

UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE
ESCUELA POLITÉCNICA SUPERIOR DE ORIHUELA
GRADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS



“Efecto del almacenamiento y envasado sobre las características de calidad funcional del brócoli (*Brassica oleracea*, L.)”

TRABAJO FIN DE GRADO

Septiembre-2016

Autor: Cristina Cedeño Pinos

Tutor/es: Estefanía Valero Cases

María José Frutos Fernández

El trabajo fin de grado titulado “Efecto del estado de maduración, almacenamiento y envasado sobre las características de calidad funcional del brócoli (*Brassica oleracea*, L.)” se ha realizado en el marco del proyecto de investigación RTA-2012-00062-C04-04 “Evaluación de parámetros de calidad y seguridad de la producción agroalimentaria para su estimación mediante técnicas ópticas no destructivas durante su procesado y manipulación (ANA-DACSA), financiado por el Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) que cuenta con la cofinanciación con fondos FEDER y que se realiza en el Departamento de Tecnología Agroalimentaria de la Universidad Miguel Hernández de Elche en el periodo 2013-2016.2.



RESUMEN

El objetivo del presente trabajo consistió en evaluar el efecto del envasado con film de polietileno y del almacenamiento refrigerado sobre la calidad funcional del brócoli durante 21 días a 0 °C. Para ello se determinaron los niveles de capacidad antioxidante aplicando tres métodos: ABTS, FRAP y DPPH así como el contenido en polifenoles totales, β -caroteno, clorofila. Los resultados en las muestras envasadas y no envasadas mostraron un aumento del contenido de polifenoles totales, β -caroteno y clorofila durante la primera semana de almacenamiento, siendo superior en los brócolis envasados. Sin embargo, al final de periodo de almacenamiento, los brócolis sin envasar presentaron concentraciones superiores en polifenoles totales y β -caroteno a los registrados el primer día de almacenamiento, siendo el contenido en clorofila menor. Los valores obtenidos en las muestras envasadas permanecieron sin diferencias significativas respecto al primer día de almacenamiento. En ambas muestras se observó una elevada correlación de polifenoles y carotenos con a la capacidad antioxidante ($r \geq 0.8$).

Palabras clave: capacidad antioxidante, Polifenoles, clorofila, β -caroteno

ABSTRAT

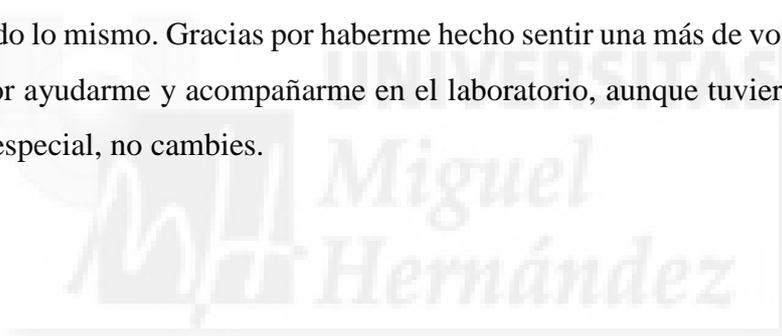
The aim of the work was the evaluation of the polyethylene packaging and refrigerated storage on the functional quality of brócoli during 21 days at 0°C. The antioxidant capacity was measured using three different methods: ABTS, FRAP and DPPH, together with the amount of polyphenols, β -carotene and chlorophyll. The results in the packaged and control samples showed an increase in polyphenols, β -carotene, and chlorophyll during the first week of storage. However, at the end of the storage period, the unpackaged brócoli presented higher concentration of polyphenols and β -carotene respect to the first day of storage, but with lower chlorophyll contents. In packaged samples the values did not change during the storage. In both samples a high correlation between polyphenols and carotenoids with the antioxidant capacity ($r \geq 0.8$).

Keywords: antioxidant capacity, polyphenols, chlorophyll, β -carotene

En primer lugar quiero agradecer a mi familia, especialmente a mi esposo Diego y a mi hijo Sebastián, por el apoyo incondicional que me han brindado para alcanzar mi meta. Gracias por estar allí siempre, por escucharme y animarme cuando lo necesitaba y por creer en mí incluso cuando yo no lo hacía, os amo. A mi madre Piedad, que a pesar de la distancia que nos separa me cobija con su amor y me calma.

Gracias al departamento de Tecnología Agroalimentaria, y en especial a la Directora de este trabajo, Estefanía Valero Cases por su apoyo, por dedicar parte de su tiempo para enseñarme y guiarme, tanto en clases, como durante el tiempo que ha durado este trabajo. También quiero agradecer a la Dra. María José Frutos, por estar siempre dispuesta a ayudar en todo momento.

A mis compañeras de clase, deciros que sin vosotras mi paso por la universidad no hubiera sido lo mismo. Gracias por haberme hecho sentir una más de vosotras. Gracias a Nereida, por ayudarme y acompañarme en el laboratorio, aunque tuvieras un examen; eres única y especial, no cambies.



ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	9
1.1 Generalidades del brócoli	9
1.2 EL BRÓCOLI	11
1.2.1 Origen e Historia	11
1.3 Descripción botánica y clasificación taxonómica	11
1.4 Fases del cultivo y requerimientos	13
1.5 IMPORTANCIA ECONÓMICA	14
1.5.1 Producción mundial	14
1.5.2 Producción en la Unión Europea	15
1.5.3 Producción en España	16
1.6 PARÁMETROS DE CALIDAD DEL BRÓCOLI	17
1.7 PROPIEDADES NUTRITIVAS	21
1.8 PARÁMETROS DE CALIDAD FUNCIONAL	22
1.9 DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FUNCIONALES	22
1.9.1 Compuestos Fenólicos	22
1.9.2 Carotenos	24
1.9.3 Clorofila	25
1.9.4 Métodos para medir la capacidad antioxidante	26
2. OBJETIVOS	28
3. MATERIALES Y MÉTODOS	30
3.1 PLANIFICACIÓN DEL DISEÑO EXPERIMENTAL	30
3.2 MATERIAL VEGETAL Y TRATAMIENTO	31
3.3 DETERMINACIONES ANALÍTICAS	32
3.3.1 Parámetros funcionales	32
3.4 EXTRACCIONES	33
3.4.1 Extracciones para Polifenoles y capacidad antioxidante	33
3.4.2 Extracción para carotenos	33
3.5 DETERMINACIONES DE COMPUESTOS BIOACTIVOS	33
3.5.1 Contenido de Polifenoles Totales	33
3.5.2 Actividad Antioxidante	35
3.5.3 β-caroteno	36

3.5.4 Clorofila total	36
3.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	37
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	39
4.1 Polifenoles Totales	39
4.2 β-Carotenos	40
4.3 Clorofila	42
4.4 Actividad Antioxidante	43
5. CONCLUSIONES	47
BIBLIOGRAFÍA	49





1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1 GENERALIDADES

Hoy en día el consumidor demanda cada vez más productos con mayor calidad sensorial, nutricional y funcional. Es decir, se busca que el alimento realice las funciones nutricionales básicas, y además que con su ingesta se pueda conseguir beneficios para la salud e incluso poder prevenir enfermedades (Fernández-León., 2012). Diversos estudios científicos han demostrado que el consumo de alimentos vegetales ricos en fotoquímicos es uno de los factores cruciales para conseguir un estado de salud óptimo , mediante la prevención de varias enfermedades como el cáncer, la inflamación, las enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas (enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson y cataratas) y la depresión (Khalaj et al., 2013).

El Código Alimentario Español (CAE., 2012) 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)”. Las hortalizas tienen una gran diversidad estructural y por lo tanto, constituyen una importante fuente de sustancias con alto potencial biológico (Bachiega, 2016). Desde el punto de vista químico, las hortalizas son productos ricos en agua, pobres en carbohidratos, proteínas y lípidos, por lo que son alimentos con escaso aporte energético. Sin embargo, tienen gran interés por su contenido en micronutrientes: vitaminas y minerales (Moreno et al., 2006; Torija y Cámara, 1999; Belitz y Grosch, 1997).

Entre los vegetales más demandados en la actualidad destacan los de la familia de las Brasicáceas (*Brassicaceae*) o crucíferas (*Cruciferae*), por sus efectos beneficiosos para la salud, debido fundamentalmente a su gran contenido en compuestos funcionales como vitamina C, carotenoides, clorofilas, compuestos fenólicos y glucosinolatos (Moreno, et al., 2006). Esta familia de angiospermas dicotiledóneas se caracteriza por su

gran complejidad botánica (Nuez et al., 1999), e incluye diversas especies de gran interés agrícola, destacando la especie *Brassica oleracea*. L (Figura 1).

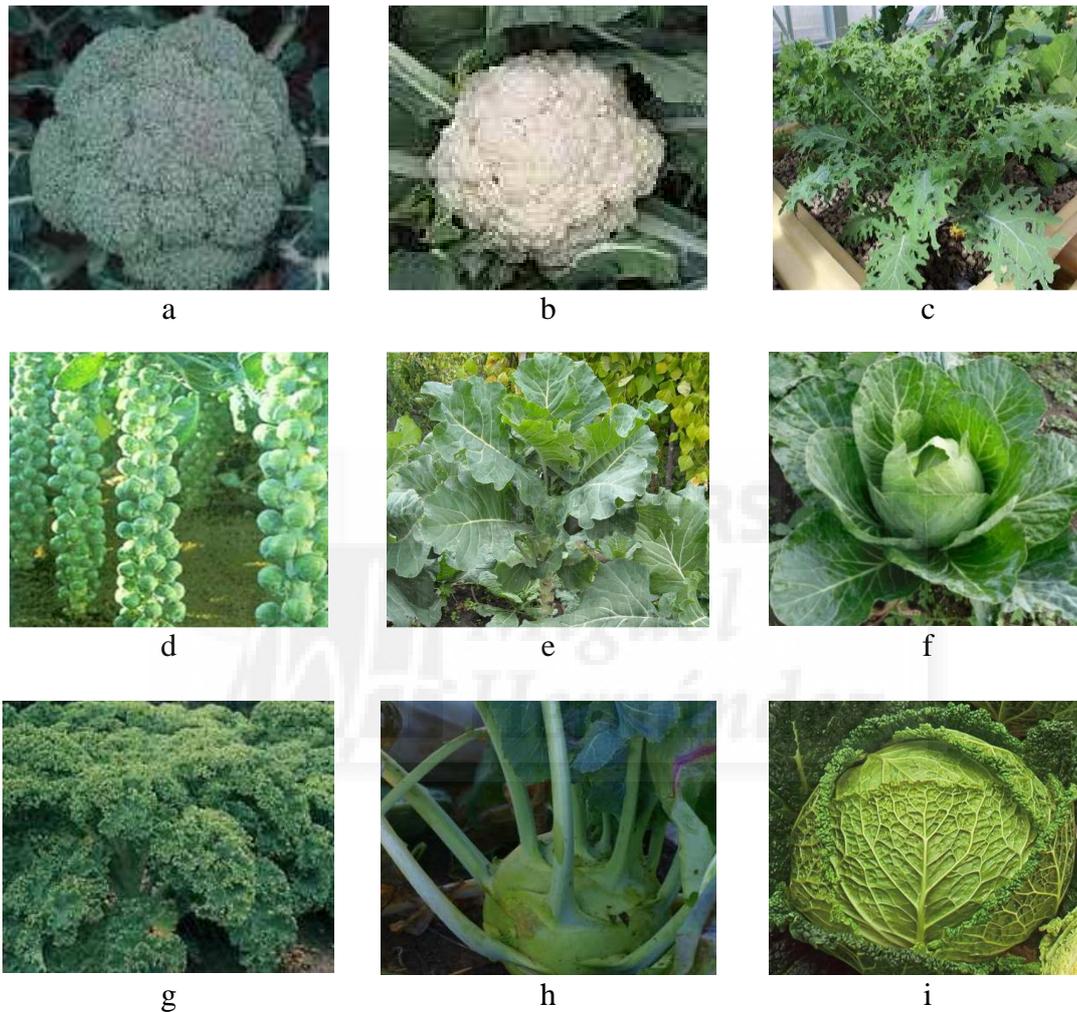


Figura 1.1. Distintas formas de *Brassica oleracea*: a) Brócoli (*B. oleracea* ssp. *Italica* L.). b) Coliflor (*B. oleracea* ssp. *botrytis* L.). c) Kale chino (*B. oleracea* var. *alboglabra*). d) Repollos de Bruselas (*B. oleracea* ssp. *gemmifera* DC). e) Repollo salvaje (*B. oleracea* var. *silvestris*). f) Repollo (*B. oleracea* ssp. *capitata* L.). g) Kale rizado (*B. oleracea* var. *sabelica*). h) Kohlrabi o colirrábano (*B. oleracea* var. *Gongylodes*). i) Repollo savoy (*B. oleracea* var. *sabauda*). (Hasperué, 2012.)

Como resultado de la selección, dentro de *B. oleracea* se encuentran seis vegetales distintos, conocidos colectivamente como coles. Incluyen la coliflor (*B. oleracea* ssp. *botrytis* L.) y el brócoli (*B. oleracea* ssp. *italica* L.), con la inflorescencia más elevada

que la primera, kohlrabi o colirrábano (*B. oleracea* ssp. *gongylodes* L.) con el tallo engrosado, kale (*B. oleracea* ssp. *medullosa* Thell.) cuyas hojas centrales no forman una cabeza, repollo (*B. oleracea* ssp. *capitata* L.) con las hojas alargadas y retorcidas recubriendo la yema apical, y repollo de Bruselas (*B. oleracea* ssp. *gemmifera* DC) con numerosos brotes de yemas laterales.

1.2 EL BRÓCOLI

1.2.1 Origen e historia.

El origen del brócoli se asienta a los países con climas templados a orilla del Mediterráneo oriental, en Oriente Próximo (Asia Menor, Líbano, Siria). Hace unos 2500 años, la Península de Anatolia, Líbano y Siria acogieron los primeros ejemplares de esta planta, provenientes de una especie silvestre común con las coles y coliflores, y fue donde se comenzó a seleccionar por características especiales (Babula, et al., 2007).

Durante la época de dominio del Imperio Romano, esta hortaliza llegaría hasta la península Itálica donde fue cultivada para su consumo, llegando a ser muy popular en el país transalpino. Pero hasta mediados del siglo XX, su cultivo no fue destinado a la producción en toda Europa.

1.3 Descripción botánica y clasificación taxonómica.

El brócoli (*Brassica oleracea* L. spp *Italica*) también conocido como brócoli, brécol, broquil (Figura 2), pertenece a la familia *Brassicaceae*, anteriormente denominada *Cruciferae* (Crucíferas) (Tabla 1), debido a la forma de las flores, con 4 pétalos diagonalmente opuestos en forma de una cruz; al igual que la col, las coles de Bruselas, la coliflor, rúcula, los rábanos, etc.

El nombre de “*brócoli*” procede del latín “*brachium*” que significa “rama” y hace referencia a la forma ramificada de sus cabezuelas florales. Es muy parecida a la coliflor, pero generalmente es de color verde y presenta pedúnculos florales menos compactos, conformando un ramillete o pella.

Tabla 1.1 Clasificación taxonómica

Subdivisión:	Angiospermas
Clase:	Dicotiledónea
Orden:	Brasicales
Familia:	Brasicáceas
Género:	Brassica
Especie:	Oleracea
Variedad:	Italica
Nombre trinomial:	<i>Brassica oleracea</i> L. var. Italica

Fuente: *Hasperué, 2012*

La raíz del brócoli es pivotante con raíces secundarias y superficiales. Esta planta posee abundantes floretes carnosos, dispuestos en forma de árbol, sobre las ramas que nacen de un grueso tallo comestible. La unión de los floretes da lugar a la formación de la pella, que se encuentra rodeada de hojas. Las hojas del brócoli permanecen erguidas y son onduladas con peciolos alargados, limbo foliar lobulado de color verde grisáceo, y con lóbulos profundos, así como nervaduras marcadas, blancas. Las pellas de brócoli son verdes, su tamaño es menor que en las coles o coliflores y con la superficie más granulada. Constituyen conglomerados parciales más o menos cónicos que suelen terminar en este tipo de formación en el ápice y en bastantes casos muy marcada. La pella del brócoli se puede llegar a desarrollar hasta 20 centímetros de diámetro, y alcanzar 2 kg. Las flores del brócoli son pequeñas, de color amarillo y en forma de cruz. El fruto es una silicua de valvas ligeramente convexas con un único nervio longitudinal. Produce abundantes semillas redondas y de color rosáceo. (Figura 1.2). (Rodríguez, 2013)

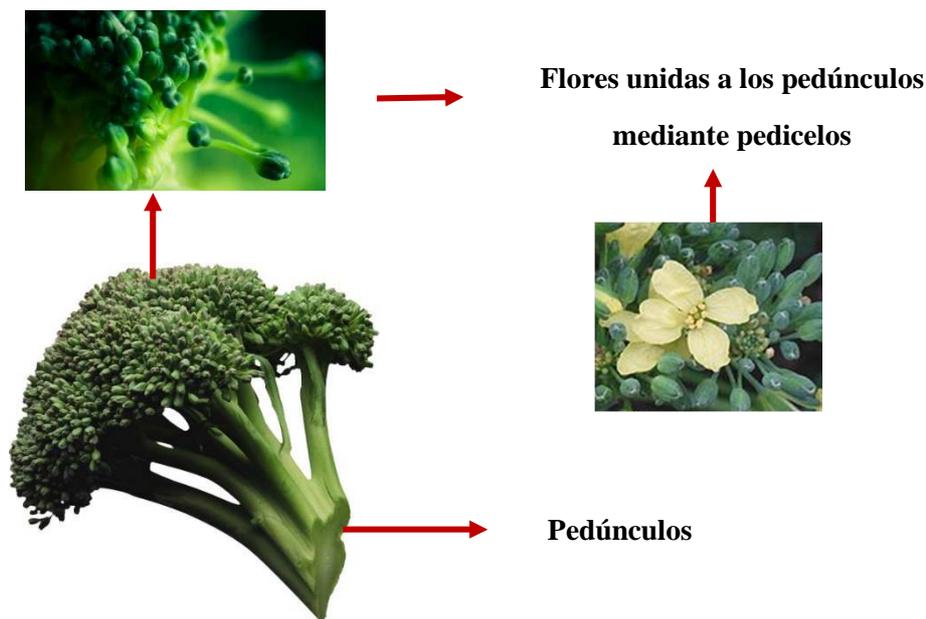


Figura 1.2. Brócoli (*Brassica oleracea* var. Italica).

1.4 Fases y requerimientos del cultivo

En el desarrollo del brócoli se pueden considerar las siguientes fases:

- **De crecimiento:** la planta desarrolla solamente hojas.
- **De inducción floral:** el brócoli se cultiva principalmente durante las estaciones de otoño e invierno debido a la necesidad de temperaturas entre 10 y 17 °C, para inducir la floración, pero siguen brotando hojas de tamaño más pequeño que en la fase de crecimiento (Jiang, et al., 2011).
- **De formación de pellas:** se desarrolla una pella en la yema terminal de la planta y, al mismo tiempo, en las yemas axilares de las hojas comienza la fase de inducción floral con la formación de nuevas pellas, que serán bastante más pequeñas que la pella principal (Hasperué, 2012).
- **De floración:** los tallos que sustentan las partes de la pella inician un crecimiento en longitud, con apertura de las flores.
- **De fructificación:** se forman los frutos (silicuas) y semillas.

El cultivo del brócoli requiere menos riego que otros vegetales, ya que se produce durante la temporada lluviosa del año, lo cual es particularmente importante en zonas con recursos hídricos limitados. Por tanto, la resistencia del cultivo a temperaturas relativamente bajas y a la sequía, así como a la salinidad, convierte al brócoli en una hortaliza de gran interés científico y socio-económico (Rodríguez, 2013).

1.5 IMPORTANCIA ECONÓMICA

La demanda de este producto se ha incrementado en los últimos años, principalmente por su gran cantidad de atributos nutritivos con potentes propiedades anti-cancerígenas. Es sin duda el continente asiático el mayor productor, situándose con el 82,7% de la producción mundial (Figura 1.3)

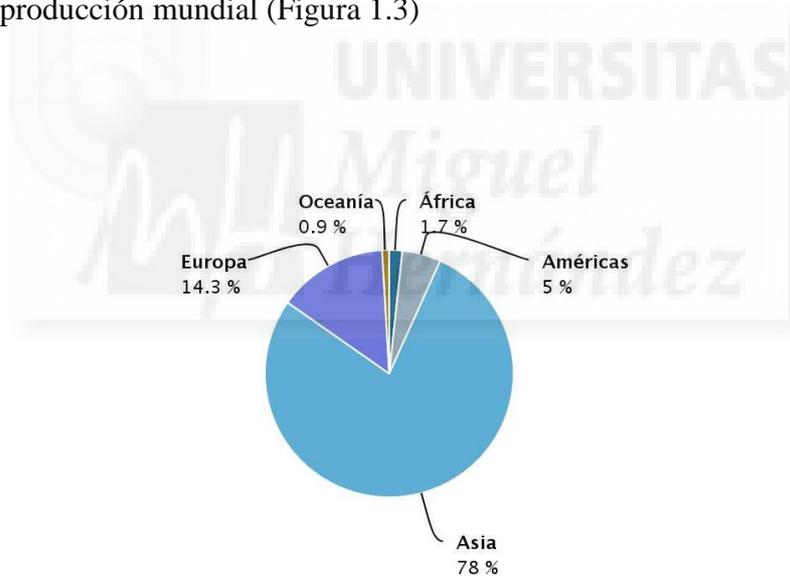


Figura 1.3. Producción de brócoli por continentes.

Fuente: FAO, 2013

1.5.1 Producción Mundial

Debido al incremento en la demanda mundial por sus grandes e interesantes propiedades, la producción del brócoli, entre el año 2000 al 2013, registró un crecimiento del 48 %, pasando de 15 millones de toneladas producidas en el año 2000 a 22,23 millones

de toneladas en el 2013; presentando así, una tendencia positiva en este periodo de tiempo (FAO, 2013). España es uno de los principales productores de coliflor y brócoli en todo el mundo, ocupando el tercer puesto por detrás de China e India. Los dos primeros países lideraron la producción, sumando entre ellos más del 76 % de la producción mundial (Figura 1.4) (FAO, 2013).

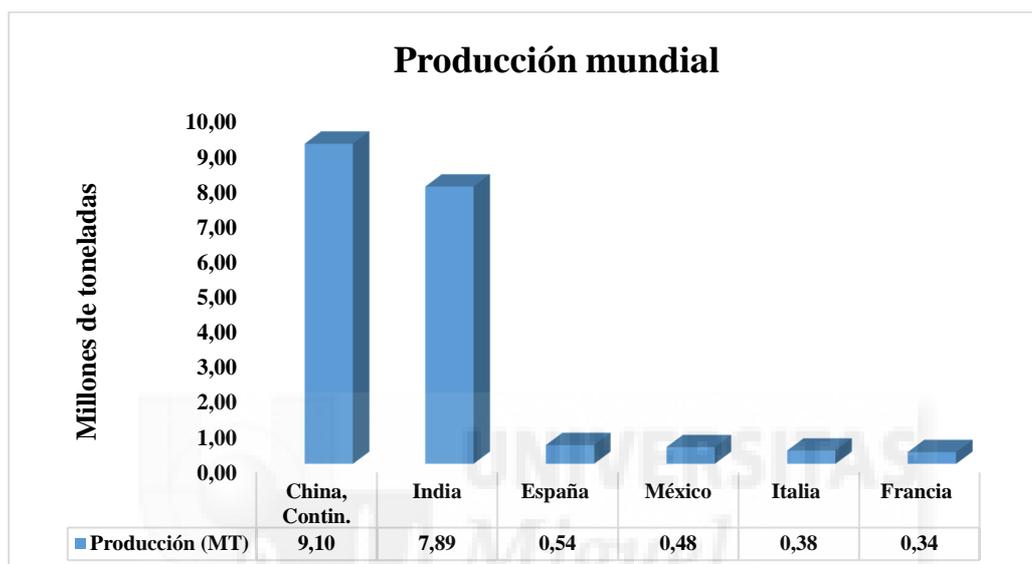


Figura 1.4. Producción de Coliflor y brócoli en el mundo.

Fuente: FAO, 2013 (Elaboración propia)

1.5.2 Producción en la Unión Europea

En la actualidad, su cultivo se extiende por Europa, siendo España el mayor productor, con casi 541 000 toneladas en 2013 (Figura 1.5), seguida muy de cerca por Italia y Francia (FAO, 2013).

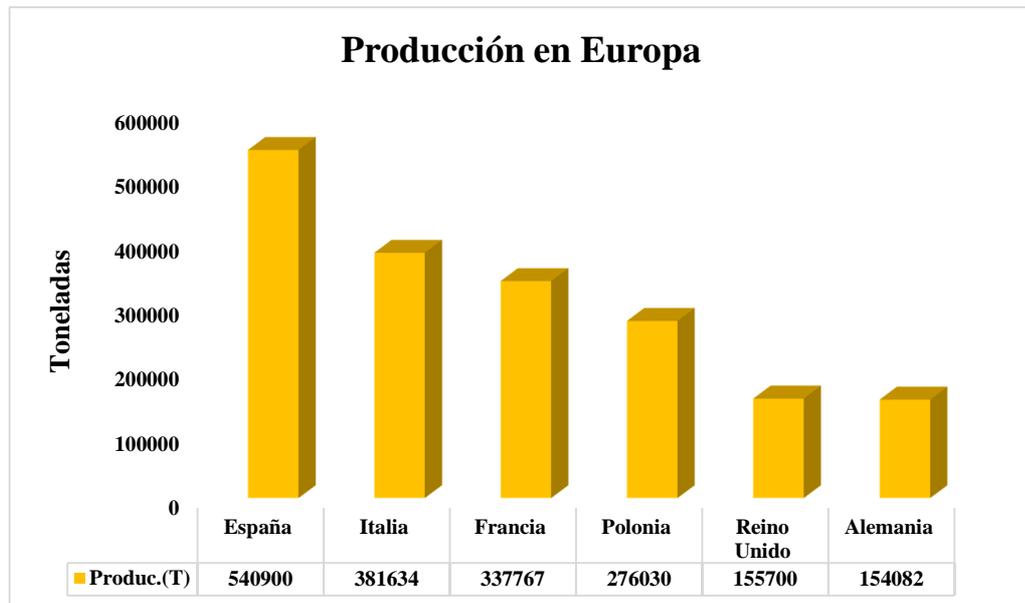


Figura 1.5. Producción de coliflor y brócoli en la Unión Europea.

Fuente: FAO, 2013 (Elaboración propia)

1.5.3 Producción en España

En los últimos años el brócoli es el cultivo hortícola que más ha crecido en España, pasando de ser un desconocido a ser la hortaliza con una mayor tasa de crecimiento. La gran mayoría de la producción de brócoli se destina a la exportación, siendo todavía muy bajo su consumo interno.

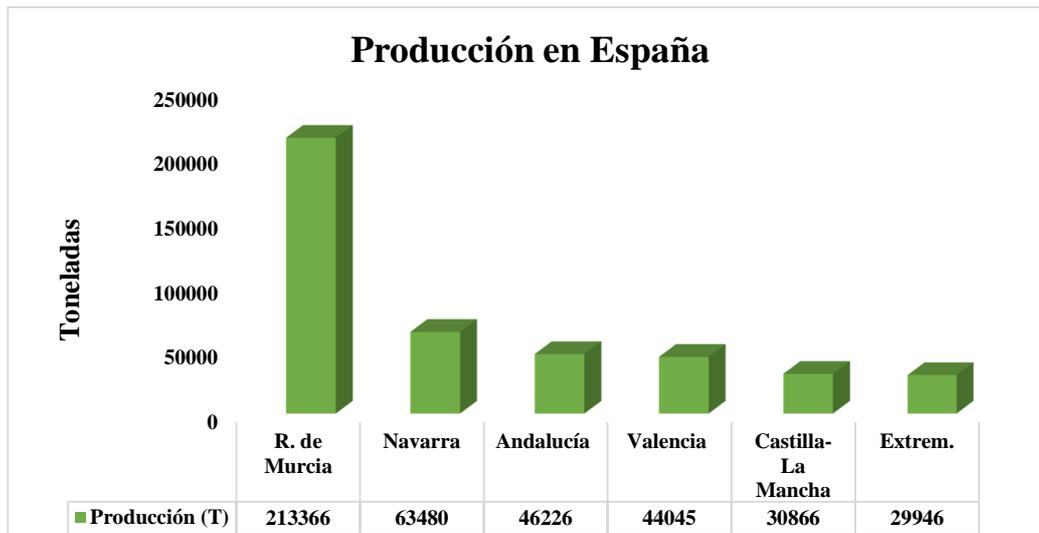


Figura 1.6. Producción de brócoli en España. Fuente: MAGRAMA, 2014

(Elaboración propia)

En nuestro país el cultivo de brócoli adquiere especial importancia en la zona levantina y sureste español, desde donde se distribuye al resto de la península y al extranjero. El clima templado mediterráneo resulta óptimo para su cultivo, y en la actualidad, con la introducción de nuevas variedades, se persigue poder producir brócoli todo el año.

La Región de Murcia es la principal zona productora de España, con 213366 toneladas en 2014 (Figura 1.6), de las cuales se exporta alrededor del 90 %, principalmente a Europa. En concreto, el Valle del Guadalentín centraliza la parte más importante de la producción, comercialización y envasado de brócoli de España.

1.6 PARÁMETROS DE CALIDAD DEL BRÓCOLI

Cuando hablamos de productos hortofrutícolas, este concepto está relacionado con el grado de excelencia y ausencia de defectos de un producto fresco, lo cual implica una serie de atributos sensoriales (apariencia, color, firmeza, sabor y aroma) nutritivos

y funcionales como vitaminas (C y E), carotenoides y compuestos fenólicos (Abbott, 1999).

El brócoli (*Brassica oleracea* L. ssp. *Italica*) es un vegetal muy popular debido a su color verde y alto valor de los nutrientes. Se ha sugerido que el brócoli es rico en proteínas, vitaminas, compuestos fenólicos, glucosinolatos y sulforafano, que son mucho más alto que otras verduras verdes (Martínez-Villaluenga, et al., 2008).

Para el brócoli los índices de calidad 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 y de color oscuro-brillante, la pella o cabeza debe ser regular y compacta (firme a la presión de la mano). El tallo bien cortado y de la longitud requerida (Fernández-León, 2012). Además, no debe tener ningún florete amarillo ni tonalidades pardas en las partes del tallo (Cantwell y Suslow, 2005), con ausencia de tronco o tallo hueco. El color amarillo de verduras de color verde durante el almacenamiento se considera normalmente, ser las principales consecuencias de la degradación de la clorofila (Jin, et al., 2015). El color verde de brócoli es un factor importante en la calidad comercial, su pérdida refleja su deterioro. El principal problema en el brócoli que se almacena a temperatura ambiente es la senescencia y rápido amarillamiento, lo que reduce su calidad comercial (Jia, et al., 2009).

Las pérdidas en calidad y cantidad entre la cosecha y el consumo pueden oscilar entre el 5 y el 25% en países desarrollados, y entre el 20 y el 50% en países en desarrollo, dependiendo del producto, la variedad y las condiciones de manejo (Kader, 2007). Para reducir estas pérdidas, se debe tener en cuenta que los factores biológicos y ambientales unidos a las desigualdades morfológicas (raíces, tallos, hojas, frutos, etc.) son los responsables de la senescencia de los productos hortofrutícolas en post-cosecha.

Durante el almacenamiento, los productos hortofrutícolas continúan respirando, consumiendo nutrientes y obteniendo la energía necesaria para su metabolismo. Además, también continúan respirando, por lo tanto, pierden agua rápidamente y se deshidratan, originando pérdidas en la apariencia, en la calidad de la textura, así como en su valor nutricional (Cappellini y Ceponis, 1984).

El etileno juega también un papel muy importante, ya que es una fitohormona que regula muchos aspectos del crecimiento, desarrollo y senescencia. El brócoli posee muy baja producción (menos de $0.1 \mu\text{L}/\text{kg} \times \text{h}$ a 20°C), pero es muy sensible a (menos de 0.1 ppm), siendo el amarillamiento de los floretes el síntoma más común del contacto con etileno (Lipton, 1987). Además, están los cambios que se producen en la pigmentación, cambios en carbohidratos, degradación de pectina, incremento del contenido de lignina, cambios en los ácidos orgánicos, proteínas, aminoácidos y lípidos que pueden influir en la calidad durante la postcosecha (Fernández-León, 2012). El desarrollo y evolución de los compuestos fenólicos, evolución de los carotenoides, algunos son precursores de la vitamina A. Los niveles de glucosinolatos también disminuyen durante el almacenamiento y por tanto, su pérdida afectaría la calidad, valor nutricional y funcional de los productos (Dixon, 2001; Jones, et al., 2006).

Varias técnicas han sido ampliamente investigados para extender la vida útil y mejorar la calidad visual o nutricional en el brócoli, tales como el uso de envases de atmósferas modificadas, 1-metilciclopropeno (1-MCP), irradiación UV-C, el tratamiento 6-bencilaminopurina, aplicación de ceras y otras cubiertas superficiales o envolturas de plástico, o por el control del medio ambiente en el almacenamiento, como por ejemplo, mantener una humedad relativa alta y controlar la circulación del aire, entre otras (Costa, 2006; Xu, et al, 2012; Yuan, et al., 2010; Kader, 1992).

Dentro de las técnicas para conservar la vida útil del brócoli está el almacenamiento en frío, es una de las más importantes en el mantenimiento de la calidad de frutas y hortalizas. El efecto de las bajas temperaturas ralentiza el metabolismo post-cosecha de frutas y hortalizas, disminuye la transpiración, reduce la incidencia de podredumbres debidas a patógenos y aumenta la resistencia a daños mecánicos. Por otra parte, disminuye también la síntesis de etileno y más aún, baja la sensibilidad de los tejidos vegetales a esta hormona (Wills, et al., 2001; Génard y Gouble, 2005). El frío también protege atributos de calidad como la textura, la calidad nutricional, aroma y sabor (Paull, 1999). No obstante, la temperatura de almacenamiento difiere incluso entre variedades del mismo producto (Collins y Tisdell, 1995; Miccolis y Saltveit, 1995). La temperatura óptima de almacenamiento para el brócoli está entre 0 y 5°C , pudiéndose almacenar así durante unos 14 días (Cantwell y Suslow, 2005).

Así mismo, King y Morris (1994) demostraron que el brócoli es muy perecedero, y tiene una capacidad de almacenamiento máxima de tres días a 20 °C. La atmósfera modificada (AM), se define como el envasado de un producto perecedero en una atmósfera que ha sido modificada logrando una composición diferente a la del aire (Al-Ati y Hotchkiss, 2003). Se diferencia de las atmósferas controladas (AC) en que en éstas últimas la composición del gas que rodea el producto (N_2 , O_2 y CO_2 principalmente) es mantenido en un valor fijo mediante monitoreo y adición de gases, mientras que en AM la composición de la atmósfera de almacenamiento no está estrictamente controlada (Rodríguez-Aguilera y Oliveira, 2009). La atmósfera dentro del envase se puede modificar pasivamente por la respiración del producto y la permeabilidad selectiva a los gases del film que lo rodea.

La variación en el cambio y la composición final de los gases en el envase depende tanto del producto como de la permeabilidad del material de envasado. Esta técnica de AM tiene la desventaja de que puede requerir un período largo de tiempo de almacenamiento para alcanzar la composición óptima del gas, lo que puede acarrear problemas importantes en productos con vida útil relativamente corta. Para superar ese problema puede realizarse una modificación activa de la atmósfera, generando un vacío e inyectando la mezcla de gas deseada en el envase. La desventaja de la AM activa respecto de la AM pasiva son los altos costos en equipos y gases. Por su efectividad en el mantenimiento de los atributos de calidad del producto y sus menores costos, el empleo de las atmósferas modificadas ha crecido en las últimas décadas (Türk y Özçurt, 1994; Rojas-Graü, et al., 2009).

Cantwell y Suslow (2005) manifestaron que la vida útil del brócoli pueda verse favorecida en atmósferas que contengan 1-2% O_2 con 5-10% CO_2 en un intervalo de temperatura de 0-5 °C. Las fluctuaciones de temperatura durante el manejo comercial hacen que las concentraciones de O_2 y CO_2 no sean las idóneas y pueden llegar a provocar el desarrollo de compuestos volátiles azufrados de olor desagradable. Para evitarlo, se recomienda un recambio de aire en los contenedores en los que se transporta o almacena el brócoli. La mayoría de los envases con atmósfera modificada para brócoli están diseñados para mantener concentraciones de 3-10% para O_2 y de 5-10% para CO_2 , concentraciones que evitarían el desarrollo de estos volátiles de olores indeseables.

1.7 PROPIEDADES NUTRITIVAS

El brócoli es una fuente rica de vitaminas A, C, E, B1, K y folatos (Moreno, et al., 2006) que confieren propiedades antioxidantes y colaboran en la formación de glóbulos rojos y blancos. Por estas y otras propiedades, el brócoli es un reconocido vegetal promotor de la salud, conocido como la hortaliza con mayor valor nutritivo en relación al porcentaje de peso de producto comestible (Pascual, 1994). Está compuesto principalmente por agua y tiene un alto contenido en fibra (Tabla 1.2), por esta razón, el aporte de calorías a nuestro organismo tras su ingesta es mínimo, por lo que se recomienda en dietas de control de peso.

Además de los componentes mayoritarios, entre los minerales del brócoli destaca el potasio, aunque cuenta también con cantidades específicas de calcio, zinc, yodo, hierro y magnesio (Rodríguez, 2013).

Tabla 1.2: Composición g/kg de peso seco (a excepción de la humedad) de inflorescencias de brócoli.

Humedad	907 ± 2.7
Proteínas	226 ± 8.7
Lípidos	27 ± 0.2
Ceniza	110 ± 2.3
Los hidratos de carbono	125 ± 0.0
Fibra insoluble	508 ± 0.2
Fibra soluble	4 ± 0.0
Fibra total	512 ± 2.2

Fuente: Ramos dos Reis, 2015

1.8 PARÁMETROS DE CALIDAD FUNCIONAL

Diversos estudios han confirmado que un consumo habitual de hortalizas de la familia de las *Brassicas* contribuye a la disminución del riesgo de padecer diferentes tipos de cáncer (Vallejo, et al., 2002). Entre los compuestos biológicamente activos del brócoli cabe destacar a los glucosinolatos (Finley et al., 2001; Keck y Finley, 2004) y los compuestos fenólicos (flavonoides y ácidos hidroxicinámicos) (Podsdek, 2007), además de otros nutrientes como carotenoides (López-Berenguer, et al., 2009), fibra y elementos minerales esenciales para la salud (Moreno, et al., 2006). Además poseen vitamina C y clorofilas, cuya actividad es sinérgica y actúan reduciendo el nivel de las especies reactivas de oxígeno (Podsdek, 2007). Son por tanto, compuestos con actividad antioxidante.

Cabe resaltar que el tipo de cultivar, las condiciones de cultivo, el estado de maduración y cosecha, así como las condiciones post-cosecha influyen en la variación del contenido de compuestos funcionales, así como de la capacidad antioxidante de las *Brassicas* (Jeffery, et al., 2003; Vallejo et al., 2002).

1.9 DETERMINACIONES DE COMPUESTOS FUNCIONALES

Es recomendable determinar el potencial antioxidante durante la vida útil para poder terminar la disminución de la calidad funcional y la protección frente a la oxidación.

1.9.1 Compuestos fenólicos: Son unos de los principales metabolitos secundarios de las plantas, biosintetizados en las plantas, en las que desarrollan diversas funciones, como la protección frente a condiciones externas (Buchanan, et al., 2000). 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) (Androtopoulos, et al., 2010). Algunos de ellos han mostrado propiedades saludables (Prasain, et al., 2010). Los compuestos fenólicos, especialmente los flavonoides, poseen diferente actividad biológica, pero las más importantes son la actividad antioxidante y el efecto inhibidor de varias clases de tumores (Czeczot, 2000).

Se piensa que pueden contribuir a la prevención de enfermedades cardiovasculares, cáncer, osteoporosis, así como en la prevención de enfermedades neurodegenerativas y de diabetes mellitus, aunque el mecanismo de actuación no se ha esclarecido (Scalbert, et al., 2005; Halliwell, et al., 2008).

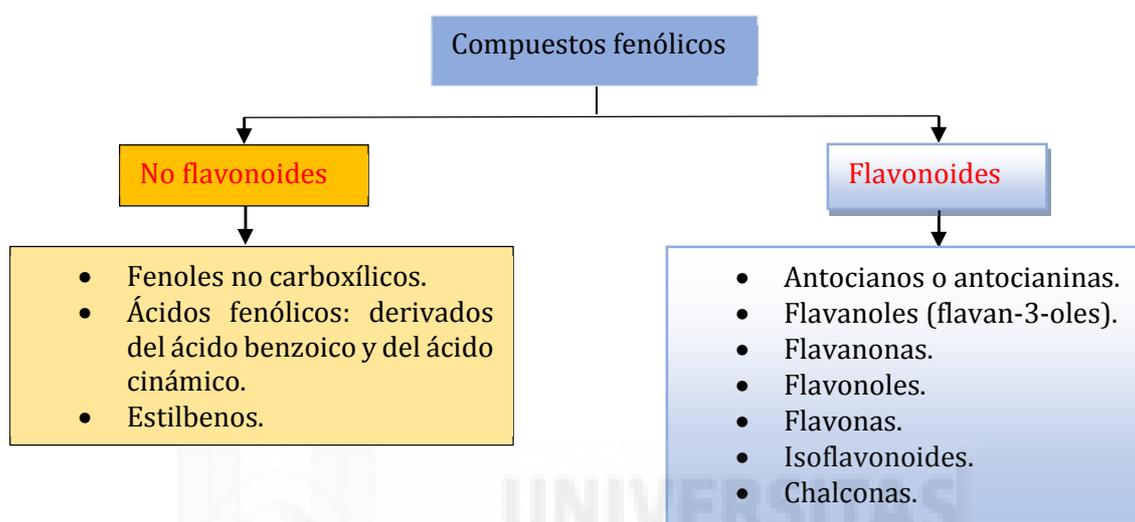


Figura 1.7. Clasificación de los compuestos fenólicos, según su estructura química.
(Adaptado de Gimeno, 2004)

Uno de los métodos para medir el contenido en polifenoles es el ensayo de Folin-Ciocalteu (Singleton, et al., 1999), se basa en la transferencia de electrones desde compuestos fenólicos hacia complejos de ácidos fosfomolibdicos/fosfotúngsticos, que al reducirse generan un compuesto coloreado que se cuantifica espectrofotométricamente a 760 nm. La reacción ocurre en un medio alcalino para facilitar la extracción de un electrón del fenolato. Aunque la reacción de transferencia de electrones no es específica de los compuestos fenólicos, el proceso de extracción desde el tejido elimina el 85% del ácido ascórbico y otros compuestos que causan interferencias. 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, de manera que a mayor coloración azul mayor es la concentración de los fenoles (Hasperué, 2012).

1.9.2 Carotenoides: Pertenecen a la familia de los terpenos, se encuentran presentes en muchas frutas y verduras como pigmentos de color amarillo, naranja y rojo. Algunos carotenoides son precursores de la vitamina A y por tanto, su pérdida afectaría al valor nutricional y funcional del producto (Podsdek, 2007). Los carotenoides también intervienen especialmente en la protección contra la foto-oxidación, ya que en su estructura química poseen dobles enlaces conjugados, 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 y del oxígeno singlete (Van den Berg, et al., 2000).

En el género *Brassica*, el β -caroteno y la luteína, son los principales carotenoides. Como todos los carotenoides, forman parte de la fracción lipídica de los sistemas biológicos, protegiendo a las membranas de los radicales libres (Fernández-León, 2013). 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).

Las concentraciones de β -caroteno en los alimentos, se pueden determinar mediante la Ley de Lambert Beer. Esta ley expresada en relación entre la absorbancia de luz monocromática (de longitud de onda fija) y la concentración de un cromóforo en solución. La absorbancia de una solución es directamente proporcional a su concentración: a mayor número de moléculas mayor interacción de la luz con ellas, también depende de la distancia que recorre la luz por la solución a igual concentración, cuanto mayor distancia recorre la luz por la muestra, más moléculas se encontrarán y por último depende de ϵ , una constante de proporcionalidad (coeficiente de extinción), que es específica de cada cromóforo. Como A es adimensional, las dimensiones de ϵ , dependen de las de c (concentración) y e (espesor de la cubeta). La segunda magnitud (e), se expresa siempre en cm, mientras que la primera (c) se hace siempre en M, con lo que las dimensiones de ϵ resultan ser $M^{-1} * cm^{-1}$. Este coeficiente así expresado, se denomina coeficiente de extinción molar (ϵM).

1.9.3 Clorofila: La clorofila es una biomolécula extremadamente importante en la fotosíntesis, proceso que permite a las plantas absorber energía a partir de la luz solar. Los dos tipos principales de clorofilas son la clorofila A y la clorofila B, que difieren solamente en la presencia de un grupo metilo (clorofila A) o un grupo formilo (clorofila B) en el anillo II. Las clorofilas son compuestos altamente fotoactivos que deben permanecer en un entorno tilacoidal adecuado para no diseminar desorganizadamente la energía que absorben de la luz. Durante la senescencia se produce el desmantelamiento y desestructuración de las membranas tilacoidales, que liberan la clorofila. Teniendo en cuenta que el metabolismo se reorienta hacia el reciclado de nutrientes, es esencial que el tejido se mantenga vital. Por lo tanto, la clorofila debe ser rápidamente degradada para evitar que dañe irreversiblemente las estructuras residuales (Matile, et al., 1999).

La senescencia que sufren los vegetales verdes después de la recolección, así como la marchitez de las hojas está correlacionada con la descomposición de las clorofilas (Deschene, et al., 1991; Zhuang, et al., 1995). Hasperué, (2012) encontró además diferencias en la coloración superficial en brócolis cosechados en diferentes momentos del día. Lai et al. (1980) demostraron que existía una relación entre la actividad antimutagénica, antioxidante y el contenido en clorofilas en varios extractos vegetales (cebollas, melocotones, uvas, frambuesas).

La espectrofotometría UV-visible es una técnica analítica que permite determinar la concentración de un compuesto en solución. Se basa en que las moléculas absorben las radiaciones electromagnéticas y a su vez que la cantidad de luz absorbida depende de forma lineal de la concentración. Para hacer este tipo de medidas se emplea un espectrofotómetro, en el que se puede seleccionar la longitud de onda de la luz que pasa por una solución y medir la cantidad de luz absorbida por la misma, entre ellos está el método colorímetro de (Singh, 1977), modificado por (Nath, et al., 2011).

1.9.4 Métodos para medir la capacidad antioxidante

Estudios científicos han llegado a la conclusión que el uso de un solo método para medir la capacidad antioxidante en alimentos, no es recomendable, puesto que el uso de varios métodos puede arrojar resultados diferentes como los que se detallan a continuación (Heo, et al., 2007; Robles-Sanchez, et al., 2009).

El método radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, también conocido como (DPPH), mide la capacidad antioxidante mediante la utilización del radical libre DPPH (Brand-Williams, et al., 1995). Este radical tiene un electrón desapareado y es de color azul-violeta, con una banda de absorción a 515 nm la cual desaparece la reducción provocada por algún compuesto antioxidante, decolorándose hacia amarillo pálido. El método DPPH es más sensibles a los compuestos hidrófilos (Bachiega, et al., 2016).

El radical ABTS⁺, ácido (2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico), es de color verde azulado, se mide espectrofotométricamente a 734nm (Re et al., 1999). El presente método es capaz de medir tanto compuestos lipofílicos como hidrofílicos (Bachiega, et al., 2016).

El método FRAP, se basa en la transferencia de electrones, mientras que otros métodos se fundamentan en la captura de electrones. Es un método estable y fácil de reproducir (Bachiega, et al., 2016). Determina la capacidad antioxidante de forma indirecta. Se basa en el poder que tiene una sustancia antioxidante para reducir el Fe³⁺ a Fe²⁺ que es menos antioxidante. El complejo férrico-2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) incoloro es reducido al complejo ferroso coloreado. Se trata de un método espectrofotométrico ya que se mide la absorbancia del Fe²⁺. Así, cuanto más antioxidante es la sustancia objeto de estudio, mayor es la reducción y mayor la concentración de Fe²⁺ y más alta la señal de absorbancia. El complejo va a poder ser reducido por productos con potenciales redox menores a 0.7 V (potencial redox del Fe³⁺ -TPTZ) (Benzic y Strain, 1996).



2. OBJETIVOS

El objetivo principal de este Trabajo Fin de Grado consistió en evaluar el efecto del envasado y almacenamiento refrigerado sobre la calidad funcional del brócoli durante 21 días a 0 °C. Para la consecución del objetivo principal del presente trabajo, se han puesto a punto los siguientes métodos:

- Determinación del contenido de polifenoles totales:
 - Método Folin-Ciocalteu.
- Determinación del contenido en carotenos
- Determinación del contenido en clorofila
- Determinación de la capacidad antioxidante total:
 - Método DPPH.
 - Método ABTS.
 - Método FRAP.

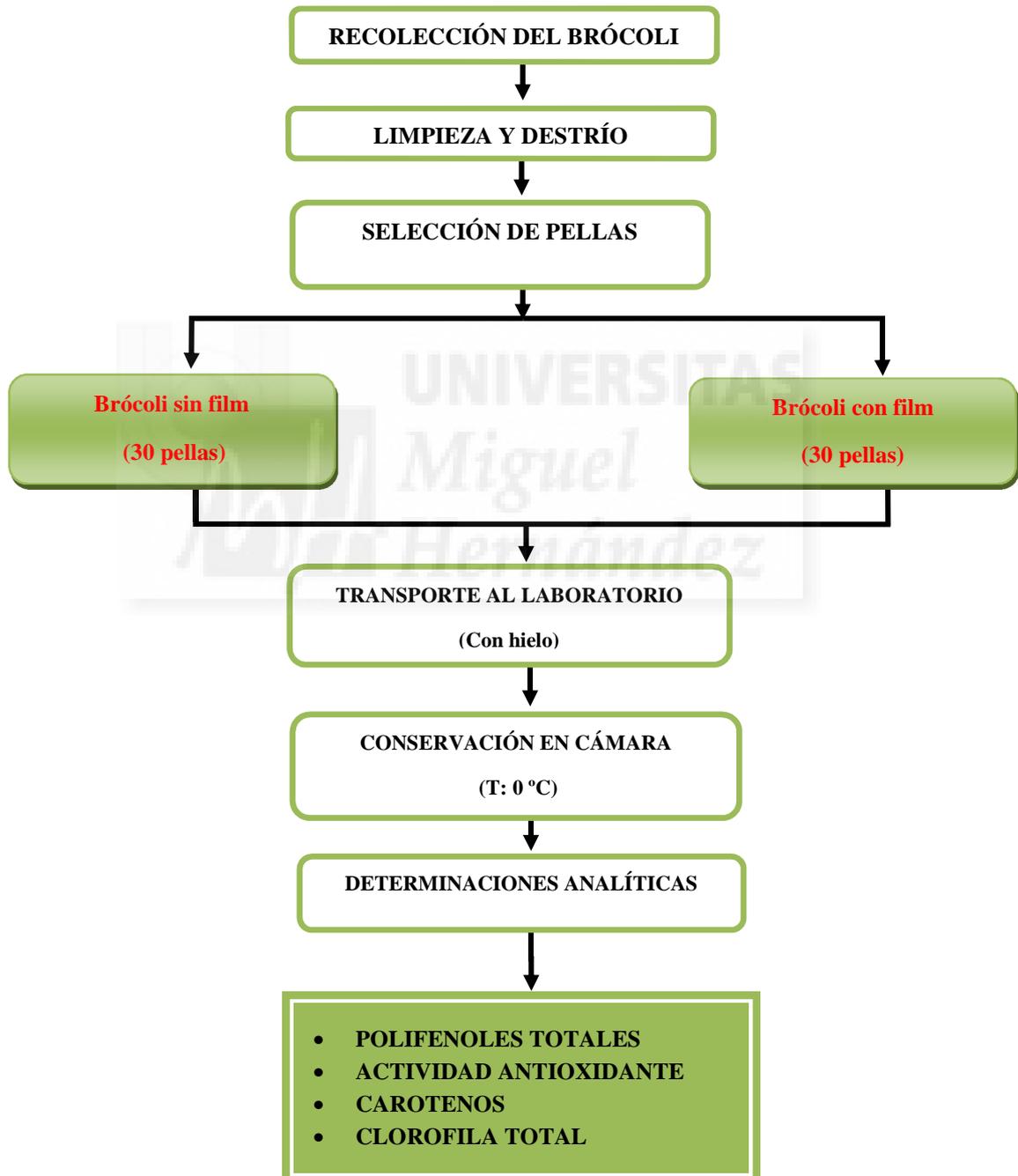


3. MATERIALES Y MÉTODOS



3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 PLANIFICACIÓN DEL DISEÑO EXPERIMENTAL



La planificación del trabajo se llevó a cabo según se muestra en la figura 3.1.

3.2 MATERIAL VEGETAL Y CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO

El brócoli (*Brassica oleracea* L. var Italica cv. Parthenon) fue proporcionado amablemente por la empresa Guiralber fruit S.L. Se seleccionaron 60 pellas con las mismas características: compactas al tacto, con todos los floretes cerrados y de color verde oscuro brillante. Una vez seleccionadas se dividieron aleatoriamente en dos grupos de 30 pellas cada uno y se sometieron a los siguientes tratamientos: Grupo control envasados sin filmar y grupo envasados con film: las cabezas de brócoli fueron filmadas por la empresa con un film retráctil de poliolefina multicapa compuesta por Polietileno U Polipropileno de 25 μm de espesor (Figura 3.2.b), para crear la atmósfera modificada. A continuación, los brócolis se colocaron en hielo y se llevaron al laboratorio dentro de las primeras 24 h de la cosecha. Todas las cabezas de brócoli se almacenaron en las mismas condiciones: $0 \pm 1^\circ\text{C}$ y en oscuridad durante 21 días. El estudio se llevó a cabo durante los días 1, 8, 15 y 21. Para realizar todas las determinaciones analíticas durante los muestreos, se utilizó muestras de brócoli en fresco, escogiendo 5 pellas de brócoli al azar para cada tratamiento. En el muestreo se sacó los floretes de los brócolis, se utilizó la mitad de cada uno, se homogeneizó con una batidora (Braun Multiquick 3 MR 320, Omelette) (figura 3.8), (con la finalidad de que la muestra sea lo más representativa posible).



Figura 3.2. Brócoli.



Figura 3.3. a) Pella de brócoli sin film. b) Pella de brócoli con film.



Figura 3.4. Homogeneización de los floretes de brócoli.

3.3 DETERMINACIONES ANALÍTICAS.

Las determinaciones que se realizaron fueron las siguientes:

3.3.1 Parámetros funcionales

- Polifenoles totales
- Carotenos
- Clorofila total.
- Actividad antioxidante total.

3.4 EXTRACCIONES

3.4.1 Extracciones para polifenoles y capacidad antioxidante

La preparación de la muestra fue la misma para la determinación de polifenoles y capacidad antioxidante. Muestras frescas de brócoli recién trituradas (15g) se homogeneizaron con 15 mL de metanol: agua (90:10 v/v) en un Polytron Ultra-Turrax T18 (Figura 3.5) durante 3 minutos. Los homogeneizados obtenidos se centrifugaron (centrífuga mod. C30P CENTRIFUGE, B. Braun. Biotech (Figura 3.6)) durante 15 minutos a 15.000 rpm a una temperatura de 4 °C. Los sobrenadantes se almacenaron en frascos (CR topacio 5ml) y se mantuvieron a -80 °C, hasta su posterior análisis. Todas las extracciones se realizaron por triplicado.

3.4.2 Extracción para carotenos

Se utilizó 15 g de muestra de brócoli se mezcló con extractante (2,5 ml de hexano, 1,25 ml de acetona y 1,25 ml de etanol); se homogenizó en un Polytron Ultra-Turrax T18 (Figura 3.5), durante 3 minutos; se centrifugó 20 minutos a 15.000 rpm, a una temperatura de 4 °C. Una vez los tubos fueron sacados de la centrífuga, el sobrenadante se transfirió a (CR topacio 5ml) debidamente rotulados, para la determinación de carotenos. Estas extracciones se realizaron por triplicado.

3.5 DETERMINACIONES DE COMPUESTOS BIOACTIVOS

3.5.1 Contenido de Polifenoles Totales

El contenido de polifenoles totales se midió mediante el método Folin-Ciocalteu (Singleton, et al., 1999). En un tubo de ensayo, se introdujeron 100 µL de extracto previamente preparado junto con 500 µL tampón fosfato 50 mM a pH 7.8, y 2.5 mL de reactivo de Folin (Folin-Ciocalteu, Merk); (1:10 reactivo de folin: H₂O ultrapura), se

agitó y se dejó reposar durante 2 minutos. A continuación, se paró la reacción adicionando 2 mL de Na_2CO_3 (75 g/L), se volvió a agitar y se introdujeron los tubos de ensayo durante 10 minutos en un baño a $50\text{ }^\circ\text{C}$. La absorbancia se midió a 760 nm, usando un espectrofotómetro UV-vis (Hewlett Packard mod. 8453) (Figura 3.7). El pyrogallol se usó como compuesto de referencia para realizar la recta patrón en el rango de (0.025 a 0.125 ml), la ecuación de la recta obtenida, $Y=260,75X + 0,033$ con $R^2= 0,9966$. Los resultados se expresaron como mg equivalentes de Pyrogallol por 100 g de peso fresco.



Figura 3.5. Polytron Ultra-Turrax T18



Figura 3.6. Centrífuga Braun. Biotech. modelo C30P



Figura 3.7. Espectrofotómetro spectronic. Modelo Helios epsilon



Figura 3.8. Batidora (Braun Multiquick 3 MR 320, Omelette

3.5.2 Actividad Antioxidante

Se utilizaron tres métodos para la determinación de la actividad antioxidante, según el radical cromóforo usado para la reacción. El ABTS^{•+} (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico), DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo), FRAP (2, 4, 6-tripiridil-s-triazina).

El método del radical libre DPPH, se llevó a cabo según el método descrito por Brand-Williams et al. (1995). Brevemente, 10 µL de extracto previamente preparado se mezcló con 40 µL de MeOH y 990 µL de solución DPPH previamente preparada (Se pesó 0.0035 g de 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl y se diluyó en 10 mL de metanol). La mezcla se agitó y se dejó en oscuridad durante 30 minutos, pasado ese tiempo se ajustó la absorbancia ≈ 1. La absorbancia se midió en un espectrofotómetro UV-Vis spectronic a 515 nm (Helios épsilon) (figura 3.7). Se elaboró una recta patrón para obtener la ecuación de la recta que nos permitió saber la concentración de las muestras, siendo: $Y=0,3672X + 0,1037$ con $R^2= 0,9601$. Los resultados se expresaron como mg equivalentes de Trolox por 100 g de peso fresco.

El método FRAP y el método ABTS se realizaron de acuerdo con Benzie y Strain (1996) y Re et al. (1999), 10 µL de cada extracto previamente preparado se mezclaron con 990 µL de ABTS o FRAP y se dejaron reaccionar durante 30 minutos en oscuridad. La absorbancia se midió a 593 nm y 734 nm para el método FRAP y el método ABTS respectivamente. Se elaboró una recta patrón para cada uno de los métodos para obtener la ecuación de la recta, siendo: $Y = 0,9933x + 0,0574$ con $R^2 = 0,9966$ para el método FRAP y $Y= 0,454x + 0,0251$ con $R^2 = 0,9905$ para el método ABTS. Los resultados se expresaron como mg equivalentes de Trolox por 100 g de peso fresco.

3.5.3 β -carotenos

El cambio en la absorbancia se midió usando un espectrofotómetro UV–Vis spectronic a 515 nm (Helios épsilon) (figura 3.7). El contenido de caroteno se determinó usando la Ley de Beer-Lambert. La concentración de caroteno se calculó utilizando el coeficiente de extinción 2.505 de β -caroteno en hexano. El blanco era hexano. Los resultados se expresaron como g de β -caroteno / 100 g de peso fresco.

3.5.4 Clorofila total

El contenido total de la clorofila de la muestra de brócoli en base a su peso fresco, se determinó usando el método colorímetro de Singh (1977), con ligeras modificaciones propuestas por Nath et al., (2011). Se utilizó 2 g de muestra de brócoli a la cual se le añadió 20 ml de una mezcla de acetona: agua (80:20 v/v); se homogenizó en un Polytron Ultra-Turrax T18 (Figura 3.5), durante 2 minutos; se centrifugó 5 minutos a 5.000 rpm a una temperatura de 4 °C. Una vez los tubos fueron sacados de la centrífuga, el sobrenadante se transfirió a un matraz aforado de 100 mL con ayuda de una lana de vidrio como filtro (Glass wool washed op. Panreac). Este proceso se repitió varias veces. A continuación el volumen se completó hasta 100 ml con el extractante previamente utilizado, acetona: agua ultrapura (80:20 v/v). Las lecturas espectrofotométricas se realizaron a 645 y 663 nm, en el espectrofotómetro spectronic. Modelo Helios epsilon (Figura 3.7.) El contenido de la clorofila total se determinó con la siguiente fórmula.

$$\text{Clorofila total (mg=g)} = \frac{(20 \cdot 2 \cdot \text{OD a } 645 \text{ nm} + 8 \cdot 02 \cdot \text{OD a } 663 \text{ nm} \cdot V)}{100 \cdot W}$$

Donde, OD es la densidad óptica, V es el volumen del extracto (ml) y W es el peso de la muestra en (g). Los resultados fueron expresados como contenido mg de clorofila total /gramo de peso fresco.



Figura 3.9. Determinación de clorofilas.

3.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todas las determinaciones se realizaron por triplicado. Los resultados fueron expresados como la media \pm la desviación estándar. La comparación de medias se realizó mediante un análisis de varianza (ANOVA) y mediante la prueba de rangos múltiples de Duncan usando el software SPSS v 21.0 (SPSS Inc., Chicago-Illinois-USA). La diferencia significativa fue establecida como ($p < 0.05$).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN



4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 POLIFENOLES TOTALES

La figura 4.1 muestra el contenido de polifenoles totales para los brócolis filmados y sin filmar durante 21 días de almacenamiento. Como se puede observar, el primer día de almacenamiento los brócolis filmados presentaron mayor cantidad de polifenoles totales que los brócolis sin filmar. A los 8 días de almacenamiento refrigerado a 0 °C, tanto los brócolis filmados como los sin filmar, presentaron un aumento significativo en el contenido de polifenoles totales. Este aumento en ambas muestras se podría explicar por el estrés sufrido por la planta a causa de las lesiones causadas durante la cosecha y post-cosecha (Yang, et al., 2011). En cambio, al final del periodo de almacenamiento, en los brócolis filmados, se observó un descenso en los polifenoles, presentando cantidades de 25.39 mg/ 100 g de peso fresco y encontrándose sin diferencias significativas respecto a las concentraciones registradas el primer día. Los resultados obtenidos fueron similares a los obtenidos por otros autores donde informaron que el almacenamiento de brócoli en atmósfera modificada, presentaron pequeñas fluctuaciones a lo largo del almacenamiento llegando a mantener los niveles iniciales de polifenoles totales (Fernández-León, et al., 2013; Serrano, et al., 2006). Sin embargo, los brócolis sin filmar, durante la última semana de almacenamiento presentaron una tendencia contraria a los brócolis filmados, observándose un aumento significativo del 16 % en la concentración de polifenoles totales. Podsdek, 2007 justificó este aumento en polifenoles en muestras sin filmar debido a la mayor pérdida de peso que presentaron dichas muestras frente a las muestras filmadas, lo que conlleva a concentrar estos compuestos en las células.

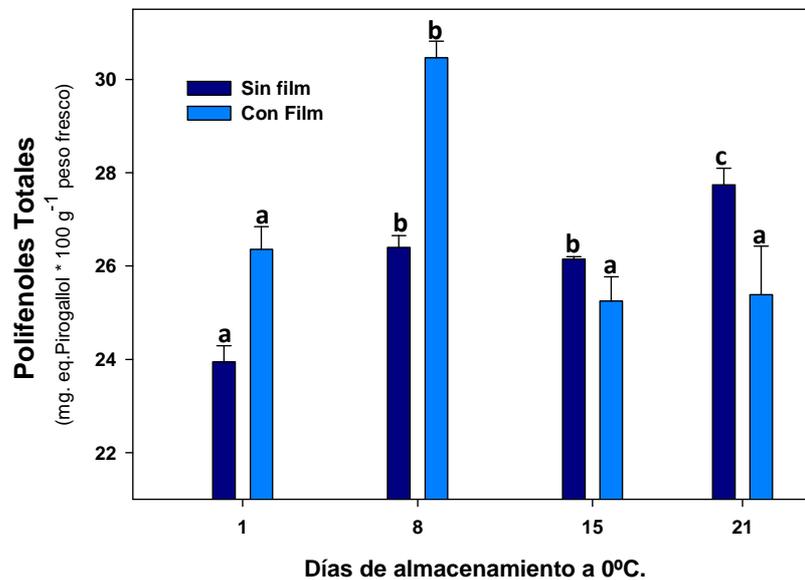


Figura 4.1. Evolución del contenido de Polifenoles Totales en pellas de brócoli filmadas y sin filmar durante 21 días de almacenamiento a 0 °C. Barras con letras minúsculas indican diferencias significativas entre los diferentes días de almacenamiento para la misma muestra con ($p < 0.05$).

4.2 β -caroteno

En la evolución del contenido de β -caroteno para los brócolis filmados y sin filmar durante 21 días de almacenamiento (Figura 4.2), se puede observar que el primer día de almacenamiento, los brócolis filmados presentaron mayor cantidad de β -caroteno que los brócolis sin filmar. Las muestras sin filmar aumentaron significativamente durante todo el periodo de almacenamiento a 0 °C partiendo de concentraciones de 24.68 hasta alcanzar 36.26 mg/100 g de peso fresco a los 21 días, lo que supone un aumento significativo del 47%. Este aumento en el contenido en β -caroteno en las muestras sin filmar podría estar relacionado con una mayor exposición al oxígeno durante el periodo de almacenamiento, ya que estos compuestos protegen a las células y tejidos de los radicales altamente oxidantes y del oxígeno singlete, mediante su actividad antioxidante (Casierra-Posada, et al., 2012). En cambio, en las muestras filmadas solamente se registró un aumento durante los 8 primeros días de almacenamiento de 28.26 a 32.74 mg/100 g de peso fresco.

Sin embargo, durante las dos últimas semanas de almacenamiento, en los brócolis filmados, se registró un descenso del β -caroteno, presentando cantidades de 27.31 mg/100 g de peso fresco al final del periodo de almacenamiento, encontrándose sin diferencias significativas respecto a las concentraciones registradas el primer día. Para los brócolis filmados los resultados fueron similares a los obtenidos por García, et al., (2005); Murkovic, et al., (2000) y Nath, et al., (2011), que mostraron una estabilidad del contenido en β -caroteno de 25.6 mg / 100 g de peso fresco, durante el almacenamiento. Esta estabilidad en los niveles de β -caroteno puede estar relacionada con la limitación de oxígeno atmosférico disponible para la oxidación, por lo que las enzimas oxidantes serían menos activas (Nath, et al., 2011).

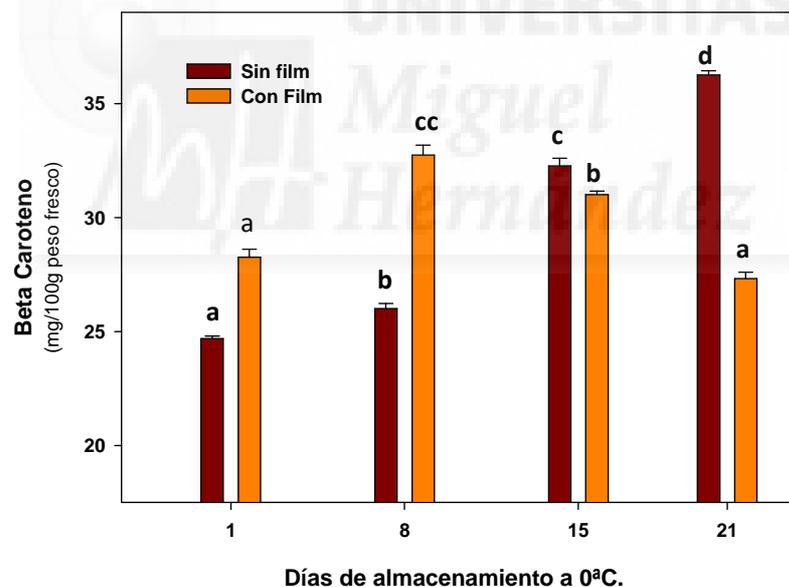


Figura 4.2 Evolución del contenido de β -caroteno en pellas de brócoli filmadas y sin filmar durante 21 días de almacenamiento a 0 °C. Barras con letras minúsculas indican diferencias significativas entre los diferentes días de almacenamiento para la misma muestra con ($p < 0.05$).

4.3 CLOROFILA TOTAL

La figura 4.3 representa la evolución en el contenido de clorofila total para los brócolis filmados y sin filmar durante 21 días de almacenamiento a 0 °C. Como se puede observar, desde el primer día de almacenamiento los brócolis filmados presentaron concentraciones significativamente superiores de clorofila total que los brócolis sin filmar. En las muestras sin filmar, la contenido de clorofila disminuyó significativamente durante el almacenamiento a 0 °C, partiendo de concentraciones de 0.42 hasta alcanzar 0.37 mg/ g de peso fresco a los 21 días. Fernández-León, et al., 2013 justificó la degradación de clorofila debido a los cambios de color que pueden sufrir las pellas de brócoli (desde verde hasta amarillo). Sin embargo, el descenso del 11% registrado en el presente estudio, no alteró la calidad visual de los brócolis sin filmar. Además según otros autores, este proceso de degradación también podría estar relacionado con la tasa de respiración, producción de etileno y procesos de peroxidación de lípidos (King y Morris, 1994; Zhuang et al., 1995). Sin embargo, para las muestras de brócoli filmadas, a lo largo de todo el periodo de almacenamiento se registró un aumento del 30%, partiendo de valores de 0.42 hasta alcanzar 0.55 mg/g de peso fresco a día 21, Los resultados obtenidos fueron similares con otros autores, que demostraron que la disminución de la clorofila fue menor en muestras filmadas, que en las muestras control (Fernández-León, 2013; Serrano, et al., 2006). La estabilidad de la clorofila puede atribuirse a mayores concentraciones de CO₂ en el interior del film, debido a la acumulación por la respiración, disminuyendo la senescencia del brócoli (Fernández-León, 2013).

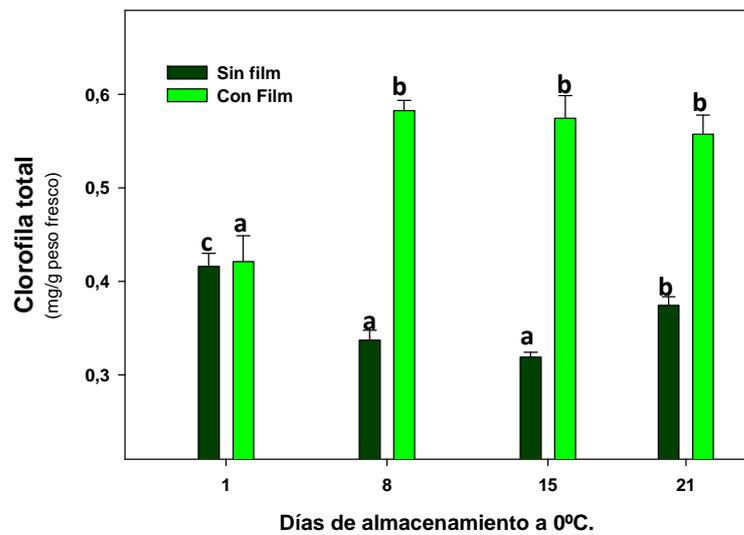


Figura 4.3 Evolución del contenido de Clorofila en pellas de brócoli filmadas y sin filmar durante 21 días de almacenamiento a 0 °C. Barras con letras minúsculas indican diferencias significativas entre los diferentes días de almacenamiento para la misma muestra con ($p < 0.05$).

4.4 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

La tabla 4.1 presenta la evolución de la capacidad antioxidante, utilizando distintos métodos, para los brócolis filmados y sin filmar durante 21 días de almacenamiento a 0 °C. Para las muestras sin filmar en todos los métodos de capacidad antioxidante realizados (ABTS, DPPH y FRAP) se observó un aumento a los 8 días de almacenamiento respecto a los valores registrados el primer día, dicho aumento fue progresivo hasta obtener los mayores valores de capacidad antioxidante al final del periodo de almacenamiento. En cambio, para las muestras filmadas, en el método ABTS se detectó un aumento ($p < 0.05$) de la actividad antioxidante en el octavo día de almacenamiento. Sin embargo, para el día 15 y 21, dicha concentración disminuyó progresivamente hasta alcanzar valores de 100.10 mg equivalentes de Trolox/ 100 g de peso fresco, al final del periodo de almacenamiento. Para el método DPPH, se observó un descenso estadísticamente significativo de la concentración de la capacidad antioxidante durante todo el periodo de almacenamiento partiendo de 62.25 hasta 34.47 mg equivalentes de Trolox / 100 g de peso fresco. Para el ensayo de FRAP, se observó un aumento la concentración de la capacidad antioxidante a lo largo del almacenamiento,

partiendo de valores de 142.74 hasta 187.64 mg equivalentes de Trolox / 100 g de peso fresco.

En el presente estudio, la concentración de la capacidad antioxidante aumento en todos los ensayos utilizados: ABTS, DPPH y FRAP para las muestras sin filmar. Por el contrario para las muestras filmadas se observó una disminución de la capacidad antioxidante. Los resultados obtenidos para las muestras filmadas durante el almacenamiento fueron comparables a los de Fernández-León, et al. (2012), que observaron una disminución de la capacidad antioxidante, de brócoli conservado en atmosfera modificada a 5 °C. En contraste, Leja et al. (2001) observaron un aumento de la capacidad antioxidante del brócoli durante 21 días de almacenamiento a 5 °C, tanto en muestras sin envasar como para las envasadas en películas poliméricas. Según Nath, et al., (2011) el aumento de la capacidad antioxidante durante el almacenamiento en muestras de brócoli envasadas, puede deberse a que el oxígeno atmosférico disponible es limitado. Serrano et al., (2006), revelaron una disminución del 50%, de la actividad antioxidante y compuestos fenólicos, en brócoli sin envasar almacenados a 1 °C, durante

20 días, mientras que en brócolis envasados en bolsas micro-perforadas y no perforadas, lograron mantener los valores de la capacidad antioxidante y los compuestos fenólicos.

Tabla 4.1 Capacidad antioxidante del brócoli

	Días	Sin Film	Filmadas
	mg equivalentes de Trolox/ 100 g de peso fresco		
ABTS	1	109.94 ± 3.00 ^a	118.60 ± 1.2 ^b
	8	128.29 ± 2.43 ^b	152.67 ± 4.28 ^d
	15	141.95 ± 2.93 ^c	128.73 ± 4.16 ^c
	21	139.16 ± 4.04 ^c	100.10 ± 3.53 ^a
DPPH	1	39.56 ± 2.46 ^a	62.25 ± 1.44 ^c
	8	45.91 ± 0.54 ^b	57.35 ± 2.72 ^c
	15	46.27 ± 3.83 ^b	49.18 ± 2.18 ^b
	21	55.90 ± 3.71 ^c	34.47 ± 2.5 ^a
FRAP	1	130.53 ± 2.32 ^a	142.74 ± 1.54 ^b
	8	136.03 ± 1.21 ^b	165.96 ± 1.96 ^c
	15	145.56 ± 2.44 ^b	123.55 ± 1.81 ^a
	21	192.88 ± 5.2 ^c	187.64 ± 1.96 ^d

Tabla 4.1. Media de tres repeticiones ± desviación estándar. Letras minúsculas indican diferencias significativas entre los diferentes días de almacenamiento para la misma muestra con ($p < 0.05$).

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en los diferentes compuestos bioactivos analizados frente a los diferentes métodos de capacidad antioxidante a lo largo del periodo de almacenamiento, tanto en las muestras filmadas como sin filmar se obtuvo un alto coeficiente de correlación de Pearson's entre la capacidad antioxidante total y los polifenoles totales y β -caroteno ($r \geq 0.8$). Estos resultados se asemejan a los encontrados por Kähkönen, et al., (1999) y Serrano et al., (2006), que sugieren que los compuestos fenólicos totales, son los principales contribuyentes a la mayor capacidad antioxidante en brócoli ($r = 0.93$), frente a otros compuestos (Vinson, et al., 1995).

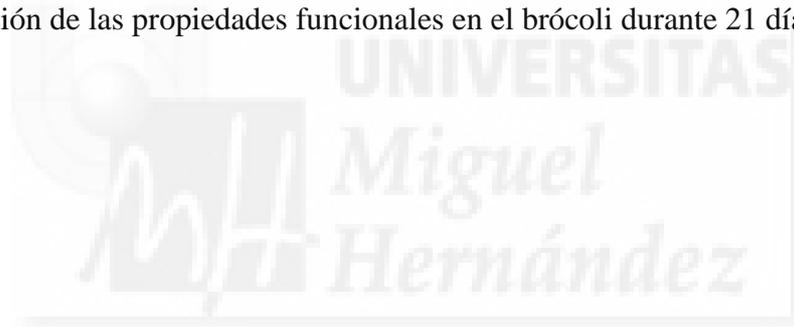


5. CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el presente estudio, mostraron que el uso del film para almacenar las muestras de brócoli cv. Parthenon fue un buen método de conservación para mantener las propiedades funcionales y calidad visual durante el durante 21 días almacenamiento a 0 ° C, ya que mantiene sin cambios significativos polifenoles totales, β -caroteno, clorofila total y capacidad antioxidante total. En cambio, las muestras de brócoli almacenadas sin filmar, presentaron un aumento en las concentraciones de polifenoles totales, β -caroteno y capacidad antioxidante, en cambio se observó una disminución en el contenido en clorofila que no llegó a afectar al aspecto visual de las pellas de brócoli.

Estos resultados demuestran que ambos métodos de conservación son válidos para la conservación de las propiedades funcionales en el brócoli durante 21 días a 0 °C.





6. BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Abbot, J.A., (1999). Quality measurement of fruits and vegetables. *Postharvest Biology and Technology*, 15, 207-225.
- Al-Ati T., Hotchkiss J.H. (2003). The role of packaging film perm selectivity in modified atmosphere packaging. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 51, 4133–4138.
- Andropoulos, V. P., Papakyriakou, A., Vourloumis, D., Tsatsakis A. M., Spandidos, D. A. (2010). Dietary flavonoids in cancer therapy and prevention: Substrates and inhibitors of cytochrome P450 CYP1 enzymes. *Pharmacology & Therapeutics*, 126, 9-20.
- Babula, D., Kaczmarek, M., Ziolkowski, P. A., Sadowski, J. (2007). Brassica oleracea, in: *Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants*, capítulo 8, Vegetables, volumen 5 Editor C. Kole, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp 227-285. ISBN:13 978-3-540-34535-0.
- Bachiega, P., Mastrodi, J., Carvalho, J., Ruiz, A., Schwarz, K., Tezotto, T., Caldeira, M. (2016). Antioxidant and antiproliferative activities in different maturation stages of broccoli (*Brassica oleracea Italica*) biofortified with selenium, *Food Chemistry*, 190, 771–776.
- Belitz, H.D., y Grosch, W. (1997). *Química de los Alimentos*. 2ª ed. Ed. Acribia. Zaragoza.
- Benzic, I. E. F., and Strain, J. J. (1996). The Ferric Reducing Antioxidant of Plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239, 70–76.
- 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*, 38(4)

Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., & Berset, C. (1995). Use of free radical method to evaluate antioxidant activity, *LWT-Food Science and Technology*, 28 (1), 25-30.



- Buchanan, B. B., Cruissem, W., Jones R. L. (2000). Chemistry and Molecular Biology of Plants. Rockville, Maryland: John Wiley and Sons Inc (Chapter 24).
- CAE. (2012). Código Alimentario Español. Ed. Boletín Oficial del Estado. Colección Textos Legales.
- Cantwell, M. & Suslow, T. (2005). Cabbage: Recommendation for maintaining postharvest quality. Consultada el 10/06/2016 en: <http://postharvest.ucdavis.edu/pfvegetable/Cabbage>
- Cappellini, R.A. & 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.
- Casierra-Posada, F., Ávila-León, O. y Riascos-Ortíz, D. (2012). Cambios diarios del contenido de pigmentos fotosintéticos en hojas de caléndula bajo sol y sombra. 60-71
- Collins, R.J., Tisdell, J.S. (1995). The influence of storage time and temperature on chilling injury in Fuyu and Suruga persimmon (*Diospyros kaki* L.). *Postharvest Biology and Technology*, 6, 149-157.
- Costa, L., Vicente, A. R., Civello, P. M., Chaves, A. R., & Martinez, G. A. (2006). UV-C treatment delays postharvest senescence in broccoli florets. *Postharvest Biology and Technology*, 39, 204–210.
- Czczot, H. (2000). Biological activities of flavonoids: A review. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 950, 3-13.
- 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.
- FAO Food and Agriculture Organization. FAOSTAT Anuario de estadística agroalimentaria de la FAO. Consultada el 15/06/2016 en www.fao.org.

- Fernández-León, M. F. (2012). Evolución de los parámetros de calidad físico-química y funcional de distintas *brassicas* sometidas a diferentes tratamientos postcosecha. Tesis Doctoral. Universidad de Extremadura. España.
- Fernández-León, M.F., Fernández-León, A.M., Lozano, M., Ayuso, M.C. y 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., Fernández-León, A.M., Lozano, M., Ayuso, M.C., Amodio, M.L., Colelli, G., y González-Gómez, D. (2013). Retention of quality and functional values of broccoli 'Parthenon' stored in modified atmosphere packaging, *Food Control*, 31, 302-313.
- Finley, JW., Ip, C., Lisk, DJ., Davis, CD., Hintze, KJ., Whanger, PD. (2001). Cancer-protective properties of high-selenium broccoli. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 2679-2683.
- 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.
- Genard, M., y Gouble, B. (2005). ETHY. A theory of fruit climacteric ethylene emission. *Plant Physiology*, 139, 531-545.
- Gimeno, C.E. (2004). Compuestos fenólicos. Un análisis de sus beneficios para la salud. *Farmacia y Salud, Oficina de Farmacia*, 23, 80-84.
- Halliwell, B. (2008). Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cellculture and in vivo studies? *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 476, 107-112.
- Hasperué, J.H. (2012). Rol del metabolismo de hidratos de carbono en la senescencia postcosecha de brócoli. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de la Plata. Argentina.

- Heo, H., Kim, Y., Chung, D., & Kim, D. (2007). Antioxidant capacities of individual and combined phenolics in a model system. *Food Chemistry*, 104, 87-92.
- 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 CG, Xu CJ, Wei J, Yuan J, Yuan GF, Wang BL, Wang QM. (2009). Effect of modified atmosphere packaging on visual quality and glucosinolates of broccoli florets. *Food Chemistry*, 114 (1):28–37.
- Jiang, X., Yu, X., Li, D. (2011). Meristem development and its relation to endogenous GA3 and IAA contents during floral bud differentiation in broccoli. *Journal of Bangladesh Academy of Sciences*, 35 (1), 1-6
- Jin, P., Yao, D., Xu, F., Wang, H., y Zheng, Y. 2015. Effect of light on quality and bioactive compounds in postharvest broccoli florets. *Food Chemistry*, 172, 705–709.
- 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. (1992). Methods of gas mixing, sampling and analysis. En: A.A. Kader (Eds.) Publ. 3311. Postharvest technology of horticultural crops. University of California, Berkley, California: 93-95.
- Kader, A.A. (2007). Biología y tecnología poscosecha: Un panorama en Tecnología Poscosecha de Productos Hortofrutícolas. 3ª edición. Kader, A. (Ed.). University of California, Division of Agriculture and Natural Resources, Oakland, California, USA. pp. 43-54.
- Kähkönen, M.P., Hopia, A.T., Vuorela, H.J., Rauha, J.P., Pihlaja, K., Kujala, T.S. (1999). Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 3954–3962.

- Keck, AS., Finley, JW. (2004). Cruciferous vegetables: cancer protective mechanisms of glucosinolate hydrolysis products and selenium. *Integrative Cancer Therapies*, 3, 5-12.
- Khalaj, L., Nejad, S. C., Mohammadi, M., Zadeh, S. S., Pour, M. H., Ashabi, G. (2013). Assessing competence of broccoli consumption on inflammatory and antioxidant pathways in restraint-induced models: Estimation in rat hippocampus and prefrontal cortex. *BioMed Research International*, 1–13.
- King, G. A., & 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.
- Lai, J., Butler, M.A. & Matney, T. (1980). Antimutagenic activities of common vegetables and their chlorophyll content. *Mutation Research*, 77, 245-250.
- Leja, M., Mareczek, A., Starzyn´ ska, A., & Roz´ ek, S. (2001). Antioxidant ability of broccoli flower buds during short-term storage. *Food Chemistry*, 72, 219–222.
- Lipton, W. J. (1987). Senescence in leafy vegetables. *HortScience*, 22, 854-859
- López-Berenguer, C., Martínez-Ballesta, MD., Moreno, DA. (2009). Growing hardier crops for better health: salinity tolerance and the nutritional value of broccoli. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57 (2), 572-578.
- MAGRAMA Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. Estadísticas agrarias. Consultada el 15/06/2016 en www.magrama.gob.es
- Martínez-Villaluenga, C., Frías, J., Gulewicz, P., Gulewicz, K., & Vidal-Valverde, C. (2008). Food safety evaluation of broccoli and radish sprouts. *Food and Chemical Toxicology*, 46(5), 1635–1644.
- Matile P, Hörtensteiner S y Thomas H. (1999). Chlorophyll degradation. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular*, 50, 67-95.
- Miccolis, V., Saltveit, M.E. (1995). Influence of storage temperature on the postharvest characteristics of six melons (*Cucumis melo* L., *Inodorus* Group) cultivars. *Postharvest Biology and Technology*, 5, 211-219.

- Moreno, D. A., Carvajal, M., López-Berenguer, C., & 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., Deka, B.C. (2011). Changes in post-harvest phytochemical qualities of broccoli florets during ambient and refrigerated storage *Food Chemistry*, 127, 1510–1514
- Nuez, F., Gómez Campo, C., Fernández de Córdova, 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.
- Pascual, A. (1994). Brócoli. Su cultivo y perspectivas. *Revista Horticultura*, 97, 34-37
- Paull, E. (1999). Effect of temperature and relative humidity on fresh commodity quality. *Postharvest Biology and Technology*, 15, 263-277.
- Podsdek, A. (2007). Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: a review. *LWT e Food Science and Technology*, 40, 1-11.
- Prasain, J. K., Carlson, S. H., Wyss, J. M. (2010). Flavonoids and age-related disease: Risk, benefits and critical windows. *Maturitas*, 66, 163-171.
- Ramos dos Reis, L. C., Ruffo de Oliveira, V., Kienzle, M. E., Jablonski, A., Hickmann, S., Oliveira, A., (2015). Carotenoids, flavonoids, chlorophylls, phenolic compounds and antioxidant activity in fresh and cooked broccoli (*Brassica oleracea* var. Avenger) and cauliflower (*Brassica oleracea* var. Alphina). *LWT - Food Science and Technology*, 63, 177-183.
- Re, R., Pellegrini, N., Preotegente, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decoloration assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26, 121-37.

- Robles-Sánchez, R.M., Islas-Osuna, M.A., Astiazaran-García, H., Vásquez-Ortíz, F. A., Martín-Belloso, O., Gorinstein, S., & González-Aguilar, G. A., (2009). Quality index consumer acceptability. Bioactive compounds, and antioxidant activity of fresh-cut ataulfo mangoes (*Mangifera indica L.*) as affected by low-temperature storage. *Journal of the Science Food and Agriculture*, 74, 126-134.
- Rodríguez, M. C. (2013). Respuestas fisiológicas, moleculares y fotoquímicas de variedades de Brassica oleracea (Grupo Italica) sometidas a estrés abiótico. Tesis Doctoral. Universidad de Murcia. España
- Rodríguez-Aguilera R., Oliveira J.C. (2009). Review of Design Engineering Methods and Applications of Active and Modified Atmosphere Packaging Systems. *Food Engineering Reviews*, 1, 66-83
- Rojas-Graü MA, Oms-Oliu G, Soliva-Fortuny R, Martín-Belloso O, (2009). The use of packaging techniques to maintain freshness in fresh-cut fruits and vegetables: a review. *International Journal of Food Science and Technology*, 44, 875-889
- Scalbert, A., Johnson, I. T., Slatmarsh, M. (2005). Polyphenols: antioxidants and beyond. *American Journal of Clinical Nutrition*, 81, 215-217.
- Serrano, M., Martínez-Romero, D., Guillen, F., Castillo, S., & 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.
- Singh, J., Upadhyay, A.K., Bhadur, A., Singh, B. Singh, K.P. & Mathura, R. (2006). Antioxidant phytochemicals in cabbage (*Brassica oleracea L. var. capitata*). *Scientia Horticulturae*, 108, 233-237.
- Singh, U. R. (1977). Growth and maturity indices of banana. *Indian Journal of Horticulture*, 34, 19-25.
- Singleton. V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R.M. (1999). Analysis of total phenol and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods of Enzymology*, 299, 152-178.

- Torija Isasa, M.E., y Cámara Hurtado, M.M. (1999). Hortalizas, verduras y frutas. *Tratado de Nutrición. Ed. Diaz Santos*. Madrid.
- Türk R, Özkurt AS. (1994). The storage of some stone fruits in modified atmosphere. *Acta Horticulturae. International Society for Horticultural Science*, 368, 850-855.
- Vallejo, F., Tomás-Barberán, F. A., & García-Viguera, C. (2002). Potential bioactive compounds in health promotion from broccoli cultivars grown in Spain. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82, 1293-1297.
- Van den Berg, H., Faulks, R., Fernando-Granado, H., Hirschberg, J., Olmedilla, B., Sandmann, G., Southon, S., Stahl, W. (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.
- Vinson, J. A., Dabbagh, Y. A., Serry, M. M., & Jang, J. H. (1995). Plant flavonoids, especially tea flavonols, are powerful antioxidants using an in vitro oxidation model for heart-disease. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43(11), 2800–2802.
- Wills, R.B.H., Warton, M.A., Mussa, D.M.D.N., & Chew, L.P. (2001). Ripening of climacteric fruits initiated at low ethylene levels. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 41, 89-92.
- Xu, F., Yang, Z., Chen, X., Jin, P., Wang, X., & Zheng, Y. (2012). 6-Benzylaminopurine delays senescence and enhances health-promoting compounds of harvested broccoli. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 234–240.
- 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., & Wang, Q. (2010). Effect of 1-methylcyclopropene on shelf life, visual quality, antioxidant enzymes and health-promoting compounds in broccoli florets. *Food Chemistry*, 118(3), 774–781.

Zhuang, H., Hildebrand, D.F. & Barth, M.M. (1995). Senescence of broccoli buds is related to changes in lipid peroxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 2585-2591.

