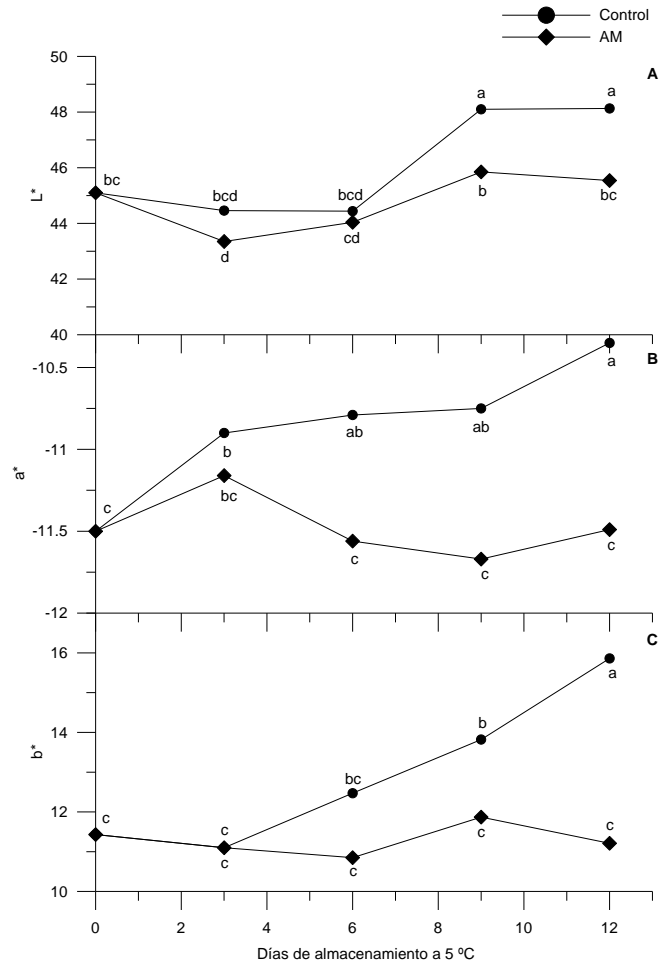


Figura 4.15: Evolución de los parámetros de color L* (A), a* (B) y b* (C) para las muestras almacenadas al aire (Control) y las almacenadas en atmósfera modificada (AM) a lo largo del almacenamiento a 5 °C. Misma letra significa que no existen diferencias significativas entre valores ($p < 0,05$).

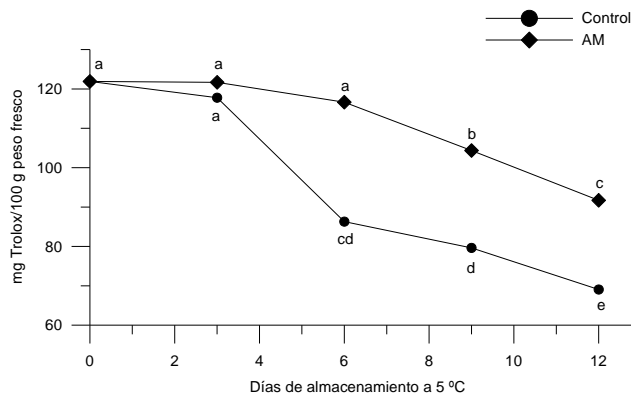


Figura 4.16: Evolución del valor de actividad antioxidante para las muestras almacenadas al aire (Control) y las almacenadas en atmósfera modificada (AM) a lo largo del almacenamiento a 5 °C. Misma letra significa que no existen diferencias significativas entre valores ($p < 0,05$).

Con respecto a los pigmentos carotenoides totales (suma de β -caroteno y luteína), expresados como mg β -caroteno/100 g peso fresco de muestra (Figura 4.17A), se observó una disminución del 31% en la muestra AM, mientras que en la muestra control fue de aproximadamente el 60% al final del almacenamiento. Sin embargo, para las clorofilas (suma de clorofila A y clorofila B), expresadas como mg de clorofila A/100g peso fresco (Figura 4.17B), no se observaron diferencias significativas entre las muestras AM y la muestra fresca, siendo la disminución en el caso de las muestras control del 50% aproximadamente.

Destacar, que la degradación de las clorofilas, y por tanto la pérdida del color verde de los floretes de brócoli almacenados en refrigeración pero al aire (muestra control), puede ser atribuída a que la tasa de respiración en esta muestra fue mayor y por tanto, también son mayores los procesos de oxidación de pigmentos (King y Morris, 1994; Zhuang et al., 1995). Por esta razón, se ha observado una correlación inversa entre los parámetros de color (a^* y b^*) y el contenido total en clorofilas ($r=-0,621$ y $r=-0,720$, respectivamente, $p<0,01$).

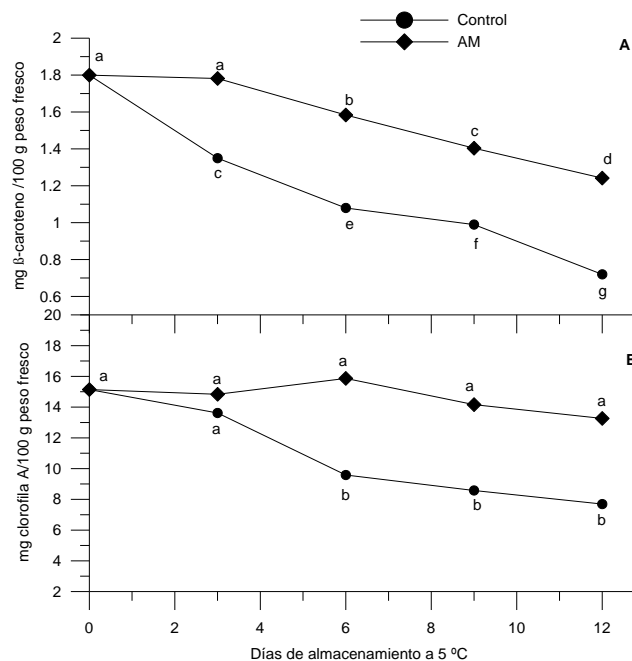


Figura 4.17: Evolución del contenido de pigmentos carotenoides (A) y clorofilas (B) para las muestras almacenadas al aire (Control) y las almacenadas en atmósfera modificada (AM) a lo largo del almacenamiento a 5 °C. Misma letra significa que no existen diferencias significativas entre valores ($p<0,05$).

El contenido en vitamina C, cuantificado como el sumatorio de ácido ascórbico y dehidroascórbico y, expresado como mg ácido ascórbico/100 g peso fresco de muestra (Figura 4.18) permaneció estadísticamente similar en la muestra fresca y en la muestra AM al principio del almacenamiento (3 días), pero disminuyó a lo largo del almacenamiento, siendo esta disminución mayor en las muestras control (53% aproximadamente) que en las AM (33% aproximadamente) al final del almacenamiento.

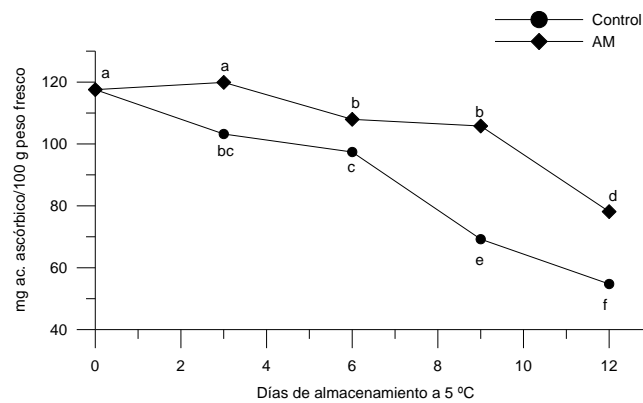


Figura 4.18: Evolución del contenido en vitamina C para las muestras almacenadas al aire (Control) y las almacenadas en atmósfera modificada (AM) a lo largo del almacenamiento a 5 °C. Misma letra significa que no existen diferencias significativas entre valores ($p < 0,05$).

Con respecto al contenido fenólico total (Figura 4.19) se observó que aumentó significativamente al principio del almacenamiento (3 días) a 5 °C, tanto para la muestra control como para la muestra AM (104,11 y 95,44 mg ácido clorogénico equivalente/100 g peso fresco, respectivamente), con respecto a la muestra fresca (86,76 mg ac. clorogénico/100 g peso fresco). El aumento mayor en la muestra control probablemente fue debido a la pérdida de peso por deshidratación, que provocó el aumento de la concentración de estos compuestos en la células (Podsdek, 2007). De manera general, el aumento del contenido de compuestos fenólicos puede explicarse como respuesta al estrés producido en la planta por las posibles lesiones ocasionadas en la cosecha y postcosecha (Yang et al., 2011), ya que, como en nuestro caso, las muestras se cortan y floretean antes de almacenarlas y/o envasarlas.

Sin embargo, para el resto del periodo de almacenamiento se observó que el contenido fenólico total permanecía significativamente constante para las muestras AM

hasta el noveno día, disminuyendo aproximadamente un 20% al final del almacenamiento (12 días). Mientras, que para las muestras control a partir del sexto día de almacenamiento ya se observó una disminución en el contenido fenólico total, llegando a una disminución de aproximadamente un 48% a los 12 días de almacenamiento.

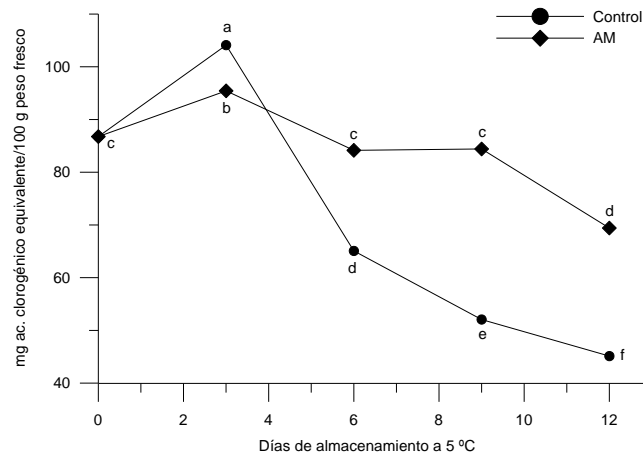


Figura 4.19: Evolución del contenido fenólico total para las muestras almacenadas al aire (Control) y las almacenadas en atmósfera modificada (AM) a lo largo del almacenamiento a 5 °C. Misma letra significa que no existen diferencias significativas entre valores ($p < 0,05$).

Por lo tanto, para las muestras control después del aumento del contenido de los compuestos fenólicos, debido a la concentración de éstos por deshidratación de la célula, se produce probablemente un deterioro de las estructuras de membrana quedando los compuestos fenólicos más susceptibles a ser oxidados, siendo ésta la principal razón de la disminución del contenido de estos compuestos a lo largo del almacenamiento (Toor y Savage, 2006; Yang et al., 2011). Además, la mayor tasa respiratoria de los floretes almacenados al aire (muestras control) puede aumentar el metabolismo (Izumi et al., 1996) y, por lo tanto, la degradación de los compuestos fenólicos (Vallejo et al., 2003c).

El contenido en glucosinolatos intactos totales se muestra en la Figura 4.20. De forma general, se observó que la concentración de estos compuestos disminuía a lo largo del almacenamiento, siendo esta disminución mayor en las muestras control (aproximadamente un 57% de disminución) que en las muestras AM (aproximadamente un 23% de disminución) a los 12 días de almacenamiento refrigerado. La disminución

de los glucosinolatos es debida, fundamentalmente, a la degradación por hidrólisis de éstos catalizada por las enzimas mirosinasas (Mikkelsen et al., 2002; Schreiner et al., 2007).

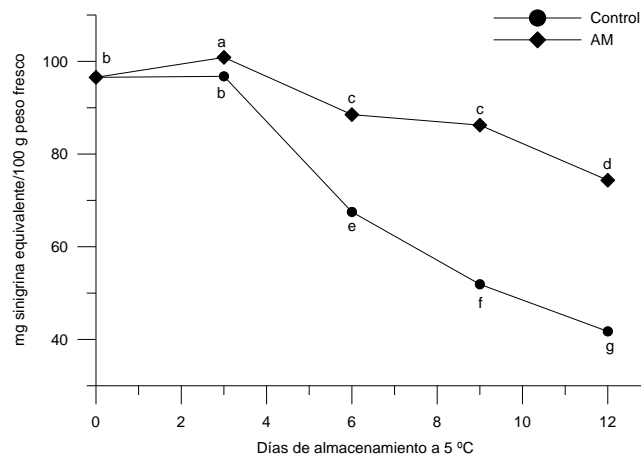


Figura 4.20: Evolución del contenido en glucosinolatos intactos totales para las muestras almacenadas al aire (Control) y las almacenadas en atmósfera modificada (AM) a lo largo del almacenamiento a 5 °C. Misma letra significa que no existen diferencias significativas entre valores ($p < 0,05$).

Sin embargo, al igual que ocurría con los compuestos fenólicos (Figura 4.19), también se observó que al principio del almacenamiento (3 días) se producía un aumento del contenido de glucosinolatos totales (Figura 4.20). Este aumento se produjo en la muestra AM (un aumento de casi el 4,5%), y podría ser causado por la biosíntesis de metabolitos secundarios, como los glucosinolatos, como respuesta de la muestra al estrés sufrido inicialmente cuando es almacenada en atmósferas de composición distinta al aire (Bennet y Wallsgrove, 1994; Verkerk et al., 2001).

Para finalizar, y con respecto a los glucosinolatos, hay que destacar que para el ‘Parthenon’ de origen italiano (Sureste de Italia) se detectaron, identificaron y cuantificaron dos glucosinolatos nuevos, que no aparecían en las muestras de brócoli ‘Parthenon’ de origen extremeño. Estos dos glucosinolatos fueron la glucoerucina (alifático alquílico) y la glucotropaeolina (aromático).

Por tanto, en este trabajo se comprueba que el almacenamiento de floretes de brócoli ‘Parthenon’ (“ready to use”) en bolsas de PP microperforado, con una atmósfera modificada de equilibrio del 10% O₂ y 5% CO₂, es efectivo para el mantenimiento de la

calidad visual, olfativa, físico-química y funcional a lo largo del almacenamiento a 5 °C. Nuestros resultados concuerdan con los obtenidos por otros autores con otras condiciones de envasado y almacenamiento. Como por ejemplo, estudios de Jia et al. (2009) y Jones et al. (2006) donde en el envase se llega a alcanzar un porcentaje del 10% en CO₂, que aunque sea efectivo en el mantenimiento de la calidad de la muestra, se corre el riesgo de aparición de olores desagradables, aspecto no observado con las condiciones de nuestro trabajo.

ARTÍCULOS: Aplicación de técnicas postcosecha

4.2.a.- Altered commercial controlled atmosphere storage conditions for ‘Parthenon’ broccoli plants (*Brassica oleracea* L. var. *italica*). Influence on the outer quality parameters and on the health-promoting compounds



LWT- Food Science and Technology 50 (2013) 665-672

M.F. Fernández-León¹, A.M. Fernández-León¹, M. Lozano¹, M.C. Ayuso², D. González-Gómez¹

¹Technological Institute of Food and Agriculture (INTAEX), Junta de Extremadura. Ctra Cáceres S/N, 06071 Badajoz, Spain.

²Agriculture Engineering School, University of Extremadura, Ctra. Cáceres S/N, 06007 Badajoz, Spain.

Abstract

Parameters such as bright and dark green compact heads, firmness to hand pressure and closed florets, and the evolution of main health-promoting compounds such as carotenoid and chlorophyll pigments, phenolic compounds and glucosinolates, were assessed to determine the effects of the atmosphere composition during the cold storage of broccoli ‘Parthenon’. The controlled atmosphere evaluated in this study was a gas mixture containing 10% of O₂ and 5% of CO₂, with 85-90% relative humidity. The storage temperature was established at 1 and 2°C. We found that the loss of weight and firmness was greater in the reference samples compared to samples stored under controlled atmosphere conditions (20.60% and 84.88%, for loss of weight and firmness in reference samples respectively, and 4.80% and 16.48%, for loss of weight and firmness in controlled atmosphere samples respectively) after 9 days of storage, approximately. In addition, the proposed controlled atmosphere conditions helped to maintain the concentration of the main health-promoting compounds, such as ascorbic acid, carotenoid and chlorophylls pigments, total phenolic compounds and intact glucosinolates, and the values of the antioxidant activity *in vitro* were also maintained.

Keywords: Broccoli, Controlled Atmospheres, Health promoting compounds, HPLC-MS/MS.

1. Introduction

A number of epidemiological studies indicate that a regular consumption of *Brassicaceae* family vegetables helps to decrease the risk of development of different type of cancer (Cohen et al., 2000; Vallejo et al., 2002). In this family, broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*) is distinguished for the high number of health-promoting compounds such as phenolics, glucosinolates, carotenoids, chlorophylls and different vitamins (Borowski et al., 2008; Moreno et al., 2006; Tian et al., 2005; Vallejo et al., 2003a; Vallejo et al., 2003b; Vallejo et al., 2003c; Vallejo et al., 2003d). The isothiocyanates are derived from hydrolysis of glucosinolates and have protective effects against cancer (Fahey et al., 2001; Keck et al., 2002; Keck and Finley, 2004; Verhoeven et al., 1996). Some of them are: sulforaphane derived from glucoraphanin; phenethyl isothiocyanate derived from gluconasturtiin; allyl isothiocyanate from sinigrin; indole-3-carbinol from glucobrassicin and crambene from progoitrin (Keck and Finley, 2004; Schreiner et al., 2006; Schreiner et al., 2007). The high varieties of health promoting compounds make broccoli an interesting commodity for producers and consumers. In fact, in recent years the demand on broccoli has sharply increased (Serrano et al., 2006) as fresh product or in ready-to-eat salad.

Different authors (Hansen et al., 1995; Nath et al., 2011) reported that the phytochemical compounds found in broccoli florets undergo rapid changes during post-harvest storage. Particularly, chlorophylls, ascorbic acid, β -carotene and total antioxidant content values decreased during the cold storage (Nath et al., 2011). On the other hand, Hansen et al., (1995) reported that the abundance and type of glucosinolates could be altered during controlled atmosphere storage

Broccoli is a very perishable vegetable and, from the time of harvest, quality declines and nutrients are lost rapidly, moreover if the product is not adequately stored (Paliyath et al., 2008). The quality loss is visually observed in symptoms such as loss of turgor and yellowing, due to the fact that freshly harvested heads of broccoli contain an abundance of immature, chlorophyll rich florets, that rapidly senesce. Other major changes observed during its senescence include, among others, turgidity loss, opening of flower buds, development of off-odors and loss of nutritional value (Eason et al., 2005; Eason et al., 2007a; Hansen et al., 2001; Izumi et al., 1996).

With the objective to keep broccoli quality after harvest, it is crucial to pre-cool the heads as soon as possible and store them under refrigeration, in order to reduce the respiration rate and maintain plant tissue turgidity (Deschene et al., 1991).

Modified atmosphere packaging, in combination with cool storage, has been reported to delay broccoli senescence, maintaining the physicochemical quality, and extending its shelf-life (Rai et al., 2009; Serrano et al., 2006; Toivonen and DeEll, 2001; Vallejo et al., 2003c).

On the other hand, controlled atmospheres (CA) is a very effective postharvest technique for maintaining broccoli heads quality, being the main effects the delay in tissue turgidity and the chlorophylls loss, increasing in double time the postharvest life (Toivonen and Forney, 2004). The most suitable atmospheres to maintain broccoli quality are around 1-2% of O₂ and 5-10% of CO₂ when refrigerate temperatures are 0-5 °C (Cantwell and Suslow, 1999). However, if the storage period under these CA conditions exceeds four weeks, broccoli will produce persistent, unpleasant odors and an off-flavor (Kasmire et al., 1974).

The aim of this work was to evaluate the effects of proposed storage conditions (10% O₂ and 5% CO₂) on the quality of broccoli 'Parthenon'. The influence of the selected conditions on the weight loss, firmness and color was assessed during the storage. Apart from that, the effects on the total antioxidant activity and on the concentration of the main health-promoting compounds, such as carotenoids and chlorophyll pigments, total and individual phenolic compounds, intact glucosinolates, were as well evaluated. Although the number of studies dealing with the effects of CA on the quality of broccoli is important, the information about the influence of the less aggressive atmospheres conditions is inexistent.

2. Materials and methods

2.1. Plant material

Broccoli 'Parthenon' plants were grown outside in an alluvial soil with a sandy-loam texture, slightly acidic, and with a low organic material content. The crop was located at the experimental fields located in Vegas Bajas del Guadiana in Extremadura

(Spain). Plants were harvested during the first week of February 2009, and samples were rapidly transported to the laboratory where they were stored according the experimental design.

2.2. Experimental design

Batches of 18 broccoli heads (about 20-25 cm diameter each one) were placed in three different 530 L poly(methyl methacrylate) chambers (Tecnidex S.A., Valencia, Spain) for a period of 3, 9 and 21 days under controlled atmosphere (CA). The chambers were equipped with carbon dioxide, ethylene and nitrogen on-line detectors and the air composition was 10% O₂ and 5% CO₂. Atmosphere composition was controlled through the specific software that allowed the injection of the necessary amounts of carbon dioxide, nitrogen or synthetic air to keep the assessed conditions. Humidity (85-90%) and temperature (1-2 °C) were as well controlled through the computer system. Measurements of gas composition, relative humidity (RH) and temperature were performed every 10 min to ensure the trial conditions. On the other hand, 18 broccoli heads (reference sample) were stored under standard atmospheric (SA) conditions and same temperature and humidity as previously described.

A total of 6 broccoli heads were sampled at the beginning of the assay (Fresh samples) and at 3rd, 9th and 21st day of storage in the mentioned conditions (CA and SA samples). In each sample day, a homogenate was prepared from 15 florets. Some of the health-promoting compounds were analyzed after lyophilization (phenolic compounds and intact glucosinolates) and the rest were analyzed using the fresh homogenate (chlorophylls and carotenoids pigments, ascorbic acid and antioxidant activity).

All standards were purchased at Sigma Aldrich SA., Madrid (Spain) except the carotenoids pigments that were purchased at Extrasynthese, Lyon (France).

2.3. Outer quality parameters: weight loss, firmness and color

Weight of individual heads was measured (Mettler-Toledo Classic PB3001-S, Mettler-Toledo, Madrid, Spain) at the harvest day and after the different sampling time. The weight loss was expressed as g/100 g of fresh weight (FW).

Firmness was measured using a Stable Micro Systems Texture Analyzer TA-XT2i (Aname, Madrid, Spain) through a compression assay on the whole broccoli head. The force was applied to produce a 2% deformation by a 100 mm aluminum plate. Force/deformation curves were recorded using the computer programme of the texture analyzer and the maximum force (N) was calculated.

Color parameters (L^* , a^* and b^*) were measured in color space CIELab by a Konica Minolta CM-3500d spectrophotometer (Aquateknica, S.A., Madrid, Spain) using the illuminant D65, diffuse illumination, a viewing angle of 8° and a measurement circular area of 30 mm diameter. Measurements were performed in different locations of each broccoli head.

2.4. Soluble solids content

The soluble solids content (SSC) of the juice from a homogenate, obtained from 10 broccoli florets, was determined by refractometry using an RE40 refractometer (Mettler Toledo, Madrid, Spain), results were expressed as $^\circ\text{Brix}$. A lab blender was used for homogenate preparation (Moulinex, Madrid, Spain).

2.5. Antioxidant activity and ascorbic acid

Antioxidant activity (AA) was evaluated according to the slightly modified procedure proposed by Cano et al. (1998). Results were expressed as mg of Trolox/100 g FW.

Ascorbic acid was determined following a previously published method of our group (Bernalte et al., 2007). The quantification was carried out by the external standard calibration method and the results were expressed as mg of ascorbic acid/100 g FW.

2.6. Carotenoid and chlorophyll pigments determination

Carotenoid pigments were determined by HPLC according to Mínguez-Mosquera and Hornero-Méndez (1993) method, slightly modified by García et al. (2007), from the saponified acetone extracts of broccoli plants. The pigments were quantified by external standard calibration, and results were expressed as mg of β -carotene and mg of lutein/100 g FW.

Chlorophyll A and B contents were determined using multivariate calibration by means of Partial Least Squares (PLS) (Fernández-León et al., 2010). The results were expressed as mg/100 g FW.

2.7. Total and individual phenolic compounds determination

The determination of total phenolic content (TPC) was performed according to Lima et al. (2005) and Bernalte et al. (2007) from 1 g of lyophilized broccoli powders. The results were expressed as mg of chlorogenic acid equivalent/100 g FW.

After acidic hydrolysis, the aglycons of individual phenolic compounds were chromatographic determined using a high-performance liquid chromatography instrument coupled to an Ion Trap mass spectrometer (Varian 500-MS, Varian Ibérica S.L., Madrid, Spain). HPLC separation was performed on a 150 mm x 2.0 mm (3 µm) Pursuit C18 reversed-phase column following the method published by Vallejo et al. (2002). For aglycons identification, the mass spectrometer was tuned by direct infusion of standards, producing maximum abundant precursor ions and fragment ions signals during MS/MS. Thus, three derivatives of phenolic acids (galic acid, chlorogenic acid and sinapic acid) and two flavonoids (quercetin and kaempferol) were identified. For the quantification, standard calibration curves were made with these compounds using these mass spectrometric conditions. Results were expressed in mg/100 g FW, for each compound.

2.8. Intact glucosinolates determination

Intact glucosinolates were extracted following Kiddle and Vallejo slightly modified methods (Kiddle et al., 2001; Vallejo et al., 2003b). A high-performance liquid chromatography instrument coupled to an Ion Trap mass spectrometer (Varian 500-MS, Varian Ibérica S.L., Madrid, Spain) was used for the intact glucosinolates separation and determination from the broccoli extracts.

The chromatographic separation was performed on a 150 mm x 2.0 mm (3 µm) Pursuit C18 reversed-phase column with a Varian security guard column. The column oven temperature was set at 40 °C and the injected volume was 10 µL. The composition of the mobile phase varied linearly from 100% A (0.1 mL formic acid/100 mL) to 15%

B (methanol MS-MS) in 15 min, to 40% B in 5 min, to 50% B in 5 min, and returned to 100% A in 5 min at a flow rate of 200 $\mu\text{L}/\text{min}$. The mass spectrometer was tuned by direct infusion of sinigrin standard solution producing maximum abundant precursor ion m/z 358 ($[\text{M}-\text{H}]^-$) and fragment ion m/z 97 ($[\text{SO}_3\text{H}]^-$) signals during MS/MS (Tian et al., 2005). The following transitions were used to assay 11 individual glucosinolates: glucoraphanin (436>97), glucoiberin (422>97), sinigrin (358>97), progoitrin (388>97), glucobrassicin (447>97), glucoalysin (450>97), gluconasturtiin (422>97), 4-methoxyglucobrassicin (477>97), neoglucobrassicin (477>97), gluconapin (372>97) and glucobrassicinapin (386>97). These glucosinolates were quantified using the calibration curve of sinigrin (Sigma-Aldrich) as an external standard and expressed as μmol of sinigrin equivalent/100 g of FW.

2.9. Statistical analysis

For statistical studies SPSS 15.0 software was used (SPSS Inc. Chicago, IL, USA). Correlations were estimated with the Pearson test at $p < 0.05$ and 0.01 significance level. Data are expressed as means \pm SD of six independent analysis and samples, and were analyzed using a one-way analysis of variance (ANOVA). When ANOVA detected significant differences between mean values, means were compared using Tukey's HSD test. ACOC software was used for calibration and analytical figure of merit calculations (Espinosa-Mansilla et al., 2005).

3. Results and discussion

3.1 Outer quality parameters evolution of SA and CA broccoli samples

In order to assess the effect of the CA in the external quality attributes of broccoli, weight loss, firmness, and color evolution were studied in broccoli heads during the 21 days of storage period (Table 1).

The loss of weight in SA samples drastically increased during the storage, being this loss 41.38g/100g fresh weight after 21 days while, at the same time, the weight loss in CA samples was 11.70 g/100 g fresh weight. Regarding broccoli firmness, no statistical differences were observed between fresh broccoli and CA conditions at day 9; by day 21 there was a significant loss. In contrast, firmness in SA samples decreased

sharply from the 3rd day of storage. According to the Pearson's test, weight loss and firmness values were highly correlated ($r=-0.72$, $p<0.01$), this fact is mainly related to turgid loss and dehydration (Simón et al., 2008).

Concerning the color parameters, no significant differences were observed for the lightness values (L^*) between SA and CA samples, significantly lower than those found for the fresh sample during storage. While the parameter a^* increased during the storage, being this increase more intense in reference samples (from $a^*=-5.59$ to $a^*=-3.07$) than in CA (from $a^*=-5.59$ to $a^*=-4.22$), and the parameter b^* decreased days 3rd and 9th, with no statistical differences between Control and CA, although in day 21st, b^* parameter rose drastically in SA samples, due to the yellowing of broccoli plants (Eason et al., 2007b; King and Morris, 1994). The a^* and b^* values were higher for the sample SA than to the sample CA at 21 days of storage. This means that the decrease in green color and the increase in yellow color is higher in SA samples than in CA samples at the end of storage.

Broccoli is a commodity that benefits from storage under increased CO_2 and reduced O_2 concentration atmospheres. The studied CA storage conditions tested in this research work, positively affected the maintenance of the outer quality parameters of 'Parthenon' broccoli, compared with those stored under standard atmosphere, as other authors also concluded (Eason et al., 2005; Eason et al., 2007a; Hansen et al., 2001; Izumi et al., 1996). In these research works was assured that the modulation of temperature and controlled atmospheres storage were very important for delays senescence in broccoli.

3.2 Soluble solids content

Total soluble solids content (SSC) significantly increased during the storage for reference samples (SA) while in CA samples, no differences were observed between 3rd and 9th day. SSC slightly increased in CA samples at the end of storage (21st day). According to the results summarized in Table 1, no significant differences were observed at the end of storage (day 21st) between fresh broccoli and broccoli stored under CA conditions (9.32 and 9.47 °Brix, respectively). While for the sample stored at atmospheric conditions an increase in soluble solids content was observed first at 9th

(10.60 °Brix) and higher at day 21st of storage (15.38 °Brix). This fact is explained because carbohydrates are extensively metabolized during the shelf life, due to high respiratory activity (Finger et al., 1999; Kader, 1992; Pramanik et al., 2004) and above all, for the great loss of water that makes the total solids more concentrated.

Table 1: Weight loss, firmness, color and soluble solids content (SSC) evolution of broccoli plants stored under controlled atmosphere (CA) conditions (1-2 °C, 85-90% RH, 10% O₂ and 5% CO₂) and its comparison with broccoli plants stored under standard atmospheric (SA) conditions (1-2 °C and 85-90% RH).

Storage Period in days	0	3		9		21	
Sample	Fresh	SA	CA	SA	CA	SA	CA
Weight loss ¹	---	8.81±0.58d	2.33±0.50ef	20.60±0.90b	4.80±1.09e	41.38±3.28a	11.70±2.82c
Firmness ²	44.78±13.26a	19.75±6.00b	38.16±16.41a	6.77±1.47c	37.40±12.13a	1.28±0.38c	4.19±2.13c
L*	34.45±1.73a	32.12±0.61bc	30.93±1.11c	30.76±1.28c	32.07±1.28bc	33.53±0.44ab	32.55±0.70bc
a*	-5.59±0.61c	-4.57±0.46b	-4.68±0.54b	-3.35±0.54a	-4.49±0.50b	-3.07±0.49a	-4.22±0.20b
b*	12.77±0.79b	10.80±0.69c	10.61±0.58c	10.53±0.27c	10.34±1.38c	15.27±2.36a	10.65±0.39c
SSC ³	9.33±0.103c	9.37±0.16c	8.62±0.12d	10.60±0.28b	8.52±0.13d	15.38±0.44a	9.47±0.22c

¹ Expressed as g/100 g fresh weight.

² Expressed as Newton.

³ Expressed as °Brix.

Same letter in the same row means no significantly differences among the values (p<0.05).

N=6

L* lightness (L*=0 yields black and L*=100 diffuse white).

a* position between red/magenta and green (negative values indicate green while positive values indicate red/magenta).

b* position between yellow and blue (negative values indicate blue and positive values indicate yellow).

3.3. Antioxidant activity and ascorbic acid evolution

Antioxidant activity values, expressed as mg Trolox/100 g FW, decreased during the storage regardless the conditions. However, the AA values were statistically lower in atmospheric conditions (SA) than in CA stored broccoli plants (Figure 1-A).

Similar behavior was observed in terms of ascorbic acid evolution (Figure 1-B). In this case, significant differences were observed between treatments at the end of the storage (day 21). Therefore, for CA samples were obtained higher values of antioxidant activity and ascorbic acid (69.06 mg Trolox/100 g FW and 52.41 mg ascorbic acid/100 g FW, respectively) than for SA samples (54.83 mg Trolox/100 g FW and 47.66 mg ascorbic acid/100 g FW, respectively) at the end of storage, this is in agreement with those published by other authors, such as Vallejo et al., 2003c. In fact, according the Pearson's test, antioxidant activity and ascorbic acid values were highly correlated ($r=0.82$, $p<0.01$).

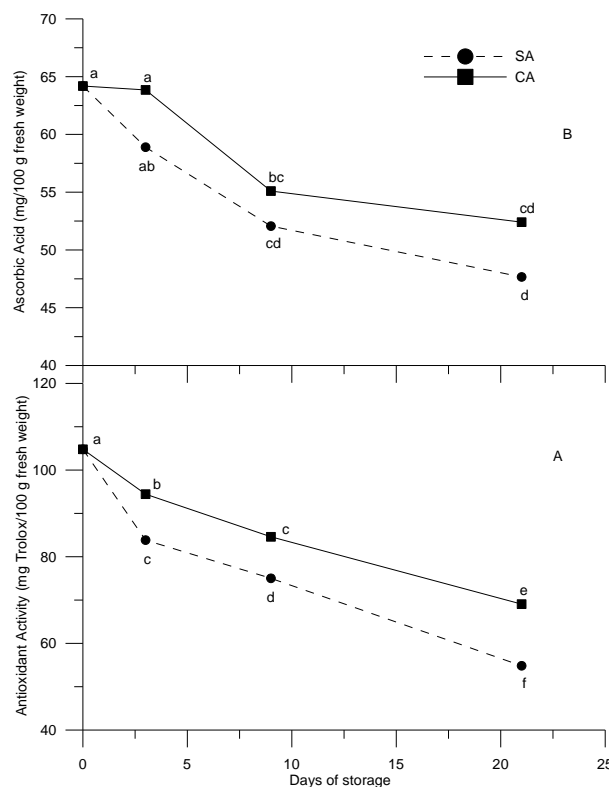


Figure 1: Antioxidant activity (A) and ascorbic acid (B) evolution in broccoli plants stored under controlled atmosphere (CA) conditions (1-2°C and 85-90% RH, 10% O₂ and 5% CO₂) and its comparison with broccoli plants stored under standard atmospheric (SA) conditions (1-2 °C and 85-90% RH). Same letter means no significantly differences among the values ($p<0.05$). N=6.

3.4. Carotenoid and chlorophyll pigments evolution with the storage conditions

The influence of the storage conditions on these compounds is summarized in Table 2. Statistically similar behavior was observed in carotenoid and chlorophyll pigments. At the end of storage the concentration of lutein decreased, being this decrease higher for the SA samples than for CA samples. It can be observed that the concentration of β -carotene and both chlorophylls pigments was statistically similar during the storage under CA conditions. In these samples, broccoli plants kept the same concentration as in fresh samples. On the other hand, in the case of lutein, the storage had a negative influence in its concentration.

These results are in agreement with other studies, (Forney and Riji, 1991; Wang, 1979) where higher concentrations of CO₂ (20, 30 and 40%) were used compared with the conditions fixed in our study (5%). They also reported that CA storage reduced the loss of chlorophylls and ascorbic acid. This fact could be observed for the rapid tissue yellowing of control broccoli tissues. A correlation was observed between chlorophyll pigments evolution and weight loss during the storage (Pearson's correlation coefficient $r=-0.84$, $p<0.01$). This correlation and its causes are still not clear in the literature (Barth et al., 1992; Toivonen and Sweeney, 1998; Zhuang et al., 1997).

There is a relationship between measured color parameters and carotenoid and chlorophyll pigments. According to the Pearson's correlation test, the parameter a^* was highly correlated with lutein, chlorophyll A and chlorophyll B values ($r=-0.71$, $p<0.01$) and the parameter b^* was correlated with lutein, β -carotene, chlorophyll A and chlorophyll B ($r=-0.35$, $p<0.05$). The color changes are related to the yellowing process of broccoli inflorescences and to the degradation of carotenoids and chlorophylls (Eason et al., 2007b; King and Morris, 1994).

Table 2: Carotenoid and chlorophyll pigments evolution in broccoli plants stored under controlled atmosphere (CA) conditions (1-2 °C and 85-90% RH, 10% O₂ and 5% CO₂) and its comparison with broccoli plants stored under standard atmospheric (SA) conditions (1-2 °C and 85-90%RH).

Storage Period in days	0		3		9		21	
Sample	Fresh	SA	CA	SA	CA	SA	CA	
Lutein ¹	0.60±0.01a	0.47±0.03b	0.46±0.003b	0.48±0.04b	0.50±0.04b	0.31±0.02c	0.44±0.06b	
β-Carotene ¹	0.80±0.03a	0.75±0.07ab	0.80±0.08a	0.84±0.09a	0.85±0.09a	0.66±0.04b	0.78±0.13ab	
Chlorophyll A ¹	9.38±1.17a	7.64±0.24b	9.03±0.60a	4.99±0.15c	8.51±0.70ab	4.99±0.55c	8.49±0.39ab	
Chlorophyll B ¹	3.24±0.42a	2.76±0.09b	3.17±0.32ab	1.80±0.07c	3.18±0.38ab	1.77±0.24c	3.16±0.13ab	

¹ Expressed as mg/100 g fresh weight.

Same letter in the same row means no significantly differences among the values (p<0.05).

N=6

3.5. Total and individual phenolic compounds evolution with the storage conditions

Table 3 summarized the phenolic compounds evolution in SA and CA broccoli samples during storage. The TPC found in fresh broccoli (147.15mg chlorogenic acid equivalent/100g fresh weight) was in accordance with the values reported in the literature (Koh et al., 2009; Sousa et al., 2008), and no significant differences were observed between fresh and CA stored broccoli during storage (139.56 mg chlorogenic acid equivalent/100 g fresh weight at the end of the storage, under CA conditions). In contrast, SA samples exhibited significant lower amounts of TPCs (98.20 mg chlorogenic acid equivalent/100 g fresh weight at the end of the storage). This fact is explained by the high respiration rate of broccoli stored under standard conditions (SA) (Izumi et al., 1996), that might increase the metabolism and therefore the degradation of phenolic compounds (Vallejo et al., 2003c). We observed that high values of antioxidant activity are strongly associated (Pearson's correlation coefficient $r=0.65$, $p<0.01$) with high content of phenolic compounds in this plant. The same behavior was also observed by other authors (Ou et al., 2002; Podsedek, 2007; Wu et al., 2004).

Regarding the individual phenolic compounds, quercetin was the most abundant, followed by kaempferol. These results are in agreement with previous works found in the literature (Koh et al., 2009; Martínez et al., 2007; Vallejo et al., 2003d). In all cases, the concentration of the individual phenolic compounds sharply diminished in SA broccoli, while the diminution in CA samples was less severe (Table 3). Therefore, the phenolic compounds degradation can be slowed down by mean of CA treatments (Moreno et al., 2006).

Phenolic acids and flavonoids compounds (Table 3) decreased their concentration during the storage regardless the storage conditions. However a higher diminution was observed in those broccoli plants stored under SA conditions (62.53% and 60.50% of losses of phenolic acids and flavonoids respectively) than in CA conditions (25.06% and 44.24% of losses of phenolic acids and flavonoids respectively) at the end of the storage (21 days) compared with fresh sample. Higher losses of these compounds were previously reported by Vallejo et al., 2003c. These authors observed that phenolic acids decreased their concentration in 50.70% and flavonoids in 61.5% (1 °C, 17% CO₂ and 2% O₂).

Table 3: Total phenolic content (TPC) and individual phenolic compounds evolution in broccoli plants stored under controlled atmosphere (CA) conditions (1-2 °C and 85-90% RH, 10% O₂ and 5% CO₂) and its comparison with broccoli plants stored under standard atmospheric (SA) conditions (1-2 °C and 85-90% RH).

Storage Period in days		0	3	9	21		
Sample	Fresh	SA	CA	SA	CA	SA	CA
TPC ¹	147.15±5.86a	130.43±1.53b	148.28±1.26a	96.09±8.69c	147.22±21.02a	98.20±4.09c	139.56±8.89ab
Phenolic Acids	Gallic Acid ²	1.80±0.09a	1.12±0.10c	1.28±0.06b	0.58±0.02f	1.15±0.08c	0.97±0.06d
	Chlorogenic Acid ²	1.38±0.23a	1.11±0.21b	1.05±0.01b	0.62±0.03c	1.11±0.15b	1.14±0.05b
	Sinapic Acid ²	1.25±0.55a	1.43±0.12a	1.16±0.85a	0.18±0.17b	1.07±0.19a	1.21±0.20a
Flavonoids	Quercetin ²	6.03±0.22a	4.77±0.65b	5.74±0.26a	1.75±0.03e	5.52±0.57a	3.44±0.13c
	Kaempferol ²	3.29±0.32a	2.42±0.15c	2.66±0.16bc	1.18±0.07e	2.82±0.25b	1.76±0.08d

¹TPC: Total phenolic compounds expressed as mg of chlorogenic acid equivalent/100 g fresh weight.

² Expressed as mg/100 g fresh weight.

Same letter in the same row means no significantly differences among the values (p<0.05).

N=6

3.6. *Intact glucosinolates compounds evolution during the storage*

The influence of storage conditions on intact glucosinolates concentration is summarized in Table 4. The variation of glucosinolates concentration is a response of two mechanisms: the induction of glucosinolates biosynthesis by an unknown mechanism (Mithen et al., 2000; Xu et al., 2006) and their hydrolysis by myrosinase (Schreiner et al., 2007). Furthermore, the different response of glucosinolates groups during storage could be caused by their different biosynthesis (Schreiner et al., 2007).

In Table 4 glucosinolates have been arranged according to their chemical structure, as aliphatic (alkyl, alkenyl and hydroxyalkenyl), indole and aromatic glucosinolates.

According to the data showed in Table 4, aliphatic glucosinolates increased significantly their concentration during the storage in SA conditions however, the values for the CA remain practically constant during the storage. The opposite behavior was observed for indole and aromatic glucosinolates; a diminution was observed in SA samples during the storage, with no statistical significance variations in CA samples. Generally, degradation of glucosinolates is due to glucosinolate hydrolysis catalyzed by endogenous thioglucosidases, namely the myrosinases (Mikkelsen et al., 2002) and it is assumed than the increase in glucosinolate concentration by biosynthesis is controlled and modified atmospheres in a stress response due to the increased CO₂ and decreased O₂ concentrations (Bennett and Wallsgrove, 1994; Verkerk et al., 2001).

In broccoli heads, the concentration of alkyl glucosinolates (glucoraphanin, glucoiberin and glucoalyssin) increases at the beginning of the storage period (3-9 days) for CA and SA samples, however at the end of storage (21 days) the concentration of these compounds decreases for SA samples. This is in agreement with other authors such as Schreiner et al. (2007) although in their studies the CA was a mixture of 21% CO₂ and 1% of O₂. In addition, glucoiberin and glucoalyssin concentration did not change at the end of storage for the CA sample compared with the values of fresh broccoli. This pattern could be explained taking into account that the myrosinase is inactivated by elevated CO₂ concentration (Jia et al., 2009).

Thus, the most relevant alkyl glucosinolate, glucoraphanin (precursor of anticancer isothiocyanate sulforaphane), showed a bigger increase in CA sample compared to the fresh sample (almost 88%) at the end of storage (21 days) in contrast to than previously reported for broccoli under modified atmospheres (17% CO₂ and 2% O₂ at 1 °C during 8 days), where a 50% increase of this compound was shown (Vallejo et al., 2003c).

For SA sample the alkenyl glucosinolates (sinigrin and gluconapin) and the hydroxyalkenyl glucosinolate (progoitrin) initially increased their concentration, and also increase the concentration of sinigrin and progoitrin for CA sample, after 3rd day of storage. This increase was associated with enhanced synthesis or a release of bound compounds during storage, and with physiological changes in the tissues during the vegetable senescence (Hansen et al., 1995; Jones et al., 2006; Martínez et al., 2007), being this changes greater for SA sample. However, at the end of storage (21 days) a different behavior is observed for each alkenyl glucosinolates, this is also observed in other studies of various controlled and modified atmospheres such as, Schreiner et al. (2007). The concentration of sinigrin decreases in SA sample and remains constant in CA sample, the concentration of gluconapin increase in both case, the concentration of glucobrassicinapin increase in SA and remains constant in CA sample and the concentration of progoitrin remains constant for reference sample (SA) and increase in CA sample at the end of storage and comparing the values with fresh sample of broccoli.

In the stored broccoli heads, total indole and aromatic glucosinolates concentration remained unchanged for CA samples at the end of storage (21 days) (Schreiner et al., 2007). The content of glucobrassicin, 4-methoxyglucobrassicin (indole glucosinolates) and gluconasturtiin (aromatic glucosinolate) decreased at the beginning of storage (3-9 days) and the content of neoglucobrassicin (indole glucosinolate) increased at this time of storage. At the end of storage the predominant glucosinolate is glucobrassicin (100.74 µmol sinigrin equivalent/100 g fresh weight in CA sample, and 62.43 µmol sinigrin equivalent/100 g fresh weight in SA sample), this is also observed in others studies, such as Vallejo et al. (2003c), with higher percentage of CO₂ (17%) and lower percentage of O₂ (2%).

Regarding the total content of glucosinolates (Table 4), no significant differences were observed between fresh, SA and CA samples during the storage. However, similar concentration of each family (total aliphatic, alkenyl, indolyl and aromatic glucosinolates) in fresh and CA samples were found at the end of the storage. Therefore, the proposed CA conditions helped to maintain the aliphatic, indole and aromatic concentration at 21 days. Similar results were also observed for other conditions of modified atmosphere storage (Schreiner et al., 2007).

Table 4: Intact glucosinolates content evolution in broccoli plants stored under controlled atmosphere (CA) conditions (1-2 °C and 85-90% RH, 10% O₂ and 5% CO₂) and its comparison with broccoli plants stored under standard atmospheric (SA) conditions (1-2 °C and 85-90% RH).

Storage Period in days	0	3		9		21	
Sample	Fresh	SA	CA	SA	CA	SA	CA
<i>Alkyl GS</i>							
Glucoraphanin ¹	2.33±0.03e	11.34±1.18a	5.92±0.17c	10.28±0.48b	5.16±1.09cd	1.35±0.12f	4.39±0.09d
Glucoiberin ¹	0.12±0.03d	1.43±0.10a	0.37±0.05c	0.49±0.01b	0.11±0.03d	0.07±0.02d	0.05±0.02d
Glucoalyssin ¹	0.58±0.10c	0.75±0.05c	0.60±0.05c	2.84±0.31a	1.67±0.25b	0.15±0.01d	0.52±0.05c
<i>Alkenyl GS</i>							
Sinigrin ¹	0.57±0.03b	0.97±0.09a	0.92±0.07a	0.58±0.03b	0.59±0.09b	0.22±0.04c	0.58±0.04b
Gluconapin ¹	13.91±0.33d	15.29±1.10cd	13.70±0.71d	18.17±1.31b	14.85±2.43d	22.41±1.95a	17.05±0.71bc
Glucobrassicinapin ¹	54.01±3.02c	58.92±4.10c	56.50±2.60c	70.13±5.60b	56.88±7.94c	81.57±8.71a	60.18±2.44c
<i>Hydroxyalkenyl GS</i>							
Progoitrin ¹	0.93±0.17e	8.17±0.63a	4.29±0.36b	1.97±0.12c	1.27±0.11de	1.21±0.19de	1.55±0.17cd
Total Aliphatic GS¹	72.45±3.71c	96.87±7.25a	82.30±4.01bc	104.46±7.86a	80.53±11.83bc	106.98±11.04a	84.32±3.52b
Glucobrassicin ¹	113.92±0.56a	77.71±3.45c	108.31±3.68ab	70.10±3.30cd	98.48±11.32b	62.43±7.10d	100.74±2.88ab
4-Methoxyglucobrassicin ¹	6.29±0.63c	5.04±0.29d	3.60±0.46e	3.10±0.18e	1.23±0.37f	14.30±1.55a	12.94±0.94b
Neoglucobrassicin ¹	0.51±0.42d	2.08±0.30c	2.14±0.16c	5.68±0.34a	2.07±0.18c	2.80±0.39b	0.64±0.19d
Total Indole GS¹	120.72±1.61a	84.83±4.04c	114.05±4.30ab	78.88±3.82c	101.78±11.87b	79.53±9.04c	114.32±4.01ab
Gluconasturtiin							
Total Aromatic GS¹	10.83±0.18ab	6.27±0.40d	8.31±0.49c	8.19±0.25c	11.10±0.38a	8.19±0.13c	10.51±0.36b
Total Glucosinolates¹	204.00±5.50ns	187.97±11.69ns	204.66±8.80ns	191.53±11.93ns	193.41±24.19ns	194.70±20.21ns	209.15±7.89ns

¹ Expressed as μmol of sinigrin equivalent/100 g fresh weight.

Same letter in the same row means no significantly differences among the values (p<0.05). (ns) no significance.

N=6

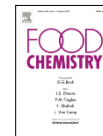
4. Conclusions

The CA storage conditions studied in this work (10% O₂ + 5% CO₂) were very effective on maintaining the outer quality parameters of broccoli. In fact, this CA conditions kept the visual aspects, such as weight loss, yellowing and loss of humidity and turgor. The health promoting compounds in broccoli, such as chlorophylls and phytochemicals, including carotenoids, total phenolic compounds, phenolic acids, flavonols and glucosinolates, as well as the antioxidant activity were preserved under the tested CA conditions. Therefore, we have proved in our work that it is not necessary to reach very aggressive CA conditions to achieve satisfactory results in terms of quality and bioactive compounds protection in broccoli plants. Although, most of the literature about CA broccoli studies (Cantwell and Suslow 1999; Jones et al., 2006; Toivonen and Forney, 2004) recommend that the ideal atmospheres to maintain postharvest quality in broccoli are 1-2% O₂, 5-10% CO₂ when temperature is kept between 0 and 5 °C and 98-100% RH. We have proved in our work that it is not necessary to have these strict conditions to extend the postharvest life of broccoli.

Acknowledgments

Authors thank FEDER's funds for the financial support. D.G.G. and M.F.F.L. are grateful to the "Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria" (INIA) of Spain for his research contract (DOC-INIA) and for her doctoral scholarship. Part of this research has been fund by Junta de Extremadura and the European Social Funds (Project GR10006).

4.2.b.- Different postharvest strategies to preserve broccoli quality during storage and shelf life: controlled atmosphere and 1-MCP



Food Chemistry (accepted)

M.F. Fernández-León¹, A.M. Fernández-León¹, M. Lozano¹, M.C. Ayuso^{2*}, D. González-Gómez^{1,3}

¹Technological Institute of Food and Agriculture (INTAEX), Junta de Extremadura. Ctra Cáceres S/N, 06071 Badajoz, Spain.

²Agriculture Engineering School, University of Extremadura, Ctra. Cáceres S/N, 06007 Badajoz, Spain.

³Current address: Department of Analytical Sciences, Science School, The National University of Distance Education (UNED), Paseo Senda del Rey, 9, 28040 Madrid, Spain.

Abstract

Broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) is a very perishable vegetable that requires the application of postharvest techniques to extend their marketability. Controlled atmosphere and 1-MCP treatments are the most used postharvest techniques to extend the shelf life of broccoli and reduced post-harvest deterioration. Thus, the aim of this study was to evaluate the visual, physicochemical and functional changes of broccoli head samples stored at 1-2 °C and 85-90% relative humidity (RH) in air (Control samples), under controlled atmospheres conditions (10% O₂ and 5% CO₂) (CA samples) and treated with 1-MCP (0.6 µL/L). In all cases, samples were stored under conditions of temperature and RH described above, and then maintained at 20 °C for 2 and 4 days, in order to assess their shelf life. Beside the comparative studies between treatments, all the parameters were as well compared with the initials obtained from the sample right after harvest (Fresh sample). According to the results, the most suitable postharvest treatment to extend broccoli quality during storage and shelf life, in terms of maintaining the visual quality and reducing loss of health-promoting compounds, was achieved by the storage under controlled atmosphere conditions described in this paper.

The use of 1-MCP reduced the loss of green color and chlorophyll pigments, but only during cold storage not during the shelf life at 20 °C.

Keywords: overall appearance; physicochemical parameters; health-promoting compounds; phenols; glucosinolates; HPLC-MS/MS.

1. Introduction

Broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) has been described as a vegetable with a high nutritional value, due to its significant content of vitamins, antioxidants and anticarcinogenic compounds. For this reason, broccoli is a crop, which is increasing popularity. However, broccoli is a highly perishable product and its visual and organoleptic qualities greatly depend on its storage conditions. The effect of different storage methods on shelf life, visual quality and nutritional quality of broccoli heads has been widely investigated (Izumi et al., 1996; Serrano et al., 2006; Vallejo et al., 2003c). During the last decade, storage of broccoli florets under MAP has also been studied, as part of the rising demand for minimally-processed vegetables (Izumi et al., 1996).

The combination of a timely harvest, cooling, controlled atmosphere, and the use of non-challenged and insurance products (such as 1-MCP), are some of the tools used to extend the marketing of broccoli. These practices reduce the rate of respiration and loss of quality of the vegetable directly, affecting the production and action of ethylene, processes that are involved in the maturation and senescence of fruits and vegetables (Mattheis et al., 2000).

Controlled atmospheres (CA) is a very effective postharvest technique for maintaining the quality of broccoli heads. The main effects of this postharvest technique are the delay in tissue turgidity and the reduction of chlorophylls loss, increasing in double time the postharvest life (Toivonen and Forney, 2004), moreover, in addition, CA has been proved to retards the degradation of the bioactive compounds (Vallejo et al., 2003c). Cantwell and Suslow (1999) reported that broccoli can be benefitted by 1-2% O₂ with 5-10% CO₂ atmospheres at a temperature range of 0-5 °C, extending its shelf life. However, temperature fluctuations during commercial handling could induce

that the stored broccoli produces unpleasant sulfur-containing volatiles at these low O₂ levels. For this reason, it is advisable to use atmospheres to maintain O₂ at 3-10% and CO₂ at about 5-10% to avoid the development of these undesirable off-odor volatiles from stored broccoli plants (Cantwell and Suslow, 1999). In this research work, the broccoli heads samples were stored under an atmosphere composed of 10% O₂ and 5% CO₂ at 1-2 °C.

In the last decades, a new tool, 1-methylcyclopropene (1-MCP), has been added to the list of options for extending the shelf life and quality of plant products. Not only does commercial use of 1-MCP promise to advance industrial agriculture, but also using 1-MCP in research programs promises to advance our understanding and provide new insights into plant ethylene responses (Watkins, 2006). To date, 1-MCP has been marketed as SmartFresh™ for fruits and vegetables. The control of fruit and vegetables ripening by 1-MCP is affected by species, cultivar, maturity (internal ethylene concentration; IEC) and external factors such as treatment temperature and duration, and delays between harvest and 1-MCP treatment (Watkins, 2006; Watkins, 2008). The effective concentration of 1-MCP for broccoli is between 0.1 and 10 µL/L (Yuan et al., 2010), the application time depends on the temperature at which treatment is done, at lower temperature is necessary more application time (Watkins, 2006). In our case, was chosen a 1-MCP concentration of 0.6 µL/L and was applied during 24 hours at 1 °C. There is extensive literature on the effect of 1-MCP on the quality parameters of broccoli, but unlike in the case of controlled atmospheres, there is not extensive literature on the effects of this postharvest treatment on bioactive compounds (Yuan et al., 2010).

Thus, the objective of the present study was to investigate the effect of two different postharvest treatments, controlled atmospheres and 1-MCP, on overall appearance, on physicochemical parameters and on health-promoting compounds, and well as antioxidant activity of these bioactive compounds, during cold storage and during shelf life at 20 °C. Comparing these data with those obtained in cold storage only (Control) and with those from the broccoli heads at harvest (Fresh).

2. Materials and methods

2.1. Plant material

Broccoli (*Brassica oleracea* L. var *italica* cv. Parthenon) plants were grown outside, in an alluvial soil with a sandy-loam texture, slightly acidic, and with a low organic material content. The crop was located at the experimental fields placed in Vegas Bajas del Guadiana, in Extremadura (Spain). Plants were harvested during the second week of January 2010, and samples were rapidly transported to the laboratory where they were stored according the experimental design, from 0 to 27 days.

2.2. Experimental design

About 123 kg of broccoli heads (about 20-25 cm diameter each one) were brought to the laboratory and were selected, discarding damaged plants. A total of 144 broccoli heads were obtained after selecting and were classified into 4 different lots:

1. Fresh sample: 9 broccoli heads were analyzed freshly harvested (0 days of storage).
2. Control sample: 45 broccoli heads were divided into 5 sets of 9 broccoli heads each one and stored at 1-2 °C and 85-90% relative humidity (RH) during 2, 6, 13, 20 and 27 days.
3. Controlled atmosphere sample (CA): batches of 9 broccoli heads were placed in five different 530-litres poly(methyl methacrylate) chambers (Tecnidex S.A., Valencia, Spain) for a period of 2, 6, 13, 20 and 27 days under controlled atmosphere (CA). The CA conditions were 1-2 °C, 85-90% RH, 10% O₂ and 5% CO₂.
4. 1-MCP sample: 45 broccoli heads were treated with SmartFresh™ that was supplied by AgroFresh Inc. (Rohm and Haa Europe Trading Aps, S. L., Spain), and it was applied according to the commercial recommendations, 1-MCP treatment (0.6 µL/L) was performed in 1 m³ plastic container for 24 hours at 1 °C. After venting, the sample were divided into 5 sets of 9 broccoli heads each

one and stored at 1-2 °C and 85-90% relative humidity (RH) during 2, 6, 13, 20 and 27 days.

In all analysis 3 broccoli heads were analyzed (for each sampling day, storage date and treatment). After cold storage, samples were stored at 20 °C for 2 and 4 days to simulate commercial practices (shelf life conditions).

Determinations of overall appearance, weight loss, firmness and color were made with the whole broccoli heads for each storage date and for each treatment. Then, they were cut into florets and a homogenate was prepared to make soluble solids content determination. The rest of broccoli florets were frozen at -80 °C to carry out further analysis of functional content.

2.3. Overall appearance evaluation

In order to evaluate the effect of controlled atmospheres and 1-MCP stored on broccoli heads, appearance of broccoli heads were individually scored using a subjective scale of 5 to 1 as also described by Winkler et al., (2007) at each sampling day. In the case of appearance, a scale composed of pictures and a brief description for each score value was used, with 5=excellent, no defects; 4=very good, minor defects; 3=fair, moderate defects; 2=poor, major defects; and 1=inedible. A score of 3 was considered as the limit of marketability and a score of 2 as the limit of edibility (Amodio et al., 2007).

2.4. Physicochemical parameters

2.4.1. Weight loss

Weight of individual heads was measured (Mettler-Toledo Classic PB3001-S, Mettler-Toledo, Madrid, Spain) at the harvest day and after the different sampling time for each post-harvest treatment. The weight loss was expressed as %.

2.4.2. Firmness

Firmness was measured using a Stable Micro Systems Texture Analyzer TA-XT2i (Aname, Madrid, Spain) through a compression assay on the whole broccoli head. The force was applied to produce a 2% deformation by a 100 mm aluminium plate.

Force/deformation curves were recorded using the computer programme of the texture analyzer and the maximum force (N) was calculated.

2.4.3. Color

Color parameters (L^* , a^* and b^*) were measured in color space CIELab by a Konica Minolta CM-3500d spectrophotometer (Aquateknica, S.A., Madrid, Spain) using the illuminant D65, diffuse illumination, a viewing angle of 8° and a measurement circular area of 30 mm diameter.

2.4.4. Soluble solids content

The soluble solids content (SSC) of the juice from a homogenate, obtained from 10 broccoli florets, was determined by refractometry using an RE40 refractometer (Mettler Toledo, Madrid, Spain), results were expressed as $^\circ$ Brix. A lab blender was used for homogenate preparation (Moulinex, Madrid, Spain).

2.5. Functional content analysis

2.5.1. Ascorbic acid content

Ascorbic acid was determined following a previously published method of our group (Bernalte et al., 2007). The quantification was carried out by the external standard calibration method and the results were expressed as mg of ascorbic acid/100 g of fresh weight (FW).

2.5.2. Carotenoid pigments determination

Carotenoid pigments were determined by HPLC according to Mínguez-Mosquera and Hornero-Méndez (1993) method slightly modified by García et al. (2007), from the saponified acetone extracts of broccoli plants. The carotenoids content was quantified by external standard calibration as the sum of the two principals carotenoids in broccoli (β -carotene and lutein) (González-Gómez et al., 2011), and the results were expressed as mg of β -carotene/100 g FW.

2.5.3. Chlorophyll pigments determination

Chlorophyll A and B contents were determined using multivariate calibration by means of Partial Least Squares (PLS) (Fernández-León et al., 2010). Briefly, acetone chlorophyll extracts were obtained from the different broccoli plant sample. After that, UV spectrum of each sample was collected for the range 600-700 nm and the amount of chlorophylls A and B was determined by applying a PLS methodology optimized by means of a set of chlorophyll standards. The chlorophyll content was quantified as the sum of chlorophyll A and B, and the results were expressed as mg chlorophyll A/100 g FW.

2.5.4. Total phenol content

The determination of total phenol content (TPC) was performed according to Bernalte et al. (2007) and Lima et al. (2005) methods based on Folin-Ciocalteu colorimetric method (Singleton and Rossi, 1965). Briefly, phenolic compounds were extracted from broccoli plants using a ethanol acidic extraction solvent by exposing the sample to the extractive solvent (80:20 ethanol:water 1% HCl) during 20 minutes by triplicate. After extraction, the ethanolic fraction was evaporated and reconstituted to 100 mL with ultrapure water. The content of phenolic compounds was determined spectrophotometrically at 760 nm based on Folin-Ciocalteu method (Singleton and Rossi, 1965). The results were expressed as mg of chlorogenic acid equivalent/100 g FW.

2.5.5. Intact glucosinolates determination

Intact glucosinolates were extracted following Kiddle and Vallejo slightly modified methods (Kiddle et al., 2001; Vallejo et al., 2003b). A high-performance liquid chromatography instrument coupled to an Ion Trap mass spectrometer (Varian 500-MS, Varian Ibérica S.L., Madrid, Spain) was used for the intact glucosinolates separation and determination from the broccoli extracts. The chromatographic conditions used in this research were established before by Fernández-León et al. (2012) and Tian et al. (2005). The sum of intact glucosinolates identified was quantified using the calibration curve of sinigrin (Sigma-Aldrich) as an external standard and expressed as mg of sinigrin equivalent/100 g FW.

2.5.6. Antioxidant activity analysis

Antioxidant activity (AA) was evaluated according to the slightly modified procedure proposed by Cano et al. (1998). Briefly, 1 g of broccoli plant was solved in 10 mL of phosphate buffer (50 mM, pH 7.5). The antioxidant activity was measured spectrophotometrically at 750 nm by the reaction of 20 μ L of the plant extract with the radical ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt). Results were expressed as mg of Trolox/100 g FW.

2.6. Statistical analysis

For statistical studies SPSS 15.0 software was used (SPSS Inc. Chicago, IL, USA). Data were expressed as means \pm SD of six independent replicates and were studied using a one-way analysis of variance (ANOVA). When ANOVA detected significant differences between mean values, means were compared using Tukey's HSD test. Correlations were estimated with the Pearson test at $p < 0.01$ significance level.

3. Results and discussion

3.1. Overall appearance

After cold storage at 1 °C the Control and 1-MCP samples showed a significant reduction in visual appearance score with respect to the Fresh sample (Figure 1A), while this reduction in CA was lower in all cases, being the appearance score above the limit of marketability (score 3) at the end of storage. Control and 1-MCP samples passed the limit of edibility (score 2) after a refrigerated period of 20 days.

These results differ from those obtained by Yuan et al. (2010) for the samples treated with 1-MCP, as in our case visual quality loss was attributed to the weight loss and was not attributed to yellowing.

For shelf life samples (Figure 1B and C) and for each treatment, there was a loss of visual quality that was greater in the Control and 1-MCP samples. In the case of 2 days of shelf life (2SL) (Figure 1B) it was observed that CA samples were near the limit of marketability, while Control and 1-MCP samples were below the limit of edibility at the end of cold storage. For 4 days of shelf life (4SL) (Figure 1C) it was observed that

CA samples were already near the limit of edibility, while Control and 1-MCP samples were below this limit. Moreover, the samples near the score 1 were inedible by the appearance of rotting.

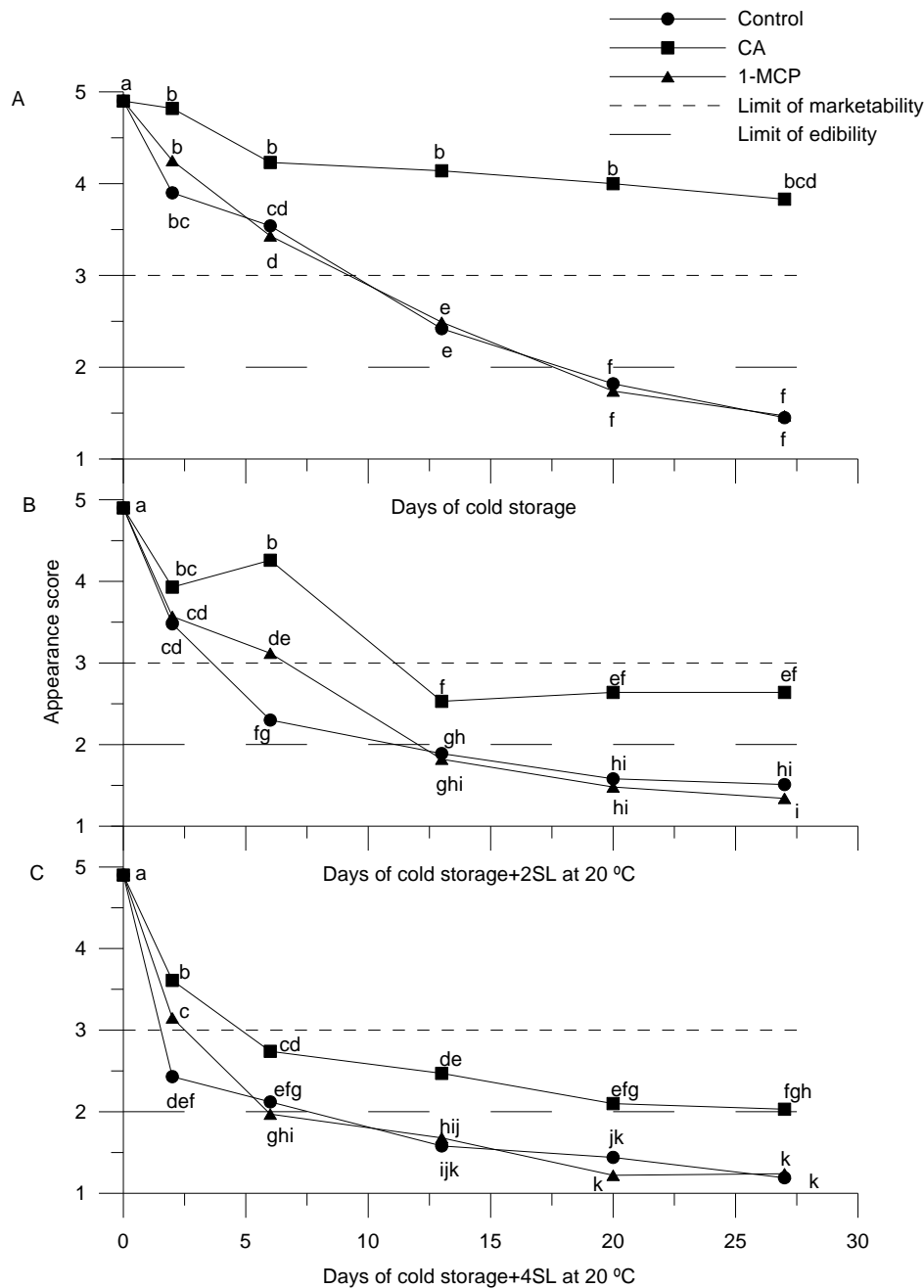


Figure 1: Overall appearance evaluation in Control, controlled atmosphere (CA) and 1-MCP samples during cold storage (1-2 °C) (A), after two days of shelf life (2SL) (B) and after four days of shelf life (4SL) (C) at 20 °C. Overall appearance scale: 5=excellent, no defects; 4=very good, minor defects; 3=fair, moderate defects; 2=poor, major defects; and 1=inedible. Same letter means no significantly differences among the values (p<0.05).

3.2. Physicochemical parameters

3.2.1. Weight loss

The loss of weight in Control and 1-MCP samples drastically increased during the cold storage (Table 1), being this loss 39.54% and 37.59%, respectively, after 27 days of cold storage while, at the same time, the weight loss in CA sample was 5.64%.

This behavior was also observed for weight loss in shelf life (Tables 2 and 3). It was found that the weight loss in Control and 1-MCP samples were around 40-45%, while for CA samples the weight loss was around 13-17% at the end of storage plus shelf life.

A high correlation was found between weight loss and appearance score (Pearson's correlation coefficient $r=-0.95$, $p<0.01$).

3.2.2. Firmness

With respect to the firmness, it was observed a decrease in this parameter along the cold storage for the three treatments; this decrease is more pronounced in Control and 1-MCP samples than in the CA samples (Table 1). The same behavior was observed for 2 and 4 days of shelf life (Tables 2 and 3), being in this case the decrease in firmness even greater.

According to the Pearson's test, weight loss and firmness values were highly correlated ($r=-0.83$, $p<0.01$), this fact is mainly related to turgid loss and dehydration (Simón et al., 2008).

3.2.3. Color

Concerning the color parameters, no relevant differences were observed for the lightness values (L^*) among Control, 1-MCP and CA samples with respect the Fresh sample, along the cold storage (Table 1). But at the end of cold storage and along shelf life (Tables 1, 2 and 3) the L^* values were significantly increased in all samples.

The parameter a^* remained constant during cold storage for CA and 1-MCP samples, while for Control sample increased along the cold storage (Table 1), from $a^*=-5.46$ to $a^*=-4.30$ at 27 days of cold storage.

For shelf life samples, it was observed a greater increase in a^* values, it was observed that for 2SL (Table 2) Control and 1-MCP samples presented higher a^* values than those presented by CA sample at the end of cold storage. However, the a^* values were statistically similar for all samples (Control, CA and 1-MCP) at 27 days of cold storage plus 4 days of shelf life (Table 3).

The parameter b^* increased during cold storage and after 2 and 4 days of shelf life for all samples, being this increase higher in Control samples (from $b^*=12.46$ to $b^*=17.52$) than in CA and 1-MCP samples (14.16 and 14.71, respectively) at 27 days of cold storage. While for 2SL and 4SL (Tables 2 and 3) the increase was higher in Control and 1-MCP samples than in CA samples at the end of cold storage.

The a^* and b^* values increase means the decrease in green color and the increase in yellow color, respectively, due to the yellowing of broccoli heads during storage (Eason et al., 2007b; King and Morris, 1994). The a^* and b^* values were higher for the Control sample than to the CA and 1-MCP samples at 27 days of cold storage. This means that the decrease in green color and the increase in yellow color is higher in Control samples than in CA and 1-MCP samples at the end of cold storage, however this behavior was not observed after shelf life.

3.2.4. Soluble solids content

Total soluble solids content (SSC) significantly increased during the storage in Control and 1-MCP samples (12.72 and 12.00 °Brix, respectively) while in CA samples (8.23 °Brix), no differences were observed at the end of cold storage (Table 1). For shelf life (2SL and 4SL) it was observed an increase of SSC in all samples, this increase was greater in Control and 1-MCP samples than in CA samples (Tables 2 and 3). This fact was due to the great loss of water that makes the total solids more concentrated (Kader, 1992; Pramanik et al., 2004). Thus, according to the Pearson's test was observed a high correlation between SSC and weight loss ($r=-0.92$, $p<0.01$).

Broccoli is a commodity that benefits from storage under increased CO₂ and reduced O₂ concentration atmospheres. The studied CA storage conditions tested in this research work, positively affected the maintenance of the overall appearance and physicochemical parameters of 'Parthenon' broccoli, compared to those stored under standard atmosphere (Control), as other authors also concluded (Eason et al., 2005; Eason et al., 2007b; Hansen et al., 2001; Izumi et al., 1996), and to those treated with 1-MCP, because the 1-MCP samples only kept the color but no any of the other parameters evaluated in this point, the treatment with 1-MCP delayed yellowing (Fan and Mattheis, 2000; Ku and Wills, 1999).

Thus, in these research works was assured that the modulation of temperature and controlled atmospheres storage was very important for delaying senescence in broccoli.

Table 1: Physicochemical parameters evolution of broccoli heads samples stored at 1-2 °C and 85-90% RH (Control), under controlled atmosphere (CA) conditions (1-2 °C, 85-90% RH, 10% O₂ and 5% CO₂) and treated with 1-MCP (0.6 µL/L) and stored at 1-2 °C, 85-90% RH later (1-MCP) and its comparison with broccoli heads freshly harvested (Fresh) on different days of cold storage.

Days of storage	Sample	Weight loss ¹	Firmness ²	L*	a*	b*	Soluble solids content ³
0	Fresh	---	54.41±1.88a	34.65±0.73h	-5.46±0.22bc	12.46±0.35def	8.13±0.10g
2	Control	5.19±0.44g	33.69±2.97d	36.72±0.36cdefg	-5.30±0.33b	14.68±0.32bc	8.33±0.27g
	CA	1.35±0.14gh	54.00±2.66a	36.75±0.24cdefg	-5.70±0.29bc	11.27±0.82f	7.75±0.14gh
6	1-MCP	2.36±0.34gh	37.88±4.86c	35.48±0.44fg	-5.72±0.24bc	12.41±1.01def	8.42±0.08fg
	Control	10.20±2.00d	14.81±3.71f	36.49±0.35efgh	-4.68±0.19a	15.49±0.37b	8.40±0.53fg
13	CA	2.06±0.24gh	46.95±1.27b	36.65±0.65defg	-5.76±0.37bc	12.36±0.98def	7.28±0.20h
	1-MCP	8.73±1.80de	14.97±1.03f	38.70±1.09abc	-5.53±0.30bc	13.61±0.65cde	8.18±0.12g
20	Control	19.89±2.97c	1.84±0.53g	37.89±0.66cde	-4.52±0.29a	18.03±0.38a	9.92±0.21e
	CA	2.23±0.70gh	35.71±1.44d	37.39±1.28cdef	-5.73±0.14bc	13.75±0.80cde	7.25±0.19h
27	1-MCP	18.21±3.46c	4.06±0.52g	37.36±0.65cdef	-5.49±0.22bc	14.86±0.36bc	9.02±0.18f
	Control	29.75±2.84b	2.01±0.19g	38.49±0.77bcd	-4.71±0.17a	17.27±1.10a	10.75±0.24d
20	CA	6.95±1.29de	28.87±0.62e	35.32±0.93gh	-5.90±0.31c	12.34±0.80ef	8.38±0.29fg
	1-MCP	32.42±2.23b	1.06±0.44g	37.14±0.52efg	-5.44±0.21bc	13.94±0.82bc	13.58±0.51a
27	Control	39.54±4.42a	1.37±0.10g	39.89±2.00ab	-4.30±0.29a	17.52±1.14a	12.72±0.55b
	CA	5.64±2.06g	17.10±1.64f	36.83±1.58cdefg	-5.67±0.22bc	14.16±1.04bc	8.23±0.21g
	1-MCP	37.59±3.73a	0.89±0.12g	40.55±1.14a	-5.63±0.32bc	14.71±0.59bc	12.00±0.68c

¹ Expressed as %.

² Expressed as Newton.

³ Expressed as °Brix.

Same letter in the same column means no significantly differences among the values (p<0.05).

Table 2: Physicochemical parameters evolution of broccoli heads samples stored at 1-2 °C and 85-90% RH (Control), under controlled atmosphere (CA) conditions (1-2 °C, 85-90% RH, 10% O₂ and 5% CO₂) and treated with 1-MCP (0.6 µL/L) and stored at 1-2 °C, 85-90% RH later (1-MCP) and its comparison with broccoli heads freshly harvested (Fresh) on different days of cold storage plus two days of shelf life (SL).

Days of storage	Sample	Weight loss ¹	Firmness ²	L*	a*	b*	Soluble solids content ³
0	Fresh	---	54.41±1.88a	34.65±0.73g	-5.46±0.22hi	12.46±0.35ef	8.13±0.10ef
2+2SL	Control	10.83±0.39de	26.11±0.69d	37.36±0.33ef	-5.20±0.16efgh	13.30±0.30e	8.25±0.16ef
	CA	6.48±0.69f	51.13±0.97b	37.29±1.17ef	-5.56±0.24i	11.94±0.39f	8.02±0.24f
	1-MCP	7.42±0.35ef	24.04±2.03d	36.70±0.56f	-5.36±0.10fghi	12.63±0.26ef	7.93±0.23f
6+2SL	Control	14.33±3.51d	12.01±1.25f	39.85±1.12abc	-5.02±0.05fgh	14.77±0.37cd	7.97±0.08f
	CA	7.42±0.48ef	34.25±1.58c	36.55±0.51f	-5.40±0.22ghi	12.08±0.21f	8.60±0.31def
	1-MCP	11.92±2.04de	10.67±1.12f	37.91±0.86def	-5.35±0.10fghi	12.68±0.30ef	9.10±0.63d
13+2SL	Control	28.80±1.89c	1.47±0.55h	38.54±0.93de	-4.52±0.18abc	15.66±0.46bc	11.42±0.10c
	CA	13.09±1.47d	23.94±2.79d	37.42±0.49e	-5.14±0.10fgh	12.20±0.27f	8.87±0.21de
	1-MCP	29.72±5.14bc	1.88±0.31h	40.12±0.84ab	-4.83±0.12bcd	15.14±0.76bcd	11.13±0.27c
20+2SL	Control	34.59±3.73b	1.92±0.46h	38.42±0.30de	-4.43±0.26a	15.92±0.24ab	12.27±0.97b
	CA	13.38±1.42d	15.19±0.66e	37.23±0.33ef	-5.05±0.28defg	14.36±0.38d	9.30±0.34d
	1-MCP	41.22±4.09a	1.68±0.17h	39.19±0.83bcd	-4.49±0.15ab	15.28±1.03bcd	13.77±0.51a
27+2SL	Control	42.19±4.36a	1.12±0.31h	40.84±0.59a	-4.58±0.10abc	16.01±0.32ab	13.90±0.24a
	CA	13.41±0.90d	9.02±1.33g	38.51±0.38cde	-4.87±0.14cde	14.59±0.52d	9.23±0.30d
	1-MCP	44.69±2.86a	0.44±0.12h	38.59±1.34bcde	-4.47±0.18a	16.60±0.30a	12.42±0.45b

¹ Expressed as %.

² Expressed as Newton.

³ Expressed as °Brix.

Same letter in the same column means no significantly differences among the values (p<0.05).

Table 3: Physicochemical parameters evolution of broccoli heads samples stored at 1-2 °C and 85-90% RH (Control), under controlled atmosphere (CA) conditions (1-2 °C, 85-90% RH, 10% O₂ and 5% CO₂) and treated with 1-MCP (0.6 µL/L) and stored at 1-2 °C, 85-90% RH later (1-MCP) and its comparison with broccoli heads freshly harvested (Fresh) on different days of cold storage plus four days of shelf life (SL).

Days of storage	Sample	Weight loss ¹	Firmness ²	L*	a*	b*	Soluble solids content ³
0	Fresh	---	54.41±1.88a	34.65±0.73f	-5.46±0.22ef	12.46±0.35i	8.13±0.10ij
2+4SL	Control	14.24±1.50fg	13.81±2.90e	39.76±0.62cde	-5.19±0.20def	17.90±0.28cd	8.28±0.31ij
	CA	9.60±0.49h	47.85±3.22b	41.30±0.49bc	5.40±0.33ef	14.52±0.30h	7.75±0.24j
	1-MCP	11.60±1.48gh	15.69±2.21de	40.20±0.63cd	-5.60±0.33f	17.68±0.33cdef	8.67±0.34hi
6+4SL	Control	23.65±1.22e	4.97±0.64fg	39.76±0.59cde	-4.61±0.20abc	17.54±0.60def	10.67±0.20e
	CA	14.75±1.20fg	32.18±3.73c	41.19±0.42bc	-5.52±0.23ef	15.29±0.30gh	7.97±0.27ij
	1-MCP	25.82±1.39e	6.84±0.50f	39.83±0.77cde	-4.75±0.34bcd	16.97±0.34ef	10.38±0.85ef
13+4SL	Control	37.71±3.59cd	2.01±0.77gh	41.18±0.87bcd	-4.54±0.29abc	17.97±0.66cd	12.75±0.19bc
	CA	13.86±1.18fg	18.97±2.67d	42.30±0.55ab	-5.70±0.32f	15.86±0.31g	9.73±0.69fg
	1-MCP	35.76±0.79d	1.34±0.39gh	39.84±1.03cde	-4.57±0.15abc	17.83±0.63cde	12.00±0.18cd
20+4SL	Control	38.55±0.96cd	0.86±0.46h	38.29±0.39e	-4.13±0.09a	18.45±0.31bc	11.77±0.48d
	CA	15.03±0.73f	5.65±0.47f	40.86±0.34bcd	-5.05±0.16cde	15.47±0.50g	9.47±0.60gh
	1-MCP	43.06±0.36ab	1.30±0.15h	39.58±0.46de	-4.16±0.35a	17.90±0.69cd	13.57±0.54b
27+4SL	Control	46.02±3.25a	1.24±0.54h	43.17±0.87a	-4.60±0.21abc	20.08±0.50a	14.57±0.35a
	CA	17.18±0.41f	7.72±0.75f	40.15±1.39cd	-4.39±0.27ab	16.81±0.30f	9.57±0.36fg
	1-MCP	39.78±2.59bc	0.91±0.09h	43.15±1.37a	-4.44±0.13ab	19.29±0.34ab	12.58±0.35cd

¹ Expressed as %.

² Expressed as Newton.

³ Expressed as °Brix.

Same letter in the same column means no significantly differences among the values (p<0.05).

3.3. Functional content analysis

3.3.1. Ascorbic acid content

Ascorbic acid content remained significantly constant for CA and 1-MCP samples (45.49 and 43.13 mg ascorbic acid/100 g FW, respectively), while for Control sample decreased (31.45 mg ascorbic acid/100 g FW) at the beginning of cold storage (2nd day) (Table 4).

Both in the middle of cold storage (6th day) and in shelf life, a decrease in the ascorbic acid content was observed, this decrease was higher in 1-MCP samples and then in Control samples, being the lowest in the CA samples. However, during the rest of cold storage, the decrease in the ascorbic acid content was higher in the Control and 1-MCP samples, obtaining significantly equal values, than in CA samples (Tables 4, 5 and 6). Therefore, ascorbic acid content was always higher for the CA samples than for Control and 1-MCP samples. So the CA studied conditions helped to preserve ascorbic acid concentrations in an efficient way.

This decrease of ascorbic acid content during cold storage is in agreement with published by other authors, such as Nath et al. (2011), Vallejo et al. (2003c) and Yuan et al. (2010).

Biological function of ascorbic acid can be defined as an enzyme cofactor, a radical scavenger, and as a donor/acceptor in electron transport at the plasma membrane. Ascorbic acid is able to scavenge the superoxide and hydroxyl radicals (Davey et al., 2000). That explains the correlation between ascorbic acid content and AA value found in our studies according to the Pearson's test ($r=0.87$, $p<0.01$).

3.3.2. Carotenoid pigments

Carotenoid content is given as the sum of β -carotene and lutein and expressed as mg β -carotene/100 g FW (major carotenoid). The results obtained were in agreement with other studies such as Fernández-León et al. (2012), Nath et al. (2011) and Yuan et al. (2010). As shown in Table 4, the carotenoid content remains practically constant in Control, CA and 1-MCP samples at the beginning of cold storage (2nd day), while at the end of cold storage, only the carotenoid content in the CA samples remained constant

(1.28 mg β -carotene/100g FW). The Control and 1-MCP samples showed a decrease in this content; this decrease was greater in Control samples than in 1-MCP samples (0.86 and 0.96 mg β -carotene/100 g FW, respectively). For 2 and 4 days of shelf life (Tables 5 and 6) was observed a decrease in carotenoid content for all samples during storage, this decrease was higher in 1-MCP sample and in Control sample, respectively.

Carotenoid pigments protect cellular membranes by scavenging/quenching free radicals (Singh et al., 2007). Therefore, these compounds constitute the essential lipid-soluble antioxidants. Thus the amount of carotenoids has to be related to the AA. In fact, the Pearson's correlation test indicates a high significant correlation between both values ($r=0.76$, $p<0.01$).

3.3.3. Chlorophyll pigments

Chlorophyll content were evaluated as the sum of chlorophyll A and chlorophyll B, and expressed as mg chlorophyll A/100 g FW, chlorophyll A is the pigment majority in broccoli (Fernández-León et al., 2010). As shown in Table 4, from the beginning of cold storage until day 13, there was a reduction in chlorophyll content, being this reduction less in CA and 1-MCP samples (17.09 and 15.34 mg chlorophyll A/100g FW, respectively) than in the Control sample (14.43 mg chlorophyll A/100 g FW). These results were in agreement with other studies of controlled atmospheres (Forney and Riji, 1991; Wang, 1979) and of 1-MCP treatment (Yuan et al., 2010). These authors also reported that CA storage and 1-MCP treatment reduced the loss of chlorophylls. This fact could be observed for the rapid tissue yellowing of Control broccoli tissues.

However, at the end of cold storage (Table 4) and during the shelf life (2SL and 4SL) (Tables 5 and 6) it was observed that the effect of 1-MCP was lower, being observed that the decrease in chlorophyll content for 1-MCP and Control samples were significantly higher than for CA samples.

The color changes are related to the yellowing process of broccoli inflorescences and to the degradation of chlorophylls (Eason et al., 2007b; King and Morris, 1994). Thus, according to the Pearson's test, in this research study was observed a correlation between chlorophyll content and color parameters (L^* , a^* and b) ($r=-0.78$, -0.74 and -

0.77, respectively, $p < 0.01$). Thus, the yellowing depends mostly on the chlorophyll degradation and it is not related with carotenoid content.

In addition, in this research study it was observed a relationship between chlorophylls content and antioxidant activity, according to Pearson's test ($r = 0.73$, $p < 0.01$). This is in agreement with the results obtained by other authors, such as Fernández-León et al. (2012) and Lai et al. (1980).

3.3.4. Total phenol content

Table 4 summarized the total phenol content (TPC) evolution in Control, CA and 1-MCP samples during cold storage comparing with Fresh sample. The TPC found in fresh broccoli (92.80 mg chlorogenic acid equivalent/100 g FW) was in accordance with the values reported in the literature (Fernández-León et al., 2012; Koh et al., 2009; Sousa et al., 2008). The TPC increased during cold storage for CA samples until day 13 (104.88 mg chlorogenic acid equivalent/100 g FW), this could be a response to the stress caused by the controlled atmospheres storage (Bennett and Wallsgrove, 1994), this increase was also observed for CA samples in shelf life until 6+2SL and 2+4SL, after this time a decrease was observed (Tables 5 and 6). At the end of cold storage, the TPC in CA samples remained statistically similar to that of the Fresh sample (96.15 mg chlorogenic acid equivalent/100 g FW) (Table 4).

In the other hand, for Control and 1-MCP samples a sharp decrease was observed during cold storage (Table 4), being this decrease higher for shelf life (Tables 5 and 6). This fact is explained by the high respiration rate of broccoli stored under air conditions (Izumi et al., 1996) that might increase the metabolism and therefore the degradation of phenolic compounds (Vallejo et al., 2003c).

Phenolic compounds are a large group of secondary metabolites in the plant kingdom, and they have different biological activities, but the most important are the antioxidant activity and the inhibitory effect of various kinds of tumors (Czeczot, 2000). Thus, according to the Pearson's test, we observed that the TPC were strongly correlated with antioxidant activity values ($r = 0.79$, $p < 0.01$). The same behavior was also observed by other authors (Ou et al., 2002; Podsedek, 2007; Wu et al., 2004).

Table 4: Functional content evolution of broccoli heads samples stored at 1-2 °C and 85-90% RH (Control), under controlled atmosphere (CA) conditions (1-2 °C, 85-90% RH, 10% O₂ and 5% CO₂) and treated with 1-MCP (0.6 µL/L) and stored at 1-2 °C, 85-90% RH later (1-MCP) and its comparison with broccoli heads freshly harvested (Fresh) on different days of cold storage.

Days of storage	Sample	Ascorbic acid ¹	Carotenoids ²	Chlorophylls ³	Total Phenol Content ⁴	Glucosinolates ⁵	Antioxidant activity ⁶
0	Fresh	47.62±1.27a	1.23±0.08bc	19.52±0.19a	92.80±4.27bc	123.31±6.09b	232.36±2.32a
	Control	31.45±0.94f	1.14±0.09cd	12.91±0.17f	77.78±1.79e	122.09±6.51b	201.10±1.81c
2	CA	45.59±2.86ab	1.34±0.10b	16.69±0.09b	109.08±3.85a	134.07±5.13a	222.20±2.19ab
	1-MCP	43.13±3.52abc	1.24±0.12bc	15.35±0.15c	90.09±1.64c	92.58±7.67d	218.53±2.76b
	Control	32.19±6.50ef	0.99±0.09def	12.07±0.11g	73.66±1.69e	70.96±4.56ef	192.52±1.94c
6	CA	40.53±0.90bcd	1.34±0.10b	16.57±0.09b	108.28±3.83a	120.22±2.86b	217.10±3.53b
	1-MCP	24.93±0.59g	1.04±0.06de	14.14±0.14e	65.80±1.20f	66.43±4.59f	203.03±5.80c
	Control	22.29±3.92gh	0.88±0.09fg	14.43±0.13de	64.88±1.61f	45.54±2.93g	158.84±8.05e
13	CA	42.63±0.81abcd	1.50±0.07a	17.09±0.62b	104.88±5.09a	107.42±5.59c	216.86±2.29b
	1-MCP	20.41±1.38gh	1.22±0.05bc	15.34±0.14c	76.28±2.11e	45.02±3.19g	151.79±1.99e
	Control	20.79±3.11gh	0.78±0.05g	12.66±0.11f	62.63±1.43f	26.44±3.37h	129.78±5.68f
20	CA	38.23±3.11cd	1.35±0.05ab	16.73±0.17b	85.87±2.29d	91.64±4.16d	224.54±12.40ab
	1-MCP	16.74±2.58hi	0.98±0.04ef	12.71±0.69f	73.16±1.95e	30.33±2.64h	171.32±8.95d
	Control	13.44±1.73i	0.86±0.05fg	9.38±0.21h	57.08±2.34g	21.54±2.15h	150.67±1.41e
27	CA	37.36±2.21de	1.28±0.06bc	14.80±0.33cd	96.15±1.44b	80.03±4.06e	220.06±6.76b
	1-MCP	13.69±1.03i	0.96±0.03ef	6.39±0.15i	60.77±0.74f	30.57±2.74h	138.97±2.18f

¹ Expressed as mg ascorbic acid/100 g FW.

² Expressed as mg β-carotene /100 g FW.

³ Expressed as mg chlorophyll A/100 g FW.

⁴ Expressed as mg of chlorogenic acid equivalent/100 g FW.

⁵ Expressed as mg of sinigrin equivalent/100 g FW.

⁶ Expressed as mg Trolox/100 g FW. Same letter in the same column means no significantly differences among the values (p<0.05).

Table 5: Functional content evolution of broccoli heads samples stored at 1-2 °C and 85-90% RH (Control), under controlled atmosphere (CA) conditions (1-2 °C, 85-90% RH, 10% O₂ and 5% CO₂) and treated with 1-MCP (0.6 µL/L) and stored at 1-2 °C, 85-90% RH later (1-MCP) and its comparison with broccoli heads freshly harvested (Fresh) on different days of cold storage plus two days of shelf life (SL).

Days of storage	Sample	Ascorbic acid ¹	Carotenoids ²	Chlorophylls ³	Total Phenol Content ⁴	Glucosinolates ⁵	Antioxidant activity ⁶
0	Fresh	47.62±1.27a	1.23±0.08ab	19.52±0.19a	92.80±4.27b	123.31±6.09a	232.36±2.32a
2+2SL	Control	32.07±2.26c	1.12±0.04bc	8.87±0.27g	68.79±1.79de	66.66±2.87d	165.20±4.20fg
	CA	43.22±2.56a	1.24±0.05a	15.88±0.09b	103.07±3.78a	95.81±3.43b	210.53±7.12cd
	1-MCP	25.00±3.37de	1.12±0.06c	13.36±0.17c	83.65±0.97c	73.98±5.55cd	168.20±6.03f
6+2SL	Control	31.38±3.56c	0.90±0.05d	8.52±0.26g	66.08±1.72ef	54.69±3.13ef	162.19±8.21fgh
	CA	37.05±2.35b	1.14±0.09abc	15.65±0.12b	105.12±3.40a	74.96±2.19c	203.48±8.26d
	1-MCP	21.09±3.33ef	0.97±0.06d	12.03±0.17d	61.97±0.92fg	71.83±3.59cd	154.27±10.02ghi
13+2SL	Control	22.13±0.64def	0.91±0.04d	9.67±0.12f	37.57±1.83i	50.87±4.18ef	189.81±4.12e
	CA	34.89±1.89bc	1.13±0.05abc	11.47±0.30e	72.13±3.86d	57.40±4.06e	225.73±6.47ab
	1-MCP	18.45±2.24fg	0.92±0.06d	7.16±0.10h	71.05±2.42de	49.07±4.17f	189.37±4.95e
20+2SL	Control	14.97±2.64gh	0.90±0.05d	8.85±0.14g	34.51±1.68i	39.04±1.23g	167.23±2.34f
	CA	25.88±0.49d	1.13±0.08abc	11.43±0.30e	71.89±3.84d	56.67±3.40ef	215.75±3.44bc
	1-MCP	15.37±0.74gh	0.75±0.03e	5.95±0.07j	53.54±2.02h	35.50±2.35gh	143.74±3.16i
27+2SL	Control	13.15±1.84h	0.75±0.02e	4.96±0.13k	39.69±1.04i	24.56±1.57i	150.75±3.73hi
	CA	20.77±1.84ef	0.96±0.04d	13.01±0.24c	72.10±2.24d	50.01±6.06ef	181.49±6.82e
	1-MCP	12.04±1.47h	0.60±0.04f	6.41±0.09i	59.55±0.86g	28.57±1.40hi	150.45±4.31hi

¹ Expressed as mg ascorbic acid/100 g FW.

² Expressed as mg β-carotene /100 g FW.

³ Expressed as mg chlorophyll A/100 g FW.

⁴ Expressed as mg of chlorogenic acid equivalent/100 g FW.

⁵ Expressed as mg of sinigrin equivalent/100 g FW.

⁶ Expressed as mg Trolox/100 g FW. Same letter in the same column means no significantly differences among the values (p<0.05).

Table 6: Functional content evolution of broccoli heads samples stored at 1-2 °C and 85-90% RH (Control), under controlled atmosphere (CA) conditions (1-2 °C, 85-90% RH, 10% O₂ and 5% CO₂) and treated with 1-MCP (0.6 µL/L) and stored at 1-2 °C, 85-90% RH later (1-MCP) and its comparison with broccoli heads freshly harvested (Fresh) on different days of cold storage plus four days of shelf life (SL).

Days of storage	Sample	Ascorbic acid ¹	Carotenoids ²	Chlorophylls ³	Total Phenol Content ⁴	Glucosinolates ⁵	Antioxidant activity ⁶
0	Fresh	47.62±1.27a	1.23±0.08a	19.52±0.19a	92.80±4.27ab	123.31±6.09a	232.36±2.32a
2+4SL	Control	28.03±2.88c	0.88±0.05def	10.49±0.20b	60.85±3.32e	63.79±4.41b	176.78±8.78c
	CA	36.87±3.32b	1.10±0.06b	10.26±0.16b	95.55±2.64a	56.33±4.17bc	209.97±5.85b
	1-MCP	16.63±1.79e	0.93±0.04cde	7.57±0.24e	88.89±3.86b	56.58±3.32bc	155.75±9.17de
6+4SL	Control	28.64±2.64c	0.75±0.05gh	9.34±0.18c	52.52±1.18f	46.29±3.15de	179.59±8.69c
	CA	38.60±0.58b	0.87±0.05de	10.39±0.17b	90.10±2.49b	47.53±2.36de	209.67±9.23b
	1-MCP	16.30±0.96e	0.68±0.06hi	6.13±0.06f	48.37±1.22f	38.29±4.32fg	163.82±5.74cd
13+4SL	Control	21.06±1.17d	0.85±0.02fg	5.35±0.19g	36.50±2.36g	38.54±4.16fg	130.89±2.26f
	CA	34.53±2.30b	1.04±0.04bc	7.61±0.16e	66.84±1.15d	55.44±4.02c	158.05±10.27d
	1-MCP	15.12±2.13ef	0.97±0.03cd	4.62±0.10hi	60.85±2.87e	42.60±1.76ef	151.59±9.12de
20+4SL	Control	14.15±1.87efg	0.94±0.02cde	4.05±0.18j	34.68±2.80g	31.66±3.05gh	71.36±2.92h
	CA	21.59±3.00d	0.97±0.03cd	5.81±0.11j	75.85±3.13c	52.16±2.72cd	96.23±4.09g
	1-MCP	13.96±1.10efg	0.78±0.03fgh	4.30±0.28ij	50.13±0.61f	28.69±1.23hi	75.30±7.37h
27+4SL	Control	10.84±1.24g	0.59±0.08i	4.79±0.21h	39.74±0.59g	22.40±2.19i	93.53±2.57g
	CA	22.03±2.12d	0.82±0.05fg	8.60±0.24d	77.25±1.27c	49.21±5.88cde	138.08±7.29ef
	1-MCP	11.87±2.06fg	0.71±0.09h	6.16±0.10f	51.67±2.37f	32.03±3.15gh	101.92±1.47g

¹ Expressed as mg ascorbic acid/100 g FW.

² Expressed as mg β-carotene /100 g FW.

³ Expressed as mg chlorophyll A/100 g FW.

⁴ Expressed as mg of chlorogenic acid equivalent/100 g FW.

⁵ Expressed as mg of sinigrin equivalent/100 g FW.

⁶ Expressed as mg Trolox/100 g FW. Same letter in the same column means no significantly differences among the values (p<0.05).

3.3.5. Intact glucosinolates

The total content of intact glucosinolates was calculated as the sum of the 11 identified intact glucosinolates classified into three chemical groups (aliphatic, indole and aromatic) and was expressed as mg sinigrin equivalent/100 g FW (Fernández-León et al., 2012).

As shown in Table 4 and Figure 2, the total content of intact glucosinolates increased significantly for the CA sample at the beginning of cold storage (2nd day) (134.07 mg sinigrin equivalent/100 g FW) with respect to the Fresh sample (123.31 mg sinigrin equivalent/100 g FW). This increase was also observed for phenols, and it could be a consequence of the plant response to a stress situation, as controlled atmospheres, that produced an increase of secondary metabolites (Bennett and Wallsgrave, 1994; Verkerk et al., 2001). However, at the end of cold storage, the total content of intact glucosinolates in CA samples decreased until 80.03 mg sinigrin equivalent/100 g FW at 27 days. This decrease was significantly higher for Control and 1-MCP samples during cold storage (Table 4 and Figure 2), reaching values statistically similar at the end of cold storage (21.54 and 30.57 mg sinigrin equivalent/100 g FW, respectively).

For shelf life samples (Tables 5, 6 and Figure 2) it was observed a decrease in the total content of intact glucosinolates, being this decrease higher in Control samples than in 1-MCP samples, this was also observed for other authors, such as Yuan et al., 2010.

As shown in this research work, the degradation of glucosinolates was higher in samples stored in air (Control and 1-MCP) than in samples stored under controlled atmospheres. This degradation of glucosinolates is due to glucosinolate hydrolysis catalyzed by endogenous thioglucosidases, namely the myrosinases (Mikkelsen et al., 2002; Schreiner et al., 2007).

Additionally, glucosinolates are characterized by their high antioxidant capacity (Fernández-León et al., 2012; Moreno et al., 2006; Verkerk et al., 2009). Therefore, a strong correlation between the total content of glucosinolates and antioxidant activity ($r=0.87$, $p<0.01$) was observed in our studies.

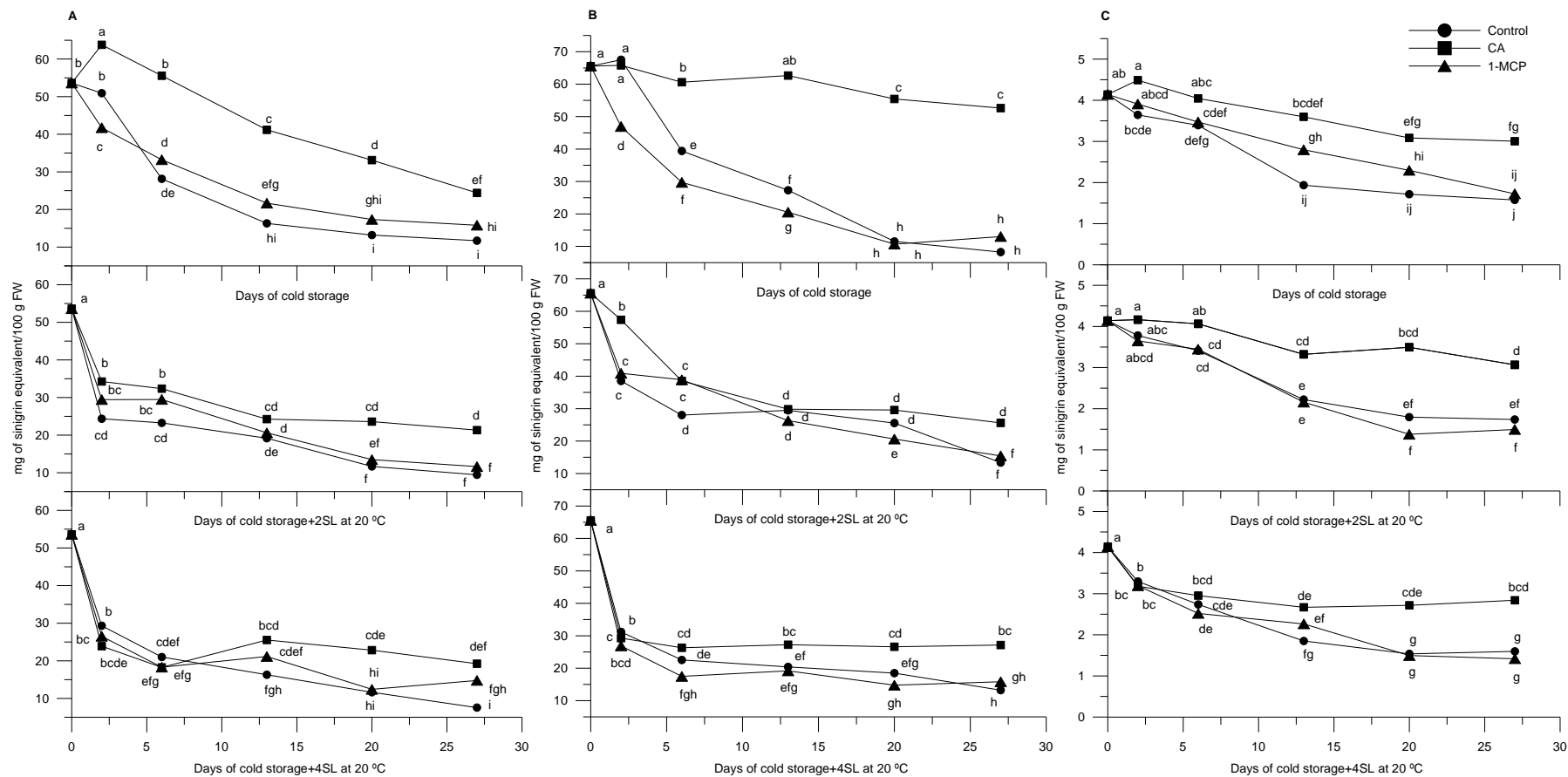


Figure 2: Evolution of the aliphatic (A), indolic (B) and aromatic (C) glucosinolates content of broccoli heads samples stored at 1-2 °C and 85-90% RH (Control), under controlled atmosphere (CA) conditions (1-2 °C, 85-90% RH, 10% O₂ and 5% CO₂) and treated with 1-MCP (0.6 μL/L) and stored at 1-2 °C, 85-90% RH (1-MCP) and its comparison with broccoli heads freshly harvested (Fresh) on different days of cold storage plus two or four days of shelf life (SL). Same letter in the same figure means no significantly differences among the values (p<0.05).

3.3.6. Antioxidant activity analysis

The initial value of antioxidant activity (AA) in the Fresh sample (Table 4) was higher (232.36 mg Trolox/100 g FW) than in other reported values for the same cultivar 'Parthenon' (Fernández-León et al., 2012).

Antioxidant activity values decrease during the storage regardless the conditions. AA values were highly correlated with the biocompound contents, this is why their evolution during cold storage was similar (Vallejo et al., 2003c). However, the decrease was smaller in CA samples (220.06 mg Trolox/100 g FW) than in Control and 1-MCP samples (150.67 and 138.97 mg Trolox/100g FW, respectively) at the end of cold storage (27 days) (Table 4).

This behavior was also observed for shelf life samples. At 27+2SL (Table 5) the antioxidant activity values were around 150 mg Trolox/100 g FW for Control and 1-MCP samples, while for CA samples the AA value was significantly higher (181.49 mg Trolox/100 g FW). And at 27+4SL (Table 6), there was an important decrease without a change in that tendency, so the AA values were 93.53 and 101.92 mg Trolox/100 g FW for Control and 1-MCP samples, respectively, while for CA samples the AA value was 138.08 mg Trolox/100 g FW.

4. Conclusions

As shown in this research work, the controlled atmospheres storage studied (10% O₂, 5% CO₂, 1-2 °C and 85-90% HR) was the most effective postharvest treatment to preserve quality and to increase the shelf life of broccoli heads, compared to 1-MCP treatment and to merely cold storage (1-2 °C and 85-90% HR). This conclusion was based on the higher decrease of the overall appearance, physicochemical and functional parameters in 1-MCP and Control samples during cold storage, while this decrease was lower in CA samples. In addition, those processed also presented the same tendency after 2 and 4 days at 20 °C (shelf life samples).

The 1-MCP treatment, was only effective to maintain the green color of broccoli heads during the complete cold storage period, this also happened with the chlorophyll pigments but only in the initial period of the cold storage. However, during shelf life, it

was observed that 1-MCP samples had the same behavior as the Control samples and the yellowing was higher than in CA samples.

Acknowledgements

Authors thank FEDER's funds for the financial support. D.G.G. and M.F.F.L. are grateful to the "Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria" (INIA) of Spain for his research contract (DOC-INIA) and for her doctoral scholarship. Part of this research has been fund by Junta de Extremadura and the European Social Funds (Project GR10006) and Project "Red de Investigación Transfronteriza Extremadura-Centro-Alentejo (RITECA II)".

4.2.c.- Retention of quality and functional values of broccoli ‘Parthenon’ stored in modified atmosphere packaging



Food Control (accepted)

M.F. Fernández-León¹, A.M. Fernández-León¹, M. Lozano¹, M.C. Ayuso², M.L. Amodio³, G. Colelli³, D. González-Gómez^{1,4}

¹Technological Institute of Food and Agriculture (INTAEX), Junta de Extremadura. Ctra Cáceres S/N, 06071 Badajoz, Spain.

²Agriculture Engineering School, University of Extremadura, Ctra. Cáceres S/N, 06007 Badajoz, Spain.

³Dept. PrIME, University of Foggia, Via Napoli 25, 71100 Foggia, Italy.

⁴Current address: Department of Analytical Sciences, The National University of Distance Education. Paseo Senda del Rey, 9, 28040 Madrid, Spain.

Abstract

The aim of this research was to identify, quantify and compare the main quality parameters and functional compounds of ‘Parthenon’ broccoli florets stored at two different conditions. The first condition consisted in a modified atmosphere packaging using microperforated polypropylene plastic (MAP). Then, the second one was in an unpackaged storage (Control). The main quality parameters assessed in this research were the overall appearance, odour, weight loss and colour. While, the functional compounds evaluated in this study were the chlorophyll and carotenoid pigments, vitamin C, total phenol content and intact glucosinolates, as well as the in vitro antioxidant activity. The results indicated that the loss of quality was lower in MAP than in Control samples when comparing with Fresh sample. In addition, the weight loss in MAP samples was 0.75% while in the Control samples was 3.36% at the end of storage. Besides, the losses of external attributes were also more pronounced in Control than in the MAP samples. Moreover, this degradation tendency was also observed for bioactive compounds, where their retention in the MAP was higher than in Control samples. In fact, the loss of total phenol content and intact glucosinolates content in

MAP samples was about 20 and 23%, respectively, while in Control samples was about 48% and 57% correspondingly. This was also observed in the antioxidant activity (AA) values, since AA is correlated with these functional compounds.

Keywords: Respiration rate; health promoting compounds; antioxidant activity; quality parameters.

1. Introduction

Currently the interest in healthier diets has increased notoriously, consumers demand easy-to-cook and easy-to-eat products not only with relevant nutritious but also with healthy properties. In that sense, the demand on broccoli has increased particularly, and broad types of broccoli products are now available in the market: from fresh broccoli heads to new formats such as salads ready to eat or vegetable mixtures ready to cook (Schreiner et al., 2007). From an economical point of view, Spain and Italy are the largest producers of broccoli and cauliflower in Europe. According to data from the Statistics Division of the Organization for Food and Agriculture of the United Nations (FAOSTAT, 2010), the broccoli production has risen steadily since 1997, peaking in 2010, when 511,100 t and 427,407 t were harvested in Spain and Italy, respectively.

A key factor of the increase of broccoli consumption is the abundance of health-promoting compounds observed in these cruciferous plants. Precisely, important amounts of glucosinolates, flavonoids and vitamins, together with antioxidant and free-radical scavenging properties were quantified in broccoli plants (Kris-Etherton et al., 2002; Page et al., 2001; Vallejo et al., 2003c). Different studies have demonstrated that these bioactive compounds have an important role in the prevention of different human diseases (Traka and Mithen, 2009). However, the abundance of these compounds decreases after harvest, together with a deterioration of the organoleptic quality attributes (Howard et al., 1997; Vallejo et al., 2003c).

A limiting factor that reduce broccoli consume is its perishable nature, characterized by its reduced shelf life after harvest. The main symptoms of quality loss are surface dehydration and loss of green colour, with floret yellowing as consequence of chlorophyll degradation together with a fastening of plant metabolism (Eason et al.,

2005; Eason et al., 2007b; Hansen et al., 2001; Izumi et al., 1996; King and Morris, 1994; Zhuang et al., 1995), though this pattern may differ among cultivars (Toivonen and Sweeney, 1998). The quality decline is also affected by the postharvest processing, and this decline is higher in fresh-cut broccoli than in the intact heads.

The quality decline is also affected by the postharvest processing, and it is higher in fresh-cut broccoli than in the intact heads.

Considering the above-mentioned factors, it is necessary to design appropriate postharvest procedures aiming to preserve the relevant bioactive, nutritional and organoleptic qualities of broccoli plants. A convenience product must also be provided to consumers. In that way, in this research, modified atmosphere packaging (MAP) has been studied in order to assess whether this postharvest storage condition is an appropriate alternative to maintain broccoli quality and bioactive compounds.

Polypropylene microperforated films are commonly used in the modified atmosphere packaging (MAP) of high respiration fresh food products; for example minimally processed fruits and vegetables. These microperforations can regulate the gas exchange in the polymeric film (Oliveira et al., 1998).

On the other hand, Cantwell and Suslow (1999) reported that broccoli can be benefitted by 1-2% O₂ with 5-10% CO₂ atmospheres at a temperature range of 0-5 °C, extending its shelf-life. However, temperature fluctuations during commercial handling could induce unpleasant sulfur-containing volatiles at these low O₂ levels. For this reason, most modified atmospheres packaging are designed to maintain O₂ at 3-10% and CO₂ at about 5-10% to avoid the development of these undesirable off-odor volatiles from stored broccoli plants (Cantwell and Suslow, 1999).

Thus, this research work is aimed to evaluate the retention of quality and functional values of broccoli 'Parthenon' stored under modified atmosphere packaging conditions at 5 °C. For this storage, microperforated polypropylene bags were employed. The applicability of these storage conditions was assessed by evaluating the organoleptic quality parameters (overall appearance, odour, weight loss and colour) and the composition in functional compounds such as chlorophyll and carotenoids pigments, vitamin C, total phenol and glucosinolate content, and antioxidant activity.

2. Materials and methods

2.1. Plant material

Broccoli (*Brassica oleraceae* L. var. *italica* cv. Parthenon) heads were grown in a commercial farm in Foggia, Italy, according to standard cultural practices. Plants were harvested during the last week of November 2010, at commercial maturity stage. The samples were rapidly transported to the Postharvest Laboratory of University of Foggia and selected, discarding damaged plants. Broccoli heads were cut into florets and prepared according to the experimental design.

2.2. Experimental design

Approximately 250 g of broccoli florets were packed in microperforated polypropylene bags of 25 cm x 25 cm with a thickness of 30 µm, making a total of 54 bags of ready-to-use product. From them, 24 bags were sealed (Tecnovac T720, Tecnovac, Srl, Grassobbio, Italy) and placed at 5 °C in an active modified atmosphere (MAP). The MAP conditions were established according to our previous study (Fernández-León et al., 2011b). Thus, the experimental design was established in order to reach a final atmosphere composition of 5% of CO₂ and 10% of O₂ in each sealed sample bag. Thus, to get this final atmosphere composition, the equation proposed by González et al. (2008) and Massey (2003) was applied:

$$\text{GTR} = \frac{\text{RR} \times t \times W}{A \times (\text{Gi} - \text{Gf})}$$

where:

GTR = Gas transmission rate (Film Permeability)

RR = Respiration rate

t = Film thickness

W = Product weight

A = Film surface area

Gi = Initial gas composition

Gf = Final gas composition

Therefore, considering the entire experimental factor, the proposed MAP was obtained by injecting 10% of CO₂ and 5% of O₂ (MAP samples)

The 30 remaining bags were not sealed and were divided into two groups: 6 bags were analyzed on the same day of the experiment (Fresh samples) and the other 24 remaining bags were stored at 5 °C (Control samples). Both Control and MAP samples were analyzed in each sampling day (3, 6, 9 and 12), so that 6 bags were available for each sampling date and treatment. When it was necessary samples were frozen at -80 °C until analysis. In all cases N=6.

In order to know the permeability of microperforated polypropylene film, it was evaluated at 5 °C (1250 mL CO₂/m² x day) by a Lissy L100-5000 manometric gas permeability tester (M.Penati Strumenti, srl, Pioltello, Italy).

2.3. Respiration rate

Respiration rate (mLCO₂/kg x h) was measured in triplicate using a dynamic system (Kader, 2002). Briefly, 0.1 mL of gas was collected from the inlet and from the outlet flows of each jar and injected into a gas chromatograph (model 17A; Shimadzu, Kyoto, Japan) equipped with a thermal conductivity detector (230 °C). Separation of carbon dioxide was achieved on a capillary column 19091J-413, HP-5 (30 m x 0.32 mm; 0.25 µm) from Agilent Technologies (Waldbronn, Germany), with a column flow of 7 mL/min, and oven temperature of 180 °C; the difference in concentration was then referred to the sample weight and to the air flow rate.

2.4. Gas analysis

The CO₂ and O₂ concentrations inside the packages were measured in triplicate by a gas analyzer MAPY 4.0 (Witt Italia Srl, Solza, Italy). A silicone septum was provided on the bag surface for sampling gas inside the package. Results were expressed as % of O₂ and CO₂ inside the bags.

2.5. Overall appearance and odour

In order to evaluate the effect of modified atmosphere packaging on fresh-cut broccoli, appearance and odour of broccoli florets were individually scored using a

subjective scale of 5 to 1 as also described by Winkler et al. (2007) at each sampling day. In the case of appearance, a scale composed of pictures and a brief description for each score value was used, with 5=excellent, no defects; 4=very good, minor defects; 3=fair, moderate defects; 2=poor, major defects; and 1=inedible. In the case of odour: 5=typical odour, 4=slightly off-odour, 3=moderate off-odour, 2=strong off-odour, 1=odour of mouldiness. A score of 3 was considered as the limit of marketability and a score of 2 as the limit of edibility (Amodio et al., 2007).

2.6. *Weight loss*

Each bag was individually weighed the day of its preparation (Day 0) and at each sampling day and the weight loss was calculated as % of the initial fresh weight.

2.7. *Colour*

Colour parameters (L^* , a^* and b^*) were measured in colour space CIELab by elaborating the images acquired by a Spectral scanner (DV SRL, Padova, Italy). Measurements were performed in each broccoli floret (la Zazzera et al., 2010). The measure was made on top of each floret.

2.8. *Chlorophyll pigments*

Chlorophyll extraction was performed according to our previous work (García et al., 2005). Briefly, to extract chlorophyll pigments from plant tissue around 4g from plant homogenate was accurately weighted and 15.0 mL of acetone was mixed into a centrifuge flask placed in an ice bath. After 1min of homogenization using an Omni Mixer homogenizer (Omni International, GA, USA), samples were centrifuged for 15 min at 14,000 rpm at 4 °C. Samples were extracted three times and supernatants were then filtered into a 50.0 mL volumetric flask using acetone as solvent to complete the final volume. After pigment extraction plant homogenate was completely discolored (color changed from green to whitish). Before spectra measurement, samples were filtered by a 0.45 µm nylon filter. Photometric spectra were recorded between 600 nm and 700 nm in a UV-2450 UV-vis spectrophotometer (Shimadzu, Japan).

Chlorophyll A and B contents were determined using multivariate calibration by means of Partial Least Squares (PLS) (Fernández-León et al., 2010). The results were expressed as mg/100 g of fresh weight (FW).

2.9. Carotenoid pigments

The carotenoid composition was determined by HPLC (Mínguez-Mosquera and Hornero-Méndez, 1993). About 10 g of broccoli were extracted with acetone, saponified overnight to remove the chlorophylls, and the obtained extract was passed through a 0.45 µm nylon filter and injected in an Agilent 1100 liquid chromatograph (Agilent Technologies, Inc., Palo Alto, CA, USA) equipped with an Agilent Lichrosorb RP-18 column of 10 µm, 200 mm x 4.6 mm at 30 °C, and diode-array detector (460nm). The initial mobile phase was acetone:water (75:25) for 5 min, raised to (95:5) over 10 min (García et al., 2007), and the flow rate was 1 mL/min. The pigments were quantified by external standard calibration, and results were expressed as mg of β-carotene and mg of lutein/100 g FW (González-Gómez et al., 2011).

2.10. Vitamin C

About 5 g of fresh broccoli were homogenized with 10mL of methanol:water (5:95) plus citric acid (21 g/L) with EDTA (0.5 g/L). The homogenate was filtered through cheesecloth and a C18 Bakerbond SPE column (Waters, Milford, MA, USA). Ascorbic acid and dehydroascorbic acid (DHAA) contents were determined as described by Zapata and Dufour (1992) with some modifications (Gil et al., 1999). The HPLC analysis was achieved after derivatisation of DHAA into the fluorophore 3-(1,2-dihydroxyethyl) furol[3,4-*b*]quinoxaline-1-one (DFQ), with 1,2-phenylenediamine dihydrochloride (OPDA). Samples of 20 µL were analysed with an Agilent 1200 Series HPLC from Agilent Technologies (Waldbronn, Germany). Separations of DFQ and ascorbic acid were achieved on a Zorbax C18 column (250 mm x 4.6 mm; 5 µm particle size). The mobile phase was methanol:water (5:95 v/v) containing 5 mmol/L cetrimide and 50 mmol/L potassium dihydrogenphosphate at pH 4.5. The flow rate was 1 mL/min. Vitamin C was expressed as mg of ascorbic and dehydroascorbic acid/100 g FW.

2.11. Total phenol content and antioxidant activity

The same extraction was carried out for analyses of total phenols and antioxidant activity (AA). About 3 g of broccoli were homogenized in an Ultraturrax (IKA, T18 Basic; Wilmington, NC, USA) for 1 min with 20 mL of extraction medium, 2 mM sodium fluoride methanol:water solution (80:20). The homogenate was centrifuged at 5 °C at 9,000 rpm for 5 min. The pellet was discarded and the supernatant was retained and used as extract.

Total phenols were determined according to the method of Singleton and Rossi (1965). Each extract (100 µL) was mixed with 1.58 mL distilled water, 100 µL of Folin-Ciocalteu reagent and 300 µL of sodium carbonate solution (200 g/L). After 2h standing in darkness, the absorbance was read at 725 nm against a blank using a spectrophotometer (UV-1700, Shimadzu, Jiangsu, China). Total phenol content (TPC) was calculated on the basis of the calibration curve of chlorogenic acid and was expressed as mg of chlorogenic acid equivalent/100 g FW.

The antioxidant assay was performed following the procedure described by Brand-Williams et al. (1995) with minor modifications. The diluted sample, 50 µL, was pipetted into 0.95 mL of diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) solution to initiate the reaction. The absorbance was read, spectrophotometrically, after 30 min in darkness, at 515 nm. Trolox was used as the standard of the measurement and the antioxidant activity was reported in mg Trolox /100 g FW.

2.12. Intact glucosinolates

Intact glucosinolates (GS) were extracted following Kiddle and Vallejo slightly modified methods (Kiddle et al., 2001; Vallejo et al., 2003b) were about 2 g of broccoli homogenate were extracted with 7 mL of methanol:ultrapure water (70:30) for 15 min at 70 °C with shaking. The extracts obtained were centrifuged or filtered, for sample purification, and further filtered by 0.45 µm nylon filter before to injection into the chromatograph. A high-performance liquid chromatography instrument coupled to an Ion Trap mass spectrometer (Varian 500-MS, Varian Ibérica S.L., Madrid, Spain) was used for the intact glucosinolates separation and determination from the broccoli extracts.

The chromatographic separation was performed on a 150 mm x 2.0 mm (3 μ m) Pursuit C18 reversed-phase column with a Varian security filter as a guard column. The column oven temperature was set at 40 °C and the injected volume was 10 μ L. The composition of the mobile phase varied linearly from 100% A (0.1mL formic acid/100mL) to 15% B (methanol MS-MS) in 15 min, to 40% B in 5 min, to 50% B in 5 min, and returned to 100% A in 5 min at a flow rate of 200 μ L/min. The mass spectrometer was tuned by direct infusion of sinigrin standard solution producing maximum abundant precursor ion m/z 358 ([M-H]⁻) and fragment ion m/z 97 ([SO₃H]⁻) signals during MS/MS (Tian et al., 2005). The following transitions were used to assay 3 types of individual glucosinolates: 1) Aliphatic GS: glucoraphanin (436>97), glucoiberin (422>97), glucoalysin (450>97) and glucoerucin (420>97) (alkyl GS); sinigrin (358>97), gluconapin (372>97) and glucobrassicinapin (386>97) (alkenyl GS); and progoitrin (388>97) (hidroxyalkenyl GS); 2) Indole GS: glucobrassicin (447>97), 4-methoxyglucobrassicin (477>97) and neoglucobrassicin (477>97); and 3) Aromatic GS: gluconasturtiin (422>97) and glucotropaeolin (408>97). These glucosinolates were quantified using the calibration curve of sinigrin (Sigma-Aldrich Spain, Madrid, Spain) as an external standard and expressed as mg of sinigrin equivalent/100 g FW (Fernández-León et al., 2011b).

2.13. Statistical analysis

For statistical studies SPSS 15.0 software was used (SPSS Inc. Chicago, IL, USA). Correlations were estimated with the Pearson test at $p < 0.01$ significance level. Data are expressed as means \pm standard deviation of six independent replicates and were analyzed using a one-way analysis of variance (ANOVA). When ANOVA detected significant differences between mean values, means were compared using Tukey's HSD test.

3. Results and discussion

The experiment design of this research was established to obtain a gas concentration of 10% O₂ and 5% CO₂ in microperforated polypropylene bags for 12 days of storage at 5 °C. This design was aimed to assess the effect of the MAP in the quality and functional values of broccoli.

3.1. Respiration rate

Respiration rate is significantly affected by MAP treatment (Lange, 2000). Thus, that the respiration rate at 5 °C decreased about 13% in the sample treated with 10% of oxygen (52.36 ± 0.64 mL CO₂/Kg x h) with respect to the Control sample (60.16 ± 0.48 mL CO₂/Kg x h).

3.2. Gas composition

An active modified atmosphere was used by injecting 10% of CO₂ and 5% of O₂. A decrease in CO₂ and increase in O₂ levels were observed (Figure 1) for MAP in microperforated polypropylene bags in one day of storage at 5 °C, to reach the desired modified atmosphere, 10% O₂ and 5% CO₂.

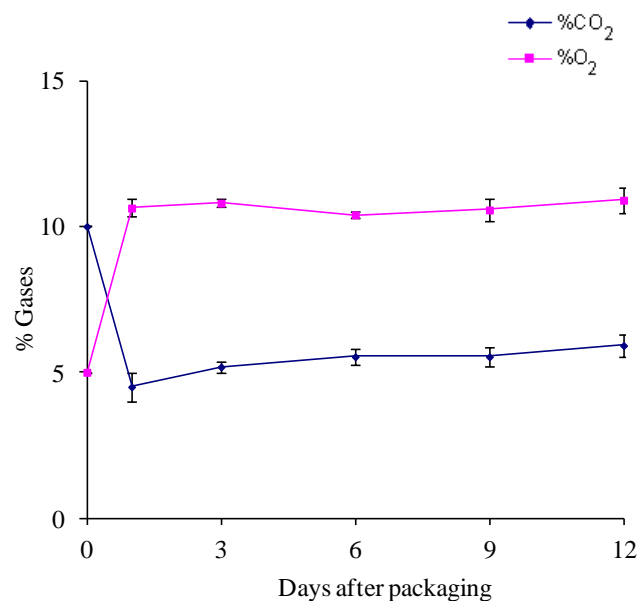


Figure 1: Evolution of O₂ and CO₂ in package treatment of broccoli florets stored at 5 °C.

3.3. Overall appearance and odour

During cold storage at 5 °C, all samples from different treatments (Control and MAP) showed a reduction in visual appearance and in odour score with respect to the Fresh sample (Table 1), this is in agreement with the results obtained for other authors (Cefola et al., 2010; Jia et al., 2009).

The reduction in the overall appearance begins to be statistically significant at Day 6 of cold storage for both samples (Control and MAP). However, the reduction in the odour score is statistically significant at Day 9 for MAP sample and, at Day 3 for Control sample. At the end of storage (Day 9 and Day 12) the MAP samples were above the limit of marketability (score 3), while Control samples were on the limit of edibility (score 2). Therefore, this MAP storage helps to maintain the organoleptic characteristics of broccoli florets.

3.4. Weight loss

One of the main problems during broccoli storage is the high weight loss, which affects its marketability. In fact, Control broccoli stored in air had lost 3.36% of its initial weight, while this value was significantly lower in MAP conditions (0.75% of weight loss, $p < 0.05$) at the end of storage at 5 °C (Table 1).

The effect of MAP on reducing weight loss is likely due to the limitation of water vapour diffusion by plastic films and, in turn, generating a water vapour pressure and higher relative humidity inside the package (Serrano et al., 2006). In that sense, a negative correlation was found between the weight loss and the appearance of broccoli florets ($r = -0.811$, $p < 0.01$), as it was reported before by Serrano et al. (2006).

3.5. Colour

All individual colour parameters (L^* , a^* and b^*) significantly increased at the end of storage in Control samples ($p < 0.05$). This fact was related to the yellowing process of broccoli florets. On the other hand, in MAP samples these colour parameters remained significantly similar to those obtained in the Fresh samples ($p < 0.05$) (Table 1).

Broccoli is a commodity that benefits from storage under increased CO_2 and reduced O_2 concentration atmospheres. The studied MAP storage conditions tested in this research work, positively affected the maintenance of the outer quality parameters of 'Parthenon' broccoli, as obtained by other authors (Cefola et al., 2010; Izumi et al., 1996).

3.6. Chlorophyll pigments

The contents of chlorophyll pigments are summarized in Table 2. The results obtained were comparable to other reported values (Fernández-León et al., 2010; Fernández-León et al., 2012; García et al., 2005; Khachik et al., 1986).

The results showed that both chlorophylls, A and B, remained without significant changes until Day 3 for the Control sample, while for the MAP sample no significant differences were observed during all cold storage period. At the end of storage the Control sample presented 5.72 and 1.96 mg chlorophyll A and B/100 g FW, respectively, while MAP sample presented 9.86 and 3.40 mg chlorophyll A and B/100 g FW, respectively. Therefore, broccoli florets from Control samples turn yellow faster, since the loss of green colour in florets has been attributed to chlorophyll degradation. In addition, this process is also related to respiration rate, ethylene production and lipid peroxidation processes (King and Morris, 1994; Zhuang et al., 1995). For this reason we found an inverse correlation ($r=-0.621$ and $r=-0.720$, $p<0.01$) between the colour parameters (a^* and b^*) and chlorophylls content, respectively. On the other hand, the chlorophylls content and antioxidant activity were highly correlated ($r=0.808$, $p<0.01$). Similar findings were reported before by Lai et al. (1980).

Table 1: Appearance score, odour score, weight loss and colour levels of broccoli florets stored at 5 °C under modified atmosphere package (MAP) and its comparison with broccoli florets stored under atmospheric conditions (Control).

Storage Period in days	0		3		6		9		12	
Sample	Fresh	Control	MAP	Control	MAP	Control	MAP	Control	MAP	
Appearance score ¹	4.92±0.16a	4.92±0.13a	4.97±0.08a	3.47±0.08d	4.17±0.26b	2.22±0.35e	3.83±0.26c	2.08±0.20e	3.67±0.26cd	
Odour score ²	4.93±0.12a	4.38±0.31b	4.92±0.20a	3.08±0.20d	4.72±0.25a	3.32±0.26d	4.12±0.20bc	2.03±0.08e	3.90±0.20c	
Weight loss ³	---	1.01±0.36c	0.41±0.02d	1.37±0.24b	0.69±0.12cd	1.63±0.27b	0.65±0.04d	3.36±0.30a	0.75±0.10cd	
L*	45.10±1.98bc	44.46±0.41bcd	43.35±0.35d	44.44±0.57bcd	44.04±0.60cd	48.10±0.28a	45.85±1.02b	48.13±0.66a	45.54±0.94bc	
a*	-11.50±0.36c	-10.90±0.46b	-11.16±0.38bc	-10.79±0.34ab	-11.56±0.27c	-10.75±0.17ab	-11.67±0.22c	-10.35±0.20a	-11.49±0.17c	
b*	11.43±1.15c	11.10±1.21c	11.10±0.36c	12.47±0.52bc	10.85±0.99c	13.82±0.56b	11.87±0.59c	15.86±1.42a	11.21±1.51c	

¹ 5 excellent to 1 inedible.

² 5 typical odour to 1 odour of mouldiness.

³ Expressed as %.

L* lightness (L*=0 yields black and L*=100 diffuse white).

a* position between red/magenta and green (negative values indicate green while positive values indicate red/magenta).

b* position between yellow and blue (negative values indicate blue and positive values indicate yellow).

Same letter in the same row means no significantly differences among the values (p<0.05).

3.7. Carotenoid pigments

The influence of the storage conditions on these compounds is summarized in Table 2. The results obtained were comparable to other reported values (Fernández-León et al., 2012; Forney and Riji, 1991; García et al., 2005; Murkovic et al., 2000).

The carotenoids content decreased along with the storage for both samples (Control and MAP) with respect to the Fresh samples. However, this decrease was higher and happened before (on Day 3) in the Control than in the MAP samples. At the end of cold storage the β -carotene and lutein concentrations were 0.71 and 0.53 mg/100 g FW in MAP samples, respectively, while in Control samples were 0.41 mg β -carotene/100 g FW and 0.31 mg lutein/100 g FW.

β -carotene and lutein are found in the lipid soluble fractions of biological systems. These pigments protect cellular membranes by scavenging/quenching free radicals (Singh et al., 2007). Therefore, both compounds constitute the essential lipid-soluble antioxidants. Thus the amount of carotenoids has to be related to the AA, as we found in our results ($r=0.916$, $p<0.01$).

3.8. Vitamin C

The contents of vitamin C (ascorbic and dehydroascorbic acid) are summarized in Table 2 and the results obtained were comparable to other reported values (Bernalte et al., 2007; Fernández-León et al., 2012; Podsedek, 2007).

Vitamin C, which includes ascorbic acid and its oxidation product (dehydroascorbic acid) has many biological activities in human body, as a radical scavenger, that explains the high correlation observed between vitamin C content and AA value ($r=0.872$, $p<0.01$).

On the other hand, the amount of vitamin C decreased during the cold storage, but this decrease was higher and faster in Control samples than in MAP samples. Thus, at the end of storage the vitamin C content in MAP sample was 78.13 mg ascorbic and dehydroascorbic acid/100g FW, while in Control sample was 54.73 mg ascorbic and dehydroascorbic acid/100g FW.

3.9. Total phenol content

Table 2 summarized the content of total phenol (TP) for Fresh, Control and MAP broccoli samples during cold storage. The TP found in fresh broccoli (86.76 mg chlorogenic acid equivalent/100g FW) was in accordance with the values reported in the literature (Koh et al., 2009; Sousa et al., 2008).

During the storage at 5 °C, TP significantly increased on Day 3 for both samples, Control and MAP (104.11 and 95.44 mg chlorogenic acid equivalent/100 g FW, respectively), with respect to the Fresh sample. That increase was higher in Control sample than in MAP sample, probably due to the weight loss that led to concentration of these compounds in the cells (Podsdek, 2007). Also, the increase of phenolic contents could be explained by the stress produced in plant due to the harvest and postharvest injuries (Yang et al., 2011).

However, for the rest of the storage period, there were no significant differences in the TP for MAP samples until Day 9, while for Control samples there was always a statistical decrease in TP for all dates of cold storage. This may be explained because in Control samples the membrane structures could have been damaged and the oxidation of phenolic compounds becomes the major trend and they decreased in cell (Toor and Savage, 2006; Yang et al., 2011). Additionally, the higher respiration of broccoli florets stored under air conditions (Control samples) might increase the metabolism (Izumi et al., 1996) and therefore the degradation of phenolic compounds (Vallejo et al., 2003c).

Phenolic compounds are a large group of secondary metabolites in the plant kingdom, and they have different biological activities, but the most important is the antioxidant activity and the inhibitory effect of various kinds of tumors (Czeczot, 2000). That is in accordance with the strong correlation observed between TP and antioxidant activity values ($r=0.912$, $p<0.01$). The same behavior was also reported by other authors (Ou et al., 2002; Podsdek, 2007; Wu et al., 2004).

Table 2: Vitamin C, activity antioxidant (AA), chlorophyll and carotenoid pigments and total phenol content (TP) levels of broccoli florets stored at 5 °C under modified atmosphere package (MAP) and its comparison with broccoli florets stored under atmospheric conditions (Control).

Storage Period in days	0	3		6		9		12	
Sample	Fresh	Control	MAP	Control	MAP	Control	MAP	Control	MAP
Chlorophyll A ¹	11.26±0.84a	10.13±1.29a	11.03±1.57a	7.13±0.71b	11.80±0.45a	6.38±1.26b	10.53±1.55a	5.72±0.40b	9.86±1.08a
Chlorophyll B ¹	3.88±0.29a	3.49±0.45a	3.80±0.54a	2.46±0.25b	4.07±0.15a	2.20±0.43b	3.63±0.54a	1.97±0.14b	3.40±0.37a
β-Carotene ¹	1.03±0.04a	0.77±0.03c	1.02±0.04a	0.62±0.02e	0.90±0.04b	0.56±0.02f	0.80±0.03c	0.41±0.02g	0.71±0.03d
Lutein ¹	0.77±0.03a	0.58±0.02c	0.77±0.03a	0.46±0.02e	0.68±0.03b	0.43±0.02f	0.60±0.03c	0.31±0.01g	0.53±0.02d
Vitamin C ²	117.55±1.47a	103.21±2.79bc	119.90±1.18a	97.39±3.66c	107.95±4.54b	69.21±7.58e	105.80±5.56b	54.73±4.01f	78.13±6.58d
TP ³	86.76±3.80c	104.11±4.56a	95.44±4.18b	65.07±2.85d	84.16±3.69c	52.06±2.28e	84.42±3.61c	45.12±1.98f	69.41±3.04d
AA ⁴	121.91±3.91a	117.77±6.37a	121.68±4.59a	86.29±5.92cd	116.62±2.70a	79.62±5.39d	104.36±4.97b	69.05±3.56e	91.72±4.07c

¹ Expressed as mg/100 g fresh weight (FW).

² Expressed as mg ascorbic acid and dehydroascorbic acid/100 g FW.

³ Expressed as mg chlorogenic acid equivalent/100 g FW.

⁴ Expressed as mg Trolox/100 g FW.

Same letter in the same row means no significantly differences among the values (p<0.05).

3.10. Intact glucosinolates

The influence of storage conditions on intact glucosinolates (GS) concentration is summarized in Table 3, where these compounds have been arranged according to their chemical structure, as aliphatic, indole and aromatic glucosinolates.

According to the data showed in Table 3, aliphatic glucosinolates increases significantly their concentration at the beginning of storage for both samples, Control and MAP (52.95 and 51.17 mg sinigrin equivalent/100 g FW, respectively), with respect to the Fresh sample (44.50 mg sinigrin equivalent/100 g FW). This increase, as occur with phenolic compounds is due to induction of the synthesis of glucosinolates in response to a stress, the mechanism of such synthesis is still unknown (Mithen et al., 2000; Xu et al., 2006).

For the remaining days of storage, the abundance of aliphatic glucosinolates as well as indole and aromatic glucosinolates decrease, being this decrease higher in the Control samples than in the MAP samples. The degradation of glucosinolates is due to glucosinolate hydrolysis catalyzed by endogenous thioglucosidases, namely the myrosinases (Mikkelsen et al., 2002; Schreiner et al., 2007).

Regarding the total contents of intact glucosinolates (Table 3) at the beginning of storage, no significant differences were observed between Fresh and Control samples (96.55 and 96.77 mg sinigrin equivalent/100 g FW, respectively), while for MAP samples intact glucosinolates content increased (100.87 mg sinigrin equivalent/100 g FW). This fact could be caused by biosynthesis in controlled and modified atmospheres, as a stress response (Bennett and Wallsgrove, 1994; Verkerk et al., 2001). However, the total contents of intact glucosinolates decreased during the rest of cold storage, being this decrease higher in the Control samples than in the MAP samples.

Additionally, glucosinolates are characterized by their high antioxidant capacity (Fernández-León et al., 2012; Moreno et al., 2006; Verkerk et al., 2009). Therefore, a strong correlation exists between the total content of glucosinolates and antioxidant activity ($r=0.951$, $p<0.01$).

Table 3: Intact glucosinolates (GS) levels of broccoli florets stored at 5 °C under modified atmosphere package (MAP) and its comparison with broccoli florets stored under atmospheric conditions (Control).

Storage Period in days	0		3		6		9		12	
Sample	Fresh	Control	MAP	Control	MAP	Control	MAP	Control	MAP	
Aliphatic GS ¹	44.50±1.51b	52.95±1.80a	51.17±1.74a	33.37±1.10d	42.27±1.43c	24.92±0.85e	42.23±1.43c	17.80±0.60f	33.37±1.13d	
Indole GS ¹	48.16±0.61a	40.94±0.52d	46.24±0.59b	31.31±0.40f	42.86±0.54c	24.56±0.31g	40.94±0.50d	21.67±0.28h	38.05±0.48e	
Aromatic GS ¹	3.89±0.18a	2.88±0.13cd	3.46±0.16b	2.82±0.13d	3.38±0.16b	2.41±0.11e	3.07±0.14c	2.26±0.11e	2.92±0.14cd	
Total GS ¹	96.55±1.77b	96.77±1.99b	100.87±1.97a	67.50±1.30e	88.52±1.66c	51.89±0.98f	86.24±1.65c	41.73±0.73g	74.34±1.34d	

¹ Expressed as mg sinigrin equivalent/100 g fresh weight.

Same letter in the same row means no significantly differences among the values (p<0.05).

3.11. Antioxidant activity

The range of antioxidant activity (AA) levels was similar to other reported values for the same cultivar ‘Parthenon’ (Fernández-León et al., 2011a; Fernández-León et al., 2012; Ou et al. 2002; Podsedek, 2007; Wu et al. 2004) (Table 2).

AA values were highly correlated with the biocompound contents, so that the evolution during storage was similar. No significant differences were observed in the values of AA for Control samples until Day 3 (117.77 mg Trolox /100 g FW), while for MAP samples until day 6 (116.62 mg Trolox /100 g FW) of cold storage, with respect to the Fresh sample (121.91 mg Trolox /100 g FW). After, a decrease in these AA values were observed during the rest of cold storage, this decrease was higher for Control samples (69.05 mg Trolox /100 g FW) than for MAP samples (91.72 mg Trolox /100 g FW) at the end of storage (12 days).

4. Conclusions

The results presented in this research work indicate the importance of modified atmosphere packaging, using microperforated polypropylene bags, for fresh-cut broccoli ‘Parthenon’ stored at 5 °C in maintaining freshness and qualitative traits for a period of 12 days. The loss of quality parameters (overall appearance, odour, weight loss and colour) and the decrease of functional compounds contents (chlorophyll and carotenoid pigments, vitamin C, total phenol content and intact glucosinolates) were lower in samples stored in modified atmospheres than in samples stored in air at the end of storage (12 days). This was also observed in the antioxidant activity values at the end of cold storage. A decrease of AA values was higher in Control (43.36% less than the Fresh samples values) than in MAP samples (24.76% less with respect to the Fresh sample).

Acknowledgements

D.G-G. and M.F.F-L. are grateful to the “Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria” (INIA) of Spain for his research contract (DOC-INIA) and for her doctoral scholarship. Part of this research has been fund by Junta de

Extremadura and FEDER funds (Project GR10006) and Project “Red de Investigación Transfronteriza Extremadura-Centro-Alentejo (RITECA-II)”.

5.- CONCLUSIONES GENERALES

5.- CONCLUSIONES GENERALES

1) El método multivariante UV-quimiométrico propuesto permite determinar la clorofila A y la clorofila B a partir de extractos de plantas con la misma precisión que un método cromatográfico, consiguiendo un menor tiempo de análisis y disminuyendo significativamente el uso de disolventes. El modelo ha sido validado mediante el análisis de un conjunto de muestras sintéticas preparadas que contenían diferentes concentraciones de ambas clorofilas, además, se ha establecido la solidez analítica del método propuesto, demostrándose que el modelo puede ser aplicado para el análisis múltiple en el mismo día y en días diferentes sin perder precisión. Finalmente, de acuerdo con las pruebas elípticas de confianza (EJCR), las concentraciones de pigmentos clorofílicos obtenidos por el modelo de mínimos cuadrados parciales (PLS) y por el método de separación cromatográfica son comparables. El modelo PLS optimizado se ha aplicado a la determinación simultánea de las dos clorofilas más abundantes (clorofila A y clorofila B) en dos tipos de brassicas (brócoli y col de Milán), observándose en ambos casos que la clorofila mayoritaria era la A y que el contenido de estos pigmentos clorofílicos era superior en brócoli que en col de Milán.

2) El método multivariante cromatográfico permite determinar simultáneamente los pigmentos carotenoides luteína y zeaxantina en extractos de plantas, resolviendo quimiométricamente el problema de coelución. Para la resolución de estos picos se ha aplicado el método de mínimos cuadrados parciales (PLS) a los espectros UV registrados en el pico cromatográfico. El modelo ha sido validado por el análisis de un conjunto de muestras sintéticas preparadas que contienen diferentes cantidades de ambos pigmentos carotenoides en diferentes rangos de concentraciones, estableciéndose así mismo la solidez analítica del método propuesto, demostrándose que el modelo puede ser aplicado para el análisis múltiple en el mismo día y en días diferentes sin ninguna pérdida de precisión. Este método puede ser aplicado satisfactoriamente a diferentes vegetales como brócoli y col de Milán.

3) Con respecto a la caracterización de cultivares de brócoli, no se observaron diferencias significativas en los parámetros de calidad externos, entre los cultivares de brócoli estudiados ('Mónaco' y 'Parthenon'), excepto en el color y el contenido de humedad. Los floretes del cultivar 'Parthenon' son más verdes y más

brillantes que los de ‘Mónaco’, un factor muy valorado por los consumidores. En cuanto a los compuestos bioactivos, se encontró que el cultivar ‘Parthenon’ era más rico en compuestos fenólicos, carotenoides, ácidos fenólicos, flavonoides y glucosinolatos. Además, este cultivar mostró valores más altos de vitamina C y de actividad antioxidante *in vitro*. Las mayores diferencias se observaron para el contenido de compuestos fenólicos totales, siendo dicho contenido alrededor de un 50% más en el cultivar ‘Parthenon’ que en el ‘Mónaco’. Además, hay que destacar las cantidades elevadas de gluconasturtina encontradas en ‘Parthenon’, ya que este glucosinolato es el precursor del compuesto anticancerígeno, fenetil isotiocianato.

4) Con respecto a la caracterización de cultivares de col de Milán, se encontraron diferencias significativas en la mayoría de los parámetros físico-químicos y en el contenido de compuestos bioactivos evaluados en los dos cultivares de col rizada o de Milán estudiados (‘Dama’ y ‘Leticia’). De acuerdo a los parámetros físico-químicos el cultivar ‘Dama’ presentaba mayor coloración verde y mayor porcentaje en humedad y pH que el cultivar ‘Leticia’, sin embargo el cultivar ‘Leticia’ fue más crujiente y presentó mayor contenido en sólidos solubles que el cultivar ‘Dama’. En cuanto a los compuestos bioactivos, se encontró que el cultivar ‘Dama’ tenía mayor contenido en la mayoría de dichos compuestos. Además, el cultivar ‘Dama’ presentó mayores valores de actividad antioxidante *in vitro*, ya que este cultivar tuvo los valores más altos en los principales compuestos antioxidantes, como los compuestos fenólicos, clorofila A y glucosinolatos indólicos totales. El cultivar ‘Dama’ presentó elevadas concentraciones de glucobrassicina, que es el glucosinolato precursor del compuesto anticancerígeno indol-3-carbinol. Por último, también se observó que el contenido en glucorafanina (precursor de sulforafano) fue de un 50% más alto en el cultivar ‘Dama’ que en el cultivar ‘Leticia’.

5) El mayor contenido de compuestos funcionales en brócoli, y por tanto mayor valor de actividad antioxidante, hace que aumente la capacidad funcional de éste frente a la col de Milán. Esto, unido a que es un vegetal mucho más perecedero, justifica que la aplicación de técnicas postcosecha se realice en brócoli y no en col. Las técnicas postcosecha más apropiadas para retener la calidad del brócoli y alargar su vida

comercial son, atmósferas controladas, modificadas y, en menor medida, la aplicación de 1-MCP, todas ellas como complemento al almacenamiento en frío.

6) Las condiciones de almacenamiento en atmósfera controlada estudiadas en esta Tesis Doctoral (10% O₂, 5% CO₂, 1-2 °C y 85-90% de humedad relativa) son muy eficaces en el mantenimiento de los parámetros de calidad externos del brócoli 'Parthenon' a lo largo del almacenamiento. Los compuestos bioactivos en el brócoli y la actividad antioxidante, se conservaron mejor bajo las condiciones de atmósfera controlada ensayadas a lo largo del almacenamiento en frío. Por lo tanto, se demuestra con este trabajo, que no es necesario utilizar condiciones de atmósfera controlada tan agresivas y estrictas, como las propuestas por la mayoría de la literatura (1-2% O₂, 5-10 CO₂%, 0-5 °C y 98-100% de humedad relativa) para lograr resultados satisfactorios en términos de protección de la calidad físico-química y funcional en pellas de brócoli.

7) El almacenamiento en atmósfera controlada estudiado (10% O₂, 5% CO₂, 1-2 °C y 85-90% de humedad relativa) fue el tratamiento postcosecha más eficaz para preservar la calidad del brócoli 'Parthenon', tanto durante el almacenamiento como tras 2 y 4 días de vida útil a 20 °C, en comparación con el tratamiento con 1-MCP (0,6 µL/L, 1-2 °C y 85-90% de humedad relativa) y con el almacenamiento refrigerado (1-2 °C y 85-90% de humedad relativa). El tratamiento con 1-MCP, sólo fue eficaz para mantener el color verde de las pellas de brócoli durante todo el periodo de almacenamiento en frío, esto también sucedió con las clorofilas, pero sólo en el periodo inicial del almacenamiento en frío. Sin embargo, durante la vida útil, se observó que las muestras tratadas con 1-MCP tenían el mismo comportamiento que las muestras control y el amarilleamiento fue mayor que en las muestras de atmósfera controlada.

8) Los buenos resultados de la aplicación de atmósfera controlada (10% O₂, 5% CO₂, 1-2 °C y 85-90% de humedad relativa) fueron el punto de partida para el estudio del envasado en atmósfera modificada de florestes de brócoli, diseñándose el envase de floretes de brócoli en bolsas de film plástico de propileno microperforado, almacenadas a 5 °C con el fin de lograr una atmósfera de equilibrio igual a la del estudio de atmósfera controlada.

9) El envasado de floretes de brócoli ‘Parthenon’ en atmósfera modificada en las condiciones propuestas, indican que es un procedimiento muy adecuado para mantener tanto la frescura, como los parámetros físico-químicos y funcionales durante un periodo de 12 días. Se encontró que la pérdida de los parámetros de calidad (aspecto general, olor, pérdida de peso y color), la disminución del contenido de compuestos funcionales (clorofilas y pigmentos carotenoides, vitamina C, contenido total de fenoles y glucosinolatos intactos) y los valores de actividad antioxidante fueron inferiores en las muestras almacenadas en atmósfera modificada que en las muestras almacenadas al aire a lo largo de los 12 días de almacenamiento en frío.

10) Por lo tanto, en esta Tesis Doctoral se observó que la utilización de atmósfera controlada y modificada fueron las estrategias más eficaces para mantener los parámetros de calidad físico-química y funcional del brócoli ‘Parthenon’ a lo largo del almacenamiento.

6.- REFERENCIAS

6.- REFERENCIAS

- Able, A.J., Wong, L.S., Prasad, A. and O'hare, T.J. (2002). 1-MCP is more effective on a floral brassica (*Brassica oleracea* var. *Italica*) than a leafy brassica (*Brassica rapa* var. *Chinensis*). *Postharvest Biology and Technology*, 26, 147-155.
- Adrián, J. y Fragüe, R. (1990). *La ciencia de los alimentos de la A a la Z*. Ed. Acribia S.A. Zaragoza.
- Aharoni, N., Rodov, V., Fallik, E., Porat, R., Pesis, E. and Lurie, S. (2008). Controlling humidity improves efficacy of modified atmosphere packaging of fruits and vegetables. *Acta Horticulturae*, 804, 121-128.
- Alonso-Salces, R.M., Héberger, K., Holland, M.V., Moreno-Rojas, J.M., Mariani, C., Bellan, G., Reniero, F. and Guillou, C. (2010). Multivariate analysis of NMR fingerprint of the unsaponifiable fraction of virgin olive oils for authentication purposes. *Food Chemistry*, 118, 956-965.
- Amodio, M.L., Cabezas-Serrano, A.B., Rinaldi, R. and Colelli, G. (2007). Implementation of rating scales for visual quality evaluation of various vegetable crops. In Kader, A.A. and Cantwell, M. (Eds). *Produce Quality Rating Scales and Color Charts, University of California Postharvest Horticultural Series No. 23*. Davis, CA, appendix 1.
- Arnon, D.I. (1949). Copper enzyme in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology*, 24, 1-15.
- Artés, F.C. (2006). El envasado en atmósfera modificada mejora la calidad de consumo de los productos hortofrutícolas intactos y mínimamente procesados en fresco. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, 7, 41-47.
- Ávalos García, A. y Pérez-Urria Carril, E. (2009). Metabolismo secundario de las plantas. *Reduca (Biología)*. Serie Fisiología Vegetal. 2, 119-145.
- Ayaz, F.A., Glew, R.H. and Millson, M. (2006). Nutrient contents of kale (*Brassica oleracea* L. var. *acephala* DC). *Food Chemistry*, 96, 572-579.
- Ayres, H.G. (1970). *Análisis Químico Cuantitativo*. Ed. Del Castillo.
- Bahorun, T., Luximon-Ramma, A., Crozier, A. and Aruoma, O.I. (2004). Total phenol, flavonoid, proanthocyanidin and vitamin C levels and antioxidant activities of

- Mauritian vegetables. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84, 1553-1561.
- Barth, M.M., Perry, A.K., Schmidt, S.J. and Klein, B.P. (1992). Misting affects market quality and enzyme activity of broccoli during retail storage. *Journal of Food Science*, 57, 954-957.
- Belitz, H.D. y Grosch, W. (1997). *Química de los Alimentos*. 2ª ed. Ed. Acribia. Zaragoza.
- Bello, J. (2000). *Ciencia Bromatológica: Principios generales de los alimentos*. Ed. Díaz de Santos.
- Bennett, R. and Wallsgrove, R. (1994). Secondary metabolites in plant defence mechanisms. *New Phytologist*, 127, 617-633.
- Bernalte, M.J., Lozano, M., Ayuso, M.C., Vidal, M.C., García, M.I., Hernández, M.T., García, R.M. and García, J.J. (2007). Compuestos fitoquímicos antioxidantes en diferentes cultivares de brócoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*) de Extremadura. *Actas de Horticultura*, 48, 654-657.
- Block, G., Jensen, C., Dietrich, M., Norkus, E. P., Hudes, M. and Packer, L. (2004). Plasma C-reactive protein concentrations in active and passive smokers: Influence of antioxidant supplementation. *Journal of the American College of Nutrition*, 23, 141-147.
- Bone, R.A., Landrum, J.T., Rosenfeld, P.J., Moore, L.L., Sprague, K.E. and Gomez, C. (1997). One-year study of macular pigment enhancement by lutein supplement. *Investigate Ophthalmology and Visual Science*, 338, S90.
- Bones, A.M. and Rossiter, J.T. (1996). The myrosinase-glucosinolate system, its organisation and biochemistry. *Physiologia Plantarum*, 97, 194-208.
- Booksh, K.S. and Kowalski, B.R. (1994). Theory of analytical chemistry. *Analytical Chemistry*, 66, 782A-791A.

-
- Borowski, J., Szajdek, A., Borowska, E.J., Ciska, E. and Zielinski, H. (2008). Content of select bioactive components and antioxidant properties of broccoli (*Brassica oleracea* L.). *European Food Research and Technology*, 226, 459-465.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E. and Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science and Technology*, 28, 25-30.
- Burns, J., Fraser, P.D. and Bramley, M. (2003). Identification and quantification of carotenoids, tocopherols and chlorophylls in commonly consumed fruits and vegetables. *Phytochemistry*, 62, 939-947.
- CAE. (1991). Código Alimentario Español. Ed. Boletín Oficial del Estado. Colección Textos Legales.
- Cano, M.P. (1991). HPLC separation of chlorophyll and carotenoid pigments of four kiwi fruit cultivars. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 39, 1786-1791.
- Cano, A., Hernández-Ruiz, J., García-Cánovas, F., Acosta, M. and Arnao, M.B. (1998). An end-point method for estimation of the total antioxidant activity in plant material. *Phytochemical Analysis*, 9, 196-202.
- Cantuti-Castelvetri, I., Shukitt-Hal, B. and Joshep, J.A. (2000). Neurobehavioral aspects of antioxidants in aging. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 18, 367-381.
- Cantwell, M. and Suslow, T. (1999). Broccoli: Recommendation for maintaining postharvest quality. Page: <http://postharvest.ucdavis.edu/pfvegetable/Broccoli/> (Last accessed April 2012).
- Cantwell, M. and Suslow, T. (2005). Cabbage: Recommendation for maintaining postharvest quality. Page: <http://postharvest.ucdavis.edu/pfvegetable/Cabbage> (Last accessed February 2012).
- Cappellini, R.A. and Ceponis, M.J. (1984). Postharvest losses in fresh fruits and vegetables. *Postharvest pathology of fruit and vegetables: postharvest losses in perishable crops*. Univ. Calif. Bull. ed. H.E. Moline, 24-30.

-
- Cartea, M.E., Velasco, P., Obregón, S., Padilla, G. and Haro, A. (2008). Seasonal variation in glucosinolate content in *Brassica oleracea* crops grown in northwestern Spain. *Phytochemistry*, 69, 403-410.
- Cefola, M., Amodio, M.L., Cornacchia, R., Rinaldi, R., Vanadia, S. and Colelli, G. (2010). Effect of atmosphere composition on the quality of ready-to-use broccoli raab (*Brassica rapa* L.). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90, 789-797.
- Chen, B.H. and Chen, Y.Y. (1993). *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 41, 1315-1320.
- Chu, Y.H., Chang, C.L. and Hsu, H.F. (2000). Flavonoid content of several vegetables and their antioxidant activity. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 561-566.
- Chu, Y.F., Sun, J., Wu, X. and Liu, R.H. (2002). Antioxidant and antiproliferative activities of common vegetables. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 50, 6910-6916.
- Church, N. (1994). Developments in modified atmosphere packaging and related technologies. *Trends in Food Science Technology*, 5, 345-352.
- Ciska, E., Martyniak-Przybyszewska, B. and Kozłowska, H. (2000). Content of glucosinolates in cruciferous vegetables grown at the same site for two years under different climatic conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 2862-2867.
- Cohen, J.H., Kristal, A. R. and Stanford, J.L. (2000). Fruit and vegetable intakes and prostate cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 92, 61-68.
- Comar, C.L. and Zscheile, F.P. (1942). *Plant Physiology*, 17, 198.
- Cooper, D.A. (2004). Carotenoids in health and disease: recent scientific evaluations, research recommendations and the consumer. *Journal of Nutrition*, 134, 221S-224S.

-
- Czeczot, H. (2000). Biological activities of flavonoids: A review. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 950, 3-13.
- Davey, M.W., van Montagu, M., Inze, D., Sanmartin, M., Kanellis, A. and Smirnoff, N. (2000). Plant L-ascorbic acid: Chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 825-860.
- Day, G.L., Shore, R.E., Blot, W.J., McLaughlin, J.K., Austin, D.F. and Greenberg, R.S. (1994). Dietary factors and second primary cancers: A follow-up of oral and pharyngeal cancer patients. *Nutrition and Cancer*, 21, 223-232.
- DeEll, J.R., Murr, D.P., Porteous, M.D. and Rupasinghe, H.P.V. (2002). Influence of temperature and duration of methylcyclopropene (1-MCP) treatment on apple quality. *Postharvest Biology and Technology*, 24, 349-353.
- Deschene, A., Paliyath, G., Loughheed, E.C., Dumbroff, E.B. and Thompson, J.E. (1991). Membrane deterioration during postharvest senescence of broccoli florets: modulation by temperature and controlled atmosphere storage. *Postharvest Biology and Technology*, 1, 19-31.
- Dixon, R. (2001). Natural products and plant disease resistance. *Nature*, 411, 843-847.
- Dominguez-Perles, R., Martinez-Ballesta, M.C., Riquelme, F., Carvajal, M., García-Viguera, C. and Moreno, D.A. (2011). Novel varieties of broccoli for optimal bioactive components under saline stress. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91, 1638-1647.
- Dong, L., Lurie, S. and Zhou, H. (2002). Effect of 1-methylcyclopropene of ripening “Canino” apricots and “Royal Zee” plums. *Postharvest Biology and Technology*, 24, 135-145.
- Eason, J.R., Patel, D., Ryan, D., Page, B., Hedderley, D., Watson, L. and West, P. (2007a). Controlled atmosphere treatment of broccoli after harvest delays senescence and induces the expression of novel BoCar genes. *Plant Physiology and Biochemistry*, 45, 445-456.
-

- Eason, J.R., Ryan, D.J., Page, B., Watson, L.M. and Coupe, S.A. (2007b). Harvested broccoli (*Brassica oleraceae*) responds to high CO₂ and low O₂ atmosphere by inducing stress-response genes. *Postharvest Biology and Technology*, 43, 358-365.
- Eason, J.R., Ryan, D.J., Watson, L.M., Hedderley, D., Christey, M.C., Braun, R.H. and Coupe, S.A. (2005). Suppression of the cysteine protease, aleurain, delays floret senescence in *Brassica oleracea*. *Plant Molecular Biology*, 57, 645-657.
- Erra-Balsells, R. (2004). Del vuelo de las proteínas y de cómo lograrlo. (Espectrometría de masas ESI). *Química Viva*, 3, 96-121.
- Espinosa-Mansilla, A., Muñoz de la Peña, A. and González-Gómez, D. (2005). Using univariate linear regression calibration software in the MATLAB environment. Application to chemistry laboratory practices. *Chemical Educator*, 10, 1-9.
- Fahey, J.W., Haristoy, X., Dolan, P.M., TKensler, T.W., Scholtus, I., Stephenson, K.K., Talalay, P. and Lozniewski, A. (2002). Sulforaphane inhibits extracellular, intracellular, and antibiotic-resistant strains of *Helicobacter pylori* and prevents benzo[a]pyrene-induced stomach tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, 99, 7610-7615.
- Fahey, J.W., Zalcmann, A.T. and Talalay, P. (2001). The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry*, 56, 5-51.
- Fan, X.T. and Mattheis, J.P. (2000). Yellowing of broccoli in storage is reduced by 1-methylcyclopropene. *Hortscience*, 35, 885-887.
- FAOSTAT. (2010). The Statistics Division of the Organization for Food and Agriculture of the United Nations. Page: <http://193.43.36.221/site/339/default.aspx> (Last accessed September 2012).
- Favell, D.J. (1998). A comparison of the vitamin C content of fresh and frozen vegetables. *Food Chemistry*, 62, 59-64.

- Fenwick, G.R., Heaney, R.K. and Mullin, W.J. (1983). Glucosinolates and their breakdown products in food and food plants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 18, 123-194.
- FEPEX (Spanish Federation of Producers and Exporters of Fruits and Vegetables). Page: <http://www.fepex.es/publico/datosSector/Consumo.aspx> (Last accessed February 2012).
- Fernández-León, M.F., Fernández-León, A.M., Lozano Ruiz, M., Ayuso Yuste, M.C., González García, J.A. and González-Gómez, D. (2011a). Antioxidantes naturales y capacidad antioxidante en Brassicas. *Actas de Horticultura*, 58, 191-194.
- Fernández-León, M.F., Fernández-León, A.M., Lozano Ruiz, M., Ayuso Yuste, M.C. and González-Gómez, D. (2012). Identification, quantification and comparison of the principal bioactive compounds and external quality parameters of two broccoli cultivars. *Journal of Functional Foods*, 4, 465-473.
- Fernández-León, M.F., Lozano, M., Ayuso, M.C., Fernández-León, A.M. and González-Gómez, D. (2010). Fast and accurate alternative UV-chemometric method for the determination of Chlorophyll A and B in broccoli (*Brassica oleracea Italica*) and cabbage (*Brassica oleracea Sabauda*) plants. *Journal of Food Composition and Analysis*, 23, 809-813.
- Fernández-León, M.F., Lozano, M., Ayuso, M.C. and González-Gómez, D. (2011b). Simultaneous Determination of Eleven Intact Glucosinolates in Fresh and Controlled Atmospheres Stored Broccoli Plants by HPLC-MS/MS. *36th International Symposium on High-Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques*, P1-G, 250.
- Ferré, J. and Faber, N.M. (2003). Net analyte signal calculation for multivariate calibration. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 69, 123-136.
- Ferruzzi, M.G., Böhm, V., Courtney, P.D. and Schwarts, S.J. (2002). Antioxidant and Antimutagenic Activity of Dietary Chlorophyll Derivatives Determined by

-
- Radical Scavenging and Bacterial Reverse Mutagenesis Assays. *JFS: Food Chemistry and Toxicology*, 67, 2589-2595.
- Finger, F.L., Endres, L., Mosquim, P.R. and Pulatti, M. (1999). Physiological changes during postharvest senescence of broccoli. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 9, 1565-1569.
- Forney, C.F. and Riji, R.E. (1991). Temperature of broccoli florets at time of packaging influences package atmosphere and quality. *HortScience*, 26, 1301-1303.
- Galeano-Díaz, T., Rodríguez Cáceres, M.I. and Roldán Murillo, B. (2007). Chemometrics for the resolution of co-eluting peaks of β - and γ -tocopherols in RP-HPLC: Determination in edible oils and dietary supplements. *Food Chemistry*, 105, 1583-1590.
- García, M.I., González, J.A., Lozano, M., Ayuso, M.C., Bernalte, M.J., Pacheco, M., Calvo, P., Martínez, M.A., Benítez-Donoso, R. and Campillo, C. (2005). Comportamiento agronómico e industrial de cultivares de brócoli en las Vegas del Guadiana. *Actas Portuguesas de horticultura*, 5, 126-133.
- García, M.I., González, J.A., Lozano, M., Ayuso, M.C., Bernalte, M.J. y Vidal-Aragón, M.C. (2006). Comportamiento de cultivares de brócoli en la Vegas del Guadiana. *Horticultura*, 193, 24-29.
- García, M.I., Lozano, M., Montero de Espinosa, V., Ayuso, M. C., Bernalte, M.J., Vidal-Aragón, M.C. and Pérez, M.M. (2007). Agronomic characteristics and carotenoid content of five Bola-type paprika red pepper (*Capsicum annuum* L.) cultivars. *Scientia Horticulturae*, 113, 202-207.
- Giambanco de Ena, H. (1999). Trazabilidad, identificar el producto. *Horticultura*, marzo, 23-34.
- Gil, M.I., Ferreres, F. and Tomás-Barberán, F.A. (1999). Effect of postharvest storage and processing on the antioxidant constituents (flavonoids and vitamin C) of fresh-cut spinach. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 2213-2217.

-
- Gil-García, M.D., Garrido Frenich, A., Martínez Vidal, J.L., Martínez Galera, M., Muñoz de la Peña, A. and Salinas, F. (1997). Resolution of overlapping peaks in HPLC with diode array detection by application of partial least squares calibration to cross-sections of spectrochromatograms. *Analytica Chimica Acta*, 348, 177-185.
- Gimeno Creus, E. (2004). Compuestos fenólicos. Un análisis de sus beneficios para la salud. *Farmacia y Salud, Oficina de Farmacia*, 23, 80-84.
- González, J., Ferrer, A., Oria, R. and Salvador, M.L. (2008). Determination of O₂ and CO₂ transmission rates through microperforated films for modified atmosphere packaging of fresh fruits and vegetables. *Journal of Food Engineering*, 86, 194-201.
- González-Gómez, D. (2005). Utilización de señales de primer y segundo orden para el análisis de fluoroquinolonas y carbamacepinas en fluidos biológicos. *Tesis Doctoral*. Universidad de Extremadura.
- González, A.G., Herrador, M.A. and Asuero, A.G. (1999). Intra-laboratory testing of method accuracy from recovery assays. *Talanta*, 48, 729-736.
- González-Gómez, D., Lozano, M., Fernández-León, A.M., Fernández-León, M.F. and Cañada-Cañada, F. (2011). PLS calibration to resolve overlapping peaks of lutein and zeaxanthin in vegetable samples by LC. *Czech Journal of Food Sciences*, 30, 358-363.
- Gosslau, A. and Chen, K.Y. (2004). Nutraceuticals, apoptosis, and disease prevention. *Nutrition*, 20, 95-102.
- Guillén, F. (2009). 1-MCP como estrategia de conservación. *Horticultura Internacional*, 69, 18-24.
- Gundgaard, J., Nielsen, J.N., Olsen, J. and Sorensen, J. (2003). Increased intake of fruit and vegetables: Estimation of impact in terms of life expectancy and healthcare costs. *Public Health Nutrition*, 6, 25-30.

- Haaland, D. and Thomas, E.V. (1988). Partial least-squares methods for spectras analysis, 2. Application to simulated and glass spectral data. *Analytical Chemistry*, 60, 1202-1208.
- Handelman, G.J., Nightingale, Z.D., Lichtenstein, A.H., Schaefer, E.J. and Blumberg, J.B. (1999). Lutein and zeaxanthin concentrations in plasma after dietary supplementation with egg yolk. *American Journal of Clinical Nutrition*, 70, 247-251.
- Hansen, M., Moller, P., Hilmer, S. and Cantwell de Trejo, M. (1995). Glucosinolates in Broccoli stored under controlled atmosphere. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 120, 1069-1074.
- Hansen, M.E., Sorensen, H. and Cantwell, M. (2001). Changes in acetaldehyde, ethanol and amino acid concentrations in broccoli florets during air and controlled atmosphere storage. *Postharvest Biology and Technology*, 22, 227-237.
- Howard, L.A., Jeffery, E.H., Wallig, M.A. and Klein, B.P. (1997). Glucosinolates and their breakdown product in food and food products. *Journal of Food Science*, 62, 1098-1100.
- Izumi, H., Watada, A.E. and Douglas, W. (1996). Optimum O₂ or CO₂ atmosphere for storing broccoli florets at various temperatures. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 121, 127-131.
- Jeffery, E.H., Brown, A.F., Kurilich, A.C., Keek, A.S., Matusheski, N. and Klein, B.P. (2003). Variation in content of bioactive components in broccoli. Study review. *Journal of Food Composition and Analysis*, 16, 323-330.
- Jia, C.G., Xu, C.J., Wei, J., Yuan, J., Yuan, G.F., Wang, B.L. and Wang, Q.M. (2009). Effect of modified atmosphere packaging on visual quality and glucosinolates of broccoli florets. *Food Chemistry*, 114, 28-37.
- Jones, R.B., Faragher, J.D. and Winkler, S. (2006). A review of the influence of postharvest treatments on quality and glucosinolate content in broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) heads. *Postharvest Biology and Technology*, 41, 1-8.

-
- Kader, A.A. (1992). Postharvest Technology of Horticultural Crops. *University of California Publications*, 3311. A.A. Kader, ed.
- Kader, A.A. (2002). Methods of gasmixing, sampling and analysis. In *Postharvest Technology of HorticulturalCrops*, publication 3311, ed. by Kader A.A. University of California and Agricultural and Natural Resources, Berkeley, CA, pp. 145-148.
- Kader, A.A. (2007). Atmósferas modificadas en el transporte y el almacenamiento. En Adel A. Kader (ed.), Clara Pelayo-Zaldívar (coord.). *Tecnología Postcosecha de Cultivos Hortofrutícolas* (3^a ed.). Centro de Información e Investigación en Tecnología Postcosecha, Universidad de California, Davis, pp. 157-173.
- Kasmire, R.F., Kader, A.A. and Klaustermeyer, J.A. (1974). Influence of aeration rate and atmospheric composition during simulated transit on visual quality and off-odor production by broccoli. *HortScience*, 9, 228-229.
- Keck, A.S. and Finley, J.W. (2004). Cruciferous Vegetables: cancer protective mechanisms of glucosinolates hydrolysis products and selenium. *Integrate Cancer Therapies*, 3, 5-12.
- Keck, A.S., Staack, R. and Jeffery, E.H. (2002). The cruciferous nitrile cambrene has bioactivity similar to sulforaphane when administered to fischer 344 rats but is far less potent in cell culture. *Nutrition and Cancer*, 42, 233-240.
- Khachik, F., Beecher, G.R. and Whittaker, N.F. (1986). Separation, identification, and quantification of the major carotenoid and chlorophyll constituents in extracts of several green vegetables by liquid chromatography. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 34, 603-616.
- Khanchi, A.R., Mahani, M.K., Hajihosseini, M., Maragheh, M.G., Chaloosi, M. and Bani, F. (2007). Simultaneous spectrophotometric determination of caffeine and theobromine in Iranian tea by artificial neural networks and its comparison with PLS. *Food Chemistry*, 103, 1062-1068.

-
- Kiddle, G.A., Bennett, R.N., Botting, N.P., Davidson, N.E., Robertson, A.A.B. and Wallsgrove, R.M. (2001). High performance liquid-chromatography separation of natural and synthetic desulfoglucosinolates and their chemical validation by spectroscopic, NMR, and CI-MS methods. *Phytochemical Analysis*, 12, 226-242.
- King, G.A. and Morris, S.C. (1994). Physiological changes of broccoli during early postharvest senescence and through the preharvest-postharvest continuum. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 119, 270-275.
- Koh, E., Wimalasiri, K.M.S., Chassy, A.W. and Mitchell, A.E. (2009). Content of ascorbic acid, quercetin, kaempferol and total phenolics in commercial broccoli. *Journal of Food Composition and Analysis*, 22, 637-643.
- Krinsky, N.I. and Johnson, E.J. (2005). Carotenoid actions and their relation to health and disease. *Molecular Aspects of Medicine*, 26, 459-516.
- Kris-Etherton, P.M., Hecker, K.D., Bonanome, A., Coval, S.M., Binkoski, A.E., Hilpert, K.F., Griel, A.E. and Etherton, T.D. (2002). Bioactive compounds in foods: Their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *Excerpta Medica*. 30, 71S-88S.
- Ku, V.V.V. and Wills, R.B.H. (1999). Effect of 1-methylcyclopropene on the storage life of broccoli. *Postharvest Biology and Technology*, 17, 127-132.
- Kuntz, S., Wenzel, U. and Daniel, H. (1999). Comparative analysis of the effects of flavonoids on proliferation, cytotoxicity, and apoptosis in human colon cancer cell lines. *European Journal of Nutrition*, 38, 133-142.
- Kurilich, A.C., Tsau, G.J., Brown, A., Howard, L., Klein, B.P., Jeffery, E.H., Kushad, M., Wallig, M.A. and Juvik, J.A. (1999). Carotene, tocopherol, and ascorbate contents in subspecies of *Brassica oleracea*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 1576-1581.

-
- Kushad, M.K., Brown, A.F., Kurilich, A.C., Juvik, J.A., Klein, B.P., Wallig, M.A. and Jeffery, E.H. (1999). Variation of glucosinolates in vegetable crops of *Brassica oleracea*. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 47, 1541-1548.
- la Zazzera, M., Cornacchia, L., Amodio, M.L. and Colelli, G. (2010). Effect of atmosphere composition on quality of a ready-to-cook complex soup including fresh-cut vegetables and seeds. *Acta Horticulturae*, 876, 325-331.
- Lai, J., Butler, M.A. and Matney, T. (1980). Antimutagenic activities of common vegetables and their chlorophyll content. *Mutation Research*, 77, 245-250.
- Landrum, J.T., Bone, R.A., Joa, H., Kilburn, M.D., Moore, L.L. and Sprague, K.E. (1997). A one year study of the macular pigment: the effect of 140 days of a lutein supplement. *Experimental Eye Research*, 65, 57-62.
- Lange, D.L. (2000). New film technologies for horticultural products. *Horticultural Technology*, 10, 487-490.
- Lee, S.K. and Kader, A.A. (2000). Preharvest and postharvest factors influencing vitamin C content of horticultural crops. *Postharvest Biology and Technology*, 20, 207-220.
- Lichtenthaler, H.K. (1987). Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods Enzymology*, 148, 350-382.
- Lichtenthaler, H.K., Kuhn, G., Prenzel, U., Buschmann, C. and Meier, D. (1982). Adaptation of chloroplast-ultrastructure and chlorophyll-protein levels to high light and low light growth conditions. *Zeitschrift für Naturforschung - Section C: Biosciences*, 37C, 464-475.
- Lima, V.L.A.G., Mélo, E.A., Maciel, M.I.S., Prazeres, F.G., Musser, R.S. and Lima, D.E.S. (2005). Total phenolic and carotenoid content in acerola genotypes harvested at three ripening stages. *Food Chemistry*, 90, 565-568.
- Lipton, W.J. (1987). Senescence in leafy vegetables. *HortScience*, 22, 854-859.

- Lo Scalzo, R., Bianchi, G., Genna, A. and Summa, C. (2007). Antioxidant properties and lipidic profile as quality indexes of cauliflower (*Brassica oleracea* L. var. *botrytis*) in relation to harvest time. *Food Chemistry*, 100, 1049-1025.
- Lorber, A. and Kowalski, B.R. (1988). The effect of interferences and calibration design on accuracy: implications for sensor and sample selection. *Journal Chemometrics*, 2, 67-69.
- Lozano, M., Ayuso, M.C., Bernalte, M.J., García, M.I., Hernández, M.T., Vidal-Aragón, M.C., González, J.A., García, J. y García, R.M. (2007). Superficie cultivada y ensayos de variedades más productivas de brócoli, coliflor y romanesco. Las brassicas, del cultivo tradicional hacia los nuevos retos. *Vida Rural*, 44-47.
- MacKinney, G. (1941). Absorption of light by chlorophyll solutions. *Journal of Biology Chemistry*, 140, 315-322.
- MAGRAMA (2010). Ministry of Agriculture, Fisheries and Food of Spain. Statistical Yearbook of Agriculture 2010. Page: http://www.magrama.gob.es/estadistica/pags/anuario/2010/AE_2010_13.pdf (Last accessed February 2012).
- MAGRAMA. (2010-2011). Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. Plan de consumo alimentario 2010-2011. Página: http://www.alimentacion.es/imagenes/es/ANEXO%20VII%20Situacion%20sector%20y%20consumo%202010-2011%20plan%20fruta_tcm5-39867.pdf (Consultado en julio de 2012).
- MAGRAMA. (2011). Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. Anuario de Estadística 2011. Página: http://www.magrama.gob.es/estadistica/pags/anuario/2011/AE_2011_13.pdf (Consultado en julio de 2012)
- Maroto, J.V. (1989). *Horticultura Herbácea Especial*. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid.

-
- Martens, H. and Naes, T. (1989). *Multivariate Calibration*. Willey, Chichester.
- Martínez, J.A., De Ancos, B., Sánchez-Moreno, C. and Cano, M.P. (2007). Protective effect of minimally processing on bioactive compounds of broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*) during refrigerated storage and after cold chain rupture. *V Congreso Iberoamericano de Tecnología Postcosecha y Agroexportaciones*, 694-706.
- Martínez, S., Olmos, I., Carballo, J. and Franco, I. (2010). Quality parameters of Brassica spp. grown in northwest Spain. *International Journal of Food Science and Technology*, 45, 776-783.
- Massart, D.L., Vandegintse, B.G.M., Buydens, L.M.C., De Jong, S., Lewi, P.J. and Smeyers-Verbeke, J. (1997) *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics*. Elsevier, Amsterdam.
- Massey, L.K. (2003). *Permeability Properties of Plastics and Elastomers*. Andrew Publishing. New York.
- Mattheis, J., Blankenship, S., Roberts, R. and Reed, N. (2000). Manipulation of Ethylene for apple Postharvest Management. *Washington Tree Fruit Research Commission*. Research Review.
- Meléndez-Martínez, A.J., Vicario, I.M. and Heredia, F.J. (2003). Application of tristimulus colorimetry to estimate the carotenoids content in ultrafrozen orange juices. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 51, 7266-7270.
- Mikkelsen, M.D., Petersen, B., Olsen, C. and Halkier, B.A. (2002). Biosynthesis and metabolic engineering of glucosinolates. *Amino Acids*, 22, 279-95.
- Mínguez-Mosquera, M.I. and Hornero-Méndez, D. (1993). Separation and quantification of the Carotenoid Pigments in Red Peppers (*Capsicum annuum* L.), Paprika and Oleoresin by Reversed-Phase HPLC. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41, 1616-1620.
- Mir, N.A., Khan, N. and Beaudry, R.M. (1999). 1-Methylcyclopropene extends shelf life of tomato at all stages of maturity. *HortScience* 34, 538 (Abstract).

-
- Mithen, R. (1992). Leaf glucosinolate profiles and their relationship to pest and disease resistance in oilseed rape. *Euphytica*, 63, 71-83
- 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. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 967-984.
- Moberg, L., Karlberg, B., Blomqvist, S. and Larsson, U. (2000). Comparison between a new application of multivariate regression and current spectroscopy methods for the determination of chlorophylls and their corresponding pheopigments. *Analytica Chimica Acta*, 411, 137-143.
- Mondragón-Portocarrero, A.D.C., Pena-Martínez, B., Fernández-Fernández, E., Romero-Rodríguez, A. and Vázquez-Odériz, L. (2006). Effects of different pre-freezing blanching procedures on the physicochemical properties of Brassica rapa leaves (Turnip Greens, Grelos). *International Journal of Food Science and Technology*, 41, 1067-1072.
- Moreno, D.A., Carvajal, M., López-Berenguer, C. and García-Viguera, C. (2006). Chemical and biological characterisation of nutraceutical compounds of broccoli. *Journal of Pharmaceutical Biomedical Analysis*, 41, 1508-1522.
- Murkovic, M., Gams, K., Draxl, S. and Pfannhauser, W. (2000). Development of an Austrian carotenoid database. *Journal of Food Composition and Analysis*, 13, 435-440.
- Nath, A, Bagchi, B., Misra, L.K., Bidyut, C. and Deka, B. (2011). Changes in post-harvest phytochemical qualities of broccoli florets during ambient and refrigerated storage. *Food Chemistry*, 127, 1510-1514.
- Nestle, M. (1998). Broccoli sprouts in cancer prevention. *Nutrition Reviews*, 56, 127-130.
- Nieuwhof, M. (1969). Cole Crops: Botany, Cultivation and Utilization. *World Crops Series*. Leonard Hill, London, UK, 353 pp.

-
- Nuez, F., Gómez Campo, C., Fernández de Córdoba, P., Soler, S. y Valcárcel, J.V. (1999). *Colección de semillas de coliflor y brócoli*. Ed. Instituto de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria. Madrid.
- Ohr, L. M. (2004). Dietary antioxidants. *Food Technology*, 58, 67-74.
- Oliveira, F.A.R., Fonseca, S.C., Oliveira, J.C., Brecht, J.K. and Chau, K.V. (1998). Development of perforation-mediated modified atmosphere packaging to preserve fresh fruit and vegetable quality after harvest. *Food Science and Technology International*, 4, 339-352.
- Olivieri, A.C., Goicoechea, H.C. and Iñón, F.A. (2004). MVC1: an integrated MatLa toolbox for first-order multivariate calibration. *Chemometrics and Intelligent Laboratory System*, 73, 189-197.
- Ou, B., Huang, D., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J.A. and Deemer, E.K. (2002). Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: A comparative study. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 50, 3122-3128.
- Page, T., Griffiths, G. and Buchanan-Wollaston, V. (2001). Molecular and biochemical characterization of postharvest senescence in broccoli. *Plant Physiology*, 125, 718-727.
- Paliyath, G., Murr, D.P., Handa, A.K. and Lurie, S. (2008). Postharvest biology and technology of fruits, vegetables and flowers. *Wiley-Blackwell*. Iowa, USA.
- Pattee, H.E. (1985). *Evaluation of Quality of Fruits and Vegetables*. Ed. Avi. Publishing Company, Inc. Westport. Connecticut.
- Pereira, M.G., Icely, J., Mudge, S., Newton, A. and Rodriguez, R. (2007). Temporal and spatial variation of phytoplankton pigments in the western part of Ria Formosa Lagoon, southern Portugal. *Environmental Forensics*, 8, 205-220.

-
- Perry, A., Rasmussen, H. and Johnson, E.J. (2009). Xanthophyll (lutein, zeaxanthin) content in fruits, vegetables and corn and egg products. *Journal of Food Composition and Analysis*, 22, 9-15.
- Podsdek, A. (2007). Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: A review. *LWT-Food Science and Technology*, 40, 1-11.
- Podsdek, A., Sosnowska, D., Redzyna, M. and Anders, B. (2006). Antioxidant capacity and content of *Brassica oleracea* dietary antioxidants. *International Journal of Food Science and Technology*, 41, 49-58.
- Polder, G., van der Heijden, G., van der Voet, H. and Young, I.T. (2004). Measuring surface distribution of carotenes and chlorophyll in ripening tomatoes using imaging spectrometry. *Postharvest Biology and Technology*, 34, 117-129.
- Poulli, K.I., Mousdis, G.A. and Georgiou, C.A. (2007). Rapid synchronous fluorescence method for virgin olive oil adulteration assessment. *Food Chemistry*, 105, 369-375.
- Pramanik, B.K., Matsui, T., Suzuki, H. and Kosugi, Y. (2004). Changes in acid invertase activity and sugar distribution during postharvest senescence in broccoli. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 7, 679-684.
- Rai, D.R., Jha, S.N., Wanjari, O.D. and Patil, R.T. (2009). Chromatic Changes in Broccoli (*Brassica oleracea italica*) under Modified Atmospheres in Perforated Film Packages. *Food Science and Technology International*, 15, 387-395.
- Rangana, S. (1986). *Handbook of Analysis and Quality Control for Fruit and Vegetable Products*. Mc. Graw-Hill Publishing Company, Ltd. NewYork.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. and Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26, 1231-1237.
- Revista digital Distribución hortofrutícola. (2012). El brócoli, una hortaliza que gana posiciones en el mercado y en los fogones. Página:
-

-
- <http://www.interempresas.net/Distribucion-Hortofruticola/Articulos/59742-El-brocoli.html> (Consultado en septiembre de 2012).
- Rossetto, M., Vanzani, P., Mattivi, F., Lunelli, M., Scarpa, M. and Rigo, A. (2002). Synergistic antioxidant effect of catechin and malvidin 3-glucoside on free radical-initiated peroxidation of linoleic acid in micelles. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 408, 239-245.
- Salguero, J., Alarcon, M.V., Zájara, L., Carrasco, L.E. and Ordiales, E. (2011). Evaluación agronómica de cuatro variedades de brócoli en las Vegas Bajas del río Guadiana. *Actas de Horticultura*, 58, 42-45.
- Salunkhe, D.K. and Kadam, S.S. (1998). *Handbook of Vegetable Science and Technology: Production, Composition, Storage, and Processing*. New York, USA: Marcel Decker Inc.
- Sandhya. (2010). Modified atmosphere packaging of fresh produce: Current status and future needs. Review. *LWT-Food Science and Technology*, 43, 381-392.
- Schoefs, B. (2002). Chlorophyll and carotenoid analysis in food products. Properties of the pigments and methods of analysis. Trends in *Food Science and Technology*, 13, 361-371.
- Schreiner, M., Peters, P. and Krumbein, A. (2006). Glucosinolates in mixed packaged mini broccoli and mini cauliflower under modified atmosphere. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 2218-22.
- Schreiner, M., Peters, P. and Krumbein, A. (2007). Changes of Glucosinolates in Mixed Fresh-Cut Broccoli and Cauliflower florest in Modified Atmosphere Packaging. *Journal of Food Science*, 72, 585-589.
- Schwartz, S.J. and Lorenzo, T.V. (1990). Critical reviews. *Food Science and Nutrition*, 29, 1-18.
- Serrano, M., Martínez-Romero, D., Guillén, F., Castillo, S. and Valero, D. (2006). Maintenance of broccoli quality and functional properties during cold storage as

- affected by modified atmosphere packaging. *Postharvest Biology and Technology*, 39, 61-68.
- Seybold, A. and Egle, K. (1970). *Planta*, 26, 491.
- Shewfelt, R.L. (1986). Postharvest treatments for extending the shelf-life of fruits and vegetables. *Food Technology*, 40, 70-89.
- Simón, A., González-Fandos, E. and Rodríguez, D. (2008). Effect of film and temperature on the sensory, microbiological and nutritional quality of minimally processed cauliflower. *International Journal of Food Science and Technology*, 43, 1628-1636.
- Singh, J., Upadhyay, A.K., Bhadur, A., Singh, B. Singh, K.P. and Mathura, R. (2006). Antioxidant phytochemicals in cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *capitata*). *Scientia Horticulturae*, 108, 233-237.
- Singh, J., Upadhyay, A.K., Prasad, K., Bahadur, A. and Rai, M. (2007). Variability of carotenes, vitamin C, E and phenolics in Brassica vegetables. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20, 106-112.
- Singleton, V.L. and Rossi, J.A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144-158.
- Sisler, E.C. and Serek, M. (1997). Inhibitors of ethylene responses in plants at the receptor level: Recent developments. *Physiology Plant*, 100, 577-582.
- Sisler, E.C., Serek, M. and Dupille, E. (1995). Comparison of cyclopropene, 1-methylcyclopropene, and 3,3-dimethylcyclopropene as ethylene antagonists in plants. *Plant Growth Regulation*, 17, 1-6.
- Skoog, D.A., West, D.M. and Leary, J.J. (1992). *Principles of Instrumental Analysis*. Mc Graw-Hill. 5^a Ed.
- Sousa, C., Taveira, M., Valentao, P., Fernandes, F., Pereira, J.A., Estevinho, L., Bento, A., Ferreres, F., Seabra, R.M. and Andrade, P.B. (2008). Inflorescences of

-
- Brassicacea species as source of bioactive compounds: A comparative study. *Food Chemistry*, 110, 953-961.
- Streitweiser and Heathcock. (1981). *Introduction to Organic Chemistry*. MacMillan, New York.
- Su, Q., Rowley, K.G. and O'Dea, K. (1999). Stability of individual carotenoids, retinal and tocopherols in human plasma during exposure to light and after extraction. *Journal of Chromatography B*, 729, 191-198.
- Takahashi, M., Watanabe, H., Kikkawa, J., Ota, M., Watanabe, M., Sato, Y., Inomata, H. and Sato, N. (2006). Carotenoids extraction from Japanese persimmon (Hachiya-kaki) peels by supercritical CO₂ with ethanol. *Analytical Sciences*, 22, 1441-1447.
- Tauler, R. y Casassas, E. (1989). *Analytica Chimica Acta*, 223,257-268.
- Temple, N.J. (2000). Antioxidants and disease: More questions than answers. *Nutrition Research*, 20, 449-459.
- Tian, Q., Rosselot, R.A. and Schwartz, S.J. (2005). Quantitative determination of intact glucosinolates in broccoli, broccoli sprouts, Brussels sprouts and cauliflower by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *Analytical Biochemistry*, 343, 93-99.
- Toivonen, P.M.A. and DeEll, J.R. (2001). Chlorophyll fluorescence, fermentation product accumulation, and quality of stored broccoli in modified atmosphere packages and subsequent air storage. *Postharvest Biology and Technology*, 23, 61-69.
- Toivonen, P.M.A. and Forney, C. (2004). 'Broccoli', in The commercial storage of fruits, vegetables and florist and nursery stock. *USDA, ARS Agriculture Handbook number*, 66. Beltsville, MD.
- Toivonen, P.M.A. and Sweeney, M. (1998). Differences in chlorophyll loss at 13 °C for two broccoli (*Brassica oleracea* L.) cultivars associated with antioxidant enzyme activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 20-24.
-

- Toor, R.K. and Savage, G.P. (2006). Changes in major antioxidant components of tomatoes during post-harvest storage. *Agricultural Food and Chemistry*, 99, 724-727.
- Torija Isasa, M.E. (2002). Factores determinantes de la calidad nutritiva de frutas y hortalizas frescas. En *Aspectos relativos a la calidad de frutas y hortalizas frescas. Monografía I*, 12-23. Publicado por: Fundación Sabor y salud. Valencia.
- Torija Isasa, M.E. y Cámara Hurtado, M.M. (1999). *Hortalizas, verduras y frutas. Tratado de Nutrición*. Ed. Díaz Santos. Madrid.
- Traka, M. and Mithen, R. (2009). Glucosinolates, isothiocyanates and human health. *Phytochemistry Reviews*, 8, 269-282.
- Trombino, S., Serini, S., Di Nicuolo, F., Celleno, L., Ando, S. and Picci, N. (2004). Antioxidant effect of ferulic acid in isolated membranes and intact cells: Synergistic interactions with β -tocopherol, β -carotene, and ascorbic acid. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 52, 2411-2420.
- USDA/ARS. (2006). U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service. National Nutrient Database for Standard Reference, Release 19. Retrieved January 11, 2007 from the Nutrient Data Laboratory Home Page: http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/cgi-bin/list_nut_edit.pl (Last accessed February 2012).
- USDA/ARS. (2007). U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service. Database for the Flavonoid Content of Selected Foods, Release 2.1. Retrieved March 20, 2007 from the Nutrient Data Laboratory Home Page: <http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/data/flav/flav02-1.pdf> (Last accessed February 2012).
- Valero, D., Martínez-Romero, D., Valverde, J.M., Guillén, F., Castillo, S. and Serrano, M. (2004). Could the 1-MCP treatment effectiveness in plum be affected by packaging?. *Postharvest Biology and Technology*, 4, 339-348.

-
- Vallejo, F., García-Viguera, C. and Tomás-Barberán, F.A. (2003a). Changes in broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*) health-promoting compounds with inflorescence development. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 3776-3782.
- Vallejo, F., Tomás-Barberán, F.A. and García-Viguera, C. (2002). Potential bioactive compounds in health promotion from broccoli cultivars grown in Spain. *Journal of the Science and Food and Agriculture*, 82, 1293-1297.
- Vallejo, F., Tomás-Barberán, F.A., González, A. and García-Viguera, C. (2003b). Total and individual glucosinolate contents in inflorescences of eight broccoli cultivars grown under various climatic and fertilisation conditions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83, 307-313.
- Vallejo, F., Tomás-Barberán, F.A. and García-Viguera, C. (2003c). Health-promoting compounds in broccoli as influenced by refrigerated transport and retail sale period. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 3029-3034.
- Vallejo, F., Tomás-Barberán, F.A. and García-Viguera, C. (2003d). Phenolic compound contents in edible parts of broccoli inflorescences after domestic cooking. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83, 1511-1516.
- Van der Berg, H., Faulks, R., Granado, F. H., Hirschberg, J., Olmedilla, B. and Sandmann, G. (2000). The potential for the improvement of carotenoid levels in foods and the likely systemic effects. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 880-912.
- Verhoeven, D.T.H., Goldbohm, R.A., Van Poppel, G., Verhagen, H. and Van den Brandt, P.A. (1996). Epidemiological studies on Brassica vegetables and cancer risk. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*, 5, 733-748.
- Verkerk, R., Dekker, M. and Jongen, W.M.F. (2001). Post-harvest increase of indolyl glucosinolates in response to chopping and storage of Brassica vegetables. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81, 953-8.

- Verkerk, R., Schreiner, M., Krumbein, A., Ciska, E., Holst, B., Rowland, I., De Schrijver, R., Hansen, M., Gerhäuser, C., Mithen, R. and Dekker, M. (2009). Review Glucosinolates in Brassica vegetables: The influence of the food supply chain on intake, bioavailability and human health. *Molecular Nutrition and Food Research*, 53, S219-S265.
- Vernon, L.P. (1960). *Analytical Chemistry*, 32, 1144.
- Vidal Carou, M.C. (2008). Alimentos funcionales. Algunas reflexiones en torno a su necesidad, seguridad y eficacia y a cómo declarar sus efectos sobre la salud. *HUMANITAS. Humanidades médicas*, 24, 1-27.
- Vinson, J.A., Dabbagh, Y.A., Serry, M.M. and Jang, J. (1995). Plant flavonoids, especially tea flavonols, are powerful antioxidants using an in vitro oxidation model for heart disease. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 43, 2800-2802.
- Vu, H.T., Robman, L., Hodge, A., McCarty, C.A. and Taylor, H.R. (2006). Lutein and zeaxanthin and the risk of cataract: the Melbourne visual impairment project. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 47, 3783-3786.
- Wang, C.Y. (1979). Effect of short-term high CO₂ treatment on the marketing quality of stored broccoli. *Journal of Food Science*, 44, 1478-1482.
- Watkins, C.B. (2006). The use of 1-methylcyclopropene (1-MCP) on fruits and vegetables. *Biotechnology Advances*, 24, 389-409.
- Watkins, C.B. (2008). Overview of 1-methylcyclopropene trials and uses for edible horticultural crops. *HortScience*, 43, 86-94.
- Wills, R., McGlasson, B., Graham, D. y Joyce, D. (1999). *Introducción a la fisiología y manipulación poscosecha de frutas, hortalizas y plantas ornamentales* (2ª ed.). Zaragoza, España: Acribia, S.A.
- Winkler, S., Faragher, J., Franz, P., Imsic, M. and Jones, R. (2007). Glucoraphanin and flavonoid levels remain stable during simulated transport and marketing of

- broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) heads. *Postharvest Biology and Technology*, 43, 89-94.
- Wittstock, U. and Halkier, B.A. (2002). Glucosinolate research in the *Arabidopsis* era. *Trends in Plant Science*, 7, 263-270.
- Wold, S., Martens, H. and Wold, H. (1983). The multivariate calibration problem in chemistry solved by PLS. In Ruhue, Kagstrom, (Eds.). In the *Series, Lecture Notes in Mathematics*, vol. 286. Matrix pencils, Heidelberg.
- Wollowski, K., R cemmer, G. and Pool-Zobel, B.L. (2001). Protective rol of probiotics and prebiotics in colon cancer. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73, 451S-455S.
- Wong, G.Y.C., Bradlow, L., Sepkovic, D., Mehl, S., Mailman, J. and Osborne, M.P. (1998). Dose ranging study of indole-3-carbinol for breast cancer prevention. *Journal of Cellular Biochemistry*, 28-29, 111-116.
- Wu, X., Beecher, G.R., Holden, J.M., Haytowitz, D.B., Gebhardt, S.E. and Prior, R.L. (2004). Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 52, 4026-4037.
- Xie, L., Ye, X., Liu, D. and Ying, Y. (2009). Quantification of glucose, fructose and sucrose in bayberry juice by NIR and PLS. *Food Chemistry*, 114, 1135-1140.
- Xu, C.J., Guo, D.P., Yuan, J., Yuan, G.F. and Wang, Q.M. (2006). Changes in glucorapahnin content and quinone reductase activity in broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) florets during cooling and controlled atmosphere storage. *Postharvest Biology and Technology*, 42, 176-184.
- Yang, Y., Wang, J., Xing, Z., Dai, Y. and Chen, M. (2011). Identification of phenolics in Chinese toon and analysis of their content changes during storage. *Food Chemistry*, 128, 831-838.
- Yuan, G., Sun, B., Yuan, J. and Wang, Q. (2010). Effect of 1-methylcyclopropene on shelf life, visual quality, antioxidant enzymes and health-promoting compounds in broccoli florets. *Food Chemistry*, 118, 774-781.

- Zapata, S. and Dufour, J.F. (1992). Ascorbic, dehydroascorbic and isoascorbic acid simultaneous determinations by reverse phase ion interaction HPLC. *Journal of Food Science*, 57, 506-511.
- Zhuang, H., Hildebrand, D.F. and Barth, M.M. (1995). Senescence of broccoli buds is related to changes in lipid peroxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 2585-2591.
- Zhuang, H., Hildebrand, D.F. and Barth, M.M. (1997). Temperature influenced lipid peroxidation and deterioration in broccoli buds during post-harvest storage. *Postharvest Biology and Technology*, 10, 49-58.
- Zude, M. (2003). Comparison of indices and multivariate models to non-destructively predict the fruit chlorophyll by means of visible spectrometry in apple fruit. *Analytica Chimica Acta*, 481, 119-126.

7.- PUBLICACIONES-COMUNICACIONES

7.- PUBLICACIONES-COMUNICACIONES

Además de los artículos publicados, o en vías de publicación, que se han generado de esta Tesis doctoral, parte de este trabajo ha sido presentando a diferentes congresos y reuniones científicas, cuyas publicaciones se detallan a continuación:

- Fernández-León, M.F., Fernández-León, A.M., Lozano, M., Ayuso, M.C., Bernalte, M.J., González, J.A. y González-Gómez, D. (2009). Influencia en los parámetros de calidad de brócoli ‘Parthenon’ almacenado en atmósfera controlada durante 21 días. *XXXIX Seminario de Técnicos y Especialistas en Horticultura (Tenerife)*. Comunicación oral.
- Fernández-León, M.F., Fernández-León, A.M., Lozano Ruiz, M., Ayuso Yuste, M.C., González, J.A. and González-Gómez, D. (2010). Antioxidant phytochemicals in Savoy Cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *sabauda* L.). *28th International Horticultural Congress (Lisbon)*. Póster. Pendiente de ser publicado en *Acta Horticulturae*.
- M.F. Fernández-León, A.M. Fernández-León, M. Lozano Ruiz, M.C. Ayuso Yuste, J.A. González García y D. González-Gómez (2011). Antioxidantes naturales y capacidad antioxidante en Brassicas. *Actas de Horticultura*, 58, 191-194.
- Fernández-León, M.F., Lozano, M., Ayuso, M.C. and González-Gómez, D. (2011). Simultaneous Determination of Eleven Intact Glucosinolates in Fresh and Controlled Atmospheres Stored Broccoli Plants by HPLC-MS/MS. *36th International Symposium on High-Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques (Budapest)*, P1-G, 250.
- María Fernanda Fernández-León, Ana María Fernández-León, Mercedes Lozano, M. Concepción Ayuso, David González-Gómez. (2011). *The 5th International Conference on Polyphenols and Health (Sitges)*, P114, pg 155.
- M.F. Fernández-León, A.M. Fernández-León, M. Lozano Ruiz, M.C. Ayuso Yuste y D. González-Gómez (2012). Identificación y cuantificación de glucosinolatos intactos en dos cultivares de brócoli cultivados en las Vegas Bajas del Guadiana (Extremadura). *Actas de Horticultura*, 60, 767-771.

