



Universidad Nacional de La Plata.  
Facultad de Ciencias Exactas.

EFECTO DE LA APLICACIÓN DE TECNOLOGÍAS  
LIMPIAS SOBRE LA PROLONGACIÓN DE LA VIDA  
POSTCOSECHA DE BRÓCOLI MÍNIMAMENTE  
PROCESADO

María Laura Lemoine

TESIS DOCTORAL

Directora: Dra. Alicia R. Chaves

Co-director: Dr. Gustavo A. Martínez

~ 2009 ~

*El presente trabajo de Tesis Doctoral, para optar al título de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata, fue realizado en el Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA). Facultad de Ciencias Exactas, UNLP, bajo la dirección de la Dra. Alicia R. Chaves y co-dirección del Dr. Gustavo A. Martínez.*

*La Plata, Marzo de 2009*

Durante el desarrollo del presente trabajo de tesis se realizaron las siguientes publicaciones y presentaciones en Congresos:

### **Publicaciones en revistas internacionales**

**1. “Hot air treatment delays senescence and maintains quality of minimally processed broccoli florets during refrigerated storage”**

**M.Laura Lemoine**, Pedro Civello, Alicia Chaves, Gustavo Martínez. *LWT, Food Science and Technology*. En prensa, doi: 10.1016/j.lwt.2009.01.009 (2009).

**2. “Effect of combined treatment with hot air and UV-C on senescence and quality parameters of minimally processed broccoli (*Brassica oleracea* var *italica*)”**

**Maria L Lemoine**, Pedro M Civello, Alicia R Chaves, Gustavo A Martínez. *Postharvest Biology and Technology*. 48, 15–21 (2008).

**3. “Influence of a postharvest UV-C treatment on refrigerated storage of minimally processed broccoli (*Brassica oleracea* var *italica*)”**

**Lemoine María Laura**; Civello Marcos; Martínez Gustavo; Chaves Alicia. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 87, 1132-1139 (2007).

### **Comunicaciones a congresos**

1. XXXI Congreso Argentino de Horticultura. Mar del Plata, 30 de septiembre al 3 de octubre de 2008.

**“Efecto de la combinación de radiación UV-C y aire caliente sobre la actividad de enzimas antioxidantes de brócoli mínimamente procesado (*Brassica oleracea L var Italica*) almacenado a 20 °C.”**

**Lemoine María Laura**, Chaves Alicia R, Martínez Gustavo A. Expositor.

2. XXX Congreso Argentino de Horticultura. La Plata, 25 al 28 de septiembre de 2007.

**“Efecto de la combinación de radiación UV-C y aire caliente, sobre la calidad postcosecha de brócoli mínimamente procesado (*Brassica oleracea L var Italica*)” almacenado a 20 °C”.**

**Lemoine María Laura;** Chaves Alicia R; Martínez Gustavo A. Expositor.

3. Congreso Iberoamericano de Tecnología Postcosecha y Agroexportaciones. Cartagena, Murcia, España 29 de mayo al 1 de junio de 2007. Trabajo completo. Publicado en actas del Congreso Iberoamericano de Tecnología Postcosecha y Agroexportaciones.

**“Mantenimiento de la vida postcosecha de brócoli (*Brassica oleracea var italica*) mínimamente procesado mediante el tratamiento combinado con radiación UV-C y aire caliente”**

**Lemoine María Laura;** Civello Pedro M; Martínez Gustavo A; Chaves Alicia R. Expositor.

4. Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos .Córdoba 15 al 17 de noviembre de 2006. Publicado en libro de resúmenes Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos.

**“Tratamiento térmico y tratamiento térmico combinado con luz UV-C en brócoli (*Brassica oleracea var italica*) mínimamente procesado refrigerado”**

**Lemoine María Laura;** Martínez Gustavo A; Chaves Alicia R. Expositor.

5. XXIX Congreso Argentino de Horticultura. Catamarca 20 al 23 de septiembre de 2006. Publicado en libro de resúmenes XXIX Congreso Argentino de Horticultura.

**“Efecto de la combinación de radiación UV-C y tratamiento térmico sobre la vida postcosecha de brócoli (*Brassica oleracea var italica*) mínimamente procesado almacenado a 0 °C”**

**Lemoine María Laura;** Martínez Gustavo A; Chaves Alicia R. Expositor.

6. Simposio iberoamericano de vegetales frescos cortados. Brasil. 4 al 7 de abril de 2006. Publicado en CD-rom

**“Efecto del tratamiento con luz UV-C sobre la conservación de brócoli mínimamente procesado almacenado a 4 °C.”**

**Lemoine María Laura;** Civello Marcos; Martínez Gustavo; Chaves Alicia. Expositor.

7. Actas XXVII Congreso Argentino de Horticultura. Merlo. 21 al 24 de Septiembre de 2004. Trabajo completo. Publicado en CD-rom.

**“Los tratamientos con luz UV-C previos a la refrigeración, permitirían aumentar el tiempo de almacenamiento de brócoli mínimamente procesado”**

**Lemoine Laura;** Costa Lorenza; Civello Marcos; Martínez Gustavo; Chaves Alicia. Expositor.

## ÍNDICE

<b>RESUMEN</b>	1
<b>INTRODUCCIÓN GENERAL</b>	3
<b>I. Brócoli</b>	3
I.1 Origen	3
I.2 Descripción	4
I.3 Generalidades cultivo	6
I.4 Valor nutritivo	8
I.5 Cosecha	9
I.6 Comercialización	10
I.7 Manejo postcosecha de brócoli	11
I.8 Fisiología postcosecha de brócoli	13
<b>II. Senescencia</b>	15
II.1 La senescencia como muerte celular programada	15
II.2 Tipos de senescencia	16
II.3 Causas de la senescencia	17
II.4 Alteraciones metabólicas durante la senescencia	18
II.5 Reguladores de la senescencia	23
<b>III. Vegetales frescos cortados</b>	26
III.1 Definición	26
III.2 Efectos del procesado	27
III.2.1 Intensidad respiratoria y deshidratación	27
III.2.2 Producción de etileno	28
III.2.3 Pérdida de firmeza	28
III.2.4 Alteraciones microbiológicas	28
III.2.5 Alteraciones del color	28
III.2.6 Pérdida de nutrientes y características organolépticas	29
III.3 Factores que afectan la calidad de los productos mínimamente procesados	29
III.3.1 Variedad y Estado de madurez	29
III.3.2 Sanidad	30
III.3.3 Temperatura de almacenamiento	30
III.3.4 Uso de atmósferas modificadas y controladas	31
<b>OBJETIVOS</b>	32
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	33
I. Material vegetal	33
II. Tratamientos físicos	33
II.1 Tratamiento con radiación UV-C	33
II.2 Tratamiento térmico	34
II.3 Tratamiento con radiación UV-C combinado con tratamiento térmico de alta temperatura	34
III. Determinaciones	35
III.1 Calidad organoléptica	35
III.2 Pérdida de peso	36
III.3 Actividad respiratoria	36
III.4 Pérdida de electrolitos	37
III.5 Color superficial	37
III.6 Contenido de clorofila	38

III.7 Contenido de azúcares reductores	38
III.8 Contenido de azúcares totales	39
III.9 Contenido de proteínas solubles	40
III.10 Contenido de proteínas totales	41
III.11 Contenido de compuestos fenólicos	42
III.12 Contenido de ácido ascórbico	42
III.12.1 Metodología 1	42
III.12.2 Metodología 2	43
III.13 Actividad antioxidante	44
III.14 Análisis microbiológico	45
IV. Determinaciones enzimáticas	46
IV.1 Superóxido dismutasa (SOD)	46
IV.2 Catalasa (CAT)	47
IV.3 Peroxidasa (POX)	48
IV.4 Fenilalanina-amonio-liasa (PAL)	48
IV.5 Ascorbato peroxidasa (APX)	49
IV.6 Determinación del contenido de proteínas de los extractos enzimáticos	50
V. Análisis estadístico	50
<b>CAPÍTULO I:</b> Influencia de la radiación UV-C sobre la senescencia y calidad postcosecha de brócoli mínimamente procesado almacenado a baja temperatura	
I.1 Introducción	51
I.2 Objetivo	54
I.3 Resultados y discusión	55
I.3.1 Apariencia general	55
I.3.2 Pérdida de peso	55
I.3.3 Pérdida de electrolitos	56
I.3.4 Actividad respiratoria	57
I.3.5 Color superficial	57
I.3.6 Contenido de clorofila	60
I.3.7 Contenido de azúcares totales	61
I.3.8 Contenido de azúcares reductores	62
I.3.9 Contenido de proteínas solubles	63
I.3.10 Contenido de compuestos fenólicos	64
I.3.11 Contenido de ácido ascórbico	65
I.3.12 Actividad antioxidante	66
I.3.13 Análisis microbiológico	68
I.4 Conclusiones	70
<b>CAPÍTULO II:</b> Efecto del tratamiento térmico con aire caliente sobre la senescencia y calidad postcosecha de brócoli mínimamente procesado almacenado a baja temperatura	
II.1 Introducción	71
II.2 Objetivo	76
II.3 Resultados y discusión	77
II.3.1 Apariencia general	77
II.3.2 Pérdida de peso	77
II.3.3 Actividad respiratoria	77
II.3.4 Pérdida de electrolitos	78

II.3.5 Color superficial	79
II.3.6 Contenido de clorofila	81
II.3.7 Contenido de compuestos fenólicos	82
II.3.8 Actividad antioxidante	83
II.3.9 Contenido de proteínas	84
II.3.10 Contenido de azúcares	85
II.4 Conclusiones	87
<b>CAPÍTULO III:</b> Selección y aplicación del tratamiento combinado de radiación UV-C y aire caliente. Análisis de su efecto sobre la calidad y senescencia de brócoli mínimamente procesado.	
III.1 Parte I: A) Selección y aplicación del tratamiento combinado. Efecto sobre la calidad y senescencia de muestras almacenadas a 20 °C.	
III.1.1 Introducción	88
III.1.2 Objetivo	90
III.1.3 Resultados y discusión	91
III.1.3.1 Selección de la combinación de radiación UV-C y tratamiento térmico con aire caliente	91
III.1.3.2 Efecto de la combinación de una dosis de radiación UV-C de 8 kJ.m <sup>-2</sup> con un tratamiento térmico 48 °C durante 3 horas	94
III.1.3.3 Pérdida de calidad organoléptica	94
III.1.3.4 Color superficial	95
III.1.3.5 Contenido de clorofila	97
III.1.3.6 Contenido de proteínas totales	98
III.1.3.7 Contenido de proteínas solubles	99
III.1.3.8 Actividad respiratoria	100
III.1.3.9 Contenido de azúcares totales	101
III.1.4 Conclusiones	103
III.2 Parte I: B) Efecto de la aplicación del tratamiento combinado sobre la capacidad antioxidante y actividad de enzimas relacionadas en muestras almacenadas a 20 °C.	
III.2.1 Introducción	104
III.2.2 Objetivo	113
III.2.3 Resultados y discusión	114
III.2.3.1 Efecto del tratamiento combinado sobre el contenido de compuestos antioxidantes	114
III.2.3.1.1 Contenido de compuestos fenólicos	114
III.2.3.1.2 Contenido de ácido ascórbico	115
III.2.3.1.3 Contenido de ácido dehidroascórbico	116
III.2.3.1.4 Actividad antioxidante	117
III.2.3.2 Efecto del tratamiento combinado sobre la actividad fenilalanina amonio- liasa (PAL)	119
III.2.3.2.1 Actividad fenilalanina amonio liasa (PAL)	119
III.2.3.3 Efecto del tratamiento combinado sobre la actividad de las enzimas antioxidantes	120
III.2.3.3.1 Actividad superóxido dismutasa (SOD)	120
III.2.3.3.2 Actividad peroxidasa (POX)	121
III.2.3.3.3 Actividad catalasa (CAT)	123
III.2.3.3.4 Actividad ascorbato peroxidada (APX)	124
III.2.4 Conclusiones	126
III.3 Parte II: Aplicación del tratamiento combinado con radiación UV-C y	



aire caliente. Efecto sobre la calidad y senescencia de muestras almacenadas a 0 °C.	
III.3.1 Objetivo	127
III.3.2 Resultados y discusión	128
III.3.2.1 Apariencia general	128
III.3.2.2 Pérdida de peso	128
III.3.2.3 Pérdida de electrolitos	128
III.3.2.4 Actividad respiratoria	129
III.3.2.5 Color superficial	129
III.3.2.6 Contenido de clorofila	131
III.3.2.7 Contenido de compuestos fenólicos	132
III.3.2.8 Actividad antioxidante	133
III.3.2.9 Contenido de proteínas solubles y totales	134
III.3.2.10 Contenido de azúcares totales	135
III.3.3 Conclusiones	137
<b>CONCLUSIONES GENERALES</b>	138
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	141

## **RESUMEN**

## RESUMEN

El brócoli es una hortaliza altamente nutritiva de la cual se consume su inflorescencia. Este órgano se cosecha siendo aún completamente inmaduro, en un estado fisiológico de alto requerimiento de agua, nutrientes y hormonas por parte de la planta madre. El estrés generado por la cosecha desencadena una senescencia acelerada, siendo ésta la principal causa de las pérdidas postcosecha. Si el brócoli es procesado mínimamente para su consumo se induce un estrés adicional muy severo que acelera aún más la senescencia y el deterioro. Con el fin de controlar desórdenes fisiológicos y pérdidas durante la postcosecha se ha hecho uso de diversos tipos de agroquímicos, siendo ésta la principal estrategia de control. Sin embargo, actualmente el uso de estos compuestos está siendo cuestionado debido a los riesgos para la salud humana, el potencial riesgo para el medio ambiente y el desarrollo de resistencia por parte de los patógenos. Una tecnología usada desde hace tiempo para controlar las pérdidas postcosecha es el almacenamiento refrigerado. Esta tecnología por si sola no ha sido suficiente para evitar el deterioro, por lo que se han estudiado nuevas tecnologías amigables para el medio ambiente y la salud humana como complemento de la refrigeración. Entre estas nuevas tecnologías se destacan la radiación ultravioleta C (UV-C) y los tratamientos térmicos de alta temperatura. En este trabajo se determinó el efecto de la aplicación de estas tecnologías (radiación UV-C, tratamiento térmico, y sus combinaciones a 0 y 20 °C) en la conservación postcosecha de brócoli mínimamente procesado. Se utilizaron inflorescencias de brócoli (*Brassica oleracea* L. var. *Italica*) divididas en ramilletes. Se aplicó radiación UV-C (8 kJ.m<sup>-2</sup>), un tratamiento térmico con aire caliente (48 °C 3h), tratamientos combinados (UV-C/térmico) y se evaluó el avance de la senescencia y calidad de las muestras durante el almacenamiento a 0 °C y 20 °C.

Se estudió primeramente la aplicación de radiación UV-C y aire caliente sobre los ramilletes de brócoli, en forma separada, los que posteriormente fueron almacenados a temperaturas de refrigeración. Los principales efectos hallados fueron, un retraso en el amarilleamiento, la activación del sistema antioxidante y un menor aumento en el conteo de hongos y bacterias durante el almacenamiento.

Posteriormente se evaluó el efecto de la combinación de los tratamientos UV-C y térmico durante el almacenamiento a 20 °C. De todas las combinaciones ensayadas, se seleccionó el tratamiento 8 kJ.m<sup>-2</sup> /48 °C durante 3 horas, ya que mantiene de mejor manera la calidad y color superficial. El tratamiento combinado además de retrasar la degradación de clorofila, conserva el contenido de proteínas y no afecta la reducción del contenido de azúcares totales.

El tratamiento combinado induce el sistema de defensa antioxidante no enzimático, y contribuiría a una mejor calidad nutricional ya que mantiene más altos los niveles de antioxidantes no enzimáticos. También podría ayudar a combatir la producción de EROs generada durante la senescencia postcosecha induciendo la activación de las enzimas antioxidantes.

El efecto benéfico del tratamiento combinado sobre la calidad también se observó cuando las muestras fueron almacenadas a 0 °C.

## **INTRODUCCIÓN GENERAL**

## INTRODUCCIÓN GENERAL

### I. BRÓCOLI

#### I.1 ORIGEN

El brócoli es un vegetal originario de Asia Occidental y Europa. El género *Brassica* y la especie *oleracea* también incluye al coliflor, repollo y repollito de Bruselas. La palabra brócoli deriva del italiano *brocco*, que significa brazo o rama y brócoli es el plural de *broccolo* refiriéndose a los numerosos retoños que se desarrollan en esta forma de *Brassica oleracea*. Las plantas originarias todavía crecen en forma silvestre a lo largo de las costas del Mediterráneo y en las costas marítimas de Gran Bretaña y del sudoeste de Europa. De éstas se han derivado, por selección o mutación, las distintas formas de la especie que se cultivan actualmente.

A pesar de ser conocido y consumido en época de los romanos, recién hace 20 años aproximadamente se ha generalizado su cultivo en diversas áreas del mundo, presentando una gran tasa de expansión y un incremento notable de su producción en los últimos años.

#### Clasificación taxonómica

Subdivisión: Angiospermas

Clase: Dicotiledónea

Orden: Brassicales

Familia: Brassicáceas

Género: *Brassica*

Especie: *oleracea*

Variedad: *Itálica*

Nombre científico trinomial: *Brassica oleracea* L. var. *Itálica*

([www.es.wikipedia.org/wiki/Brassica\\_oleracea\\_italica](http://www.es.wikipedia.org/wiki/Brassica_oleracea_italica))



Tabla 1: Variedades botánicas de *Brassica oleracea*

Variedad botánica	Nombre vulgar
<i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>acephala</i> DC.	Col berza
<i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>botrytis</i> L.	Coliflor
<i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>capitata</i> L.	Repollo
<i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>gemmifera</i> Zenker	Repollito de Bruselas
<i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>gongylodes</i> L.	Colirábano
<b><i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>italica</i> Plenck</b>	<b>Brócoli</b>

([www.puc.cl/sw\\_educ/hort0498/HTML/p024.html](http://www.puc.cl/sw_educ/hort0498/HTML/p024.html))

## 1.2 DESCRIPCIÓN

Es una planta de aproximadamente 60 cm cuando esta completamente desarrollada. Las hojas de esta especie son grandes, glabras y presentan nervaduras centrales muy notorias. La superficie foliar está recubierta de ceras epicuticulares que dificultan el mojado, causando el escurrimiento del agua, y otorgan el color verde azulado opaco común en la especie. La raíz es pivotante con raíces secundarias y superficiales. El órgano de interés, es la inflorescencia inmadura (pella), de color verde. Debido al fenómeno de autoincompatibilidad, la variedad presenta polinización cruzada entomófila (principalmente abejas y moscas). Con las otras variedades botánicas de la especie se cruza libremente, y algunos autores sostienen que por su estructura floral más simple, el brócoli sería el progenitor de la coliflor. El fruto es una silicua cilíndrica, dehiscente y glabra.

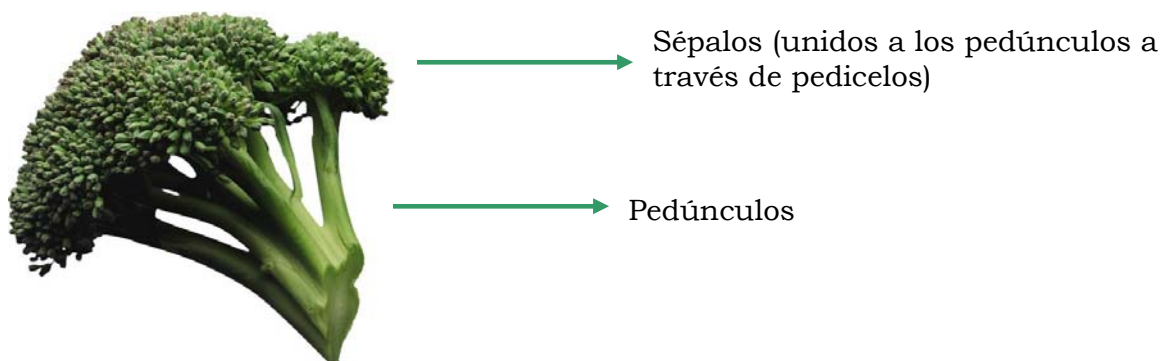
([www.puc.cl/sw\\_educ/hort0498/HTML/p024.html](http://www.puc.cl/sw_educ/hort0498/HTML/p024.html))



Que se consume

Su órgano comestible es la masa de yemas florales y de finos pedúnculos, que se desarrolla en el extremo del tallo central y recibe el nombre de inflorescencia. Puede producir otras inflorescencias laterales más pequeñas que salen de las axilas de las hojas del tallo principal. La inflorescencia es de color verde oscuro, no está cubierta por hojas, y está soportada sobre un tallo floral largo.

Esquema de la inflorescencia de brócoli





### **I.3 GENERALIDADES DEL CULTIVO**

#### Fases del cultivo

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

*De crecimiento:* la planta desarrolla solamente hojas.

*De inducción floral:* la planta, después de haber pasado un número determinado de días con temperaturas bajas, inicia la formación de la flor; al mismo tiempo que está ocurriendo esto, siguen brotando hojas de tamaño más pequeño que en la fase de crecimiento.

*De formación de inflorescencias:* en la yema terminal se desarrolla una inflorescencia y, al mismo tiempo, en las yemas axilares de las hojas ocurre la fase de inducción floral con la formación de nuevas inflorescencias, que serán bastante más pequeñas que la inflorescencia principal.

*De floración:* los tallos que sustentan las partes de la inflorescencia inician un crecimiento en longitud, con apertura de las flores.

*De fructificación:* se forman los frutos (silicuas) y semillas.

#### Necesidades de la planta

Es un cultivo de desarrollo en estación de otoño e invierno; necesita temperatura baja para desarrollar las inflorescencias, que es su interés comercial hortícola.

#### Manejo del cultivo

##### *Siembra y transplante*

El brócoli se siembra en almácigo, y luego se transplanta. Los almácigos se pueden realizar todo el año. Para producción en invierno se hacen en Febrero o Marzo con transplante en Abril, mientras que para producción estival el almácigo se inicia en Noviembre y el transplante en Enero, dependiendo de la variedad y su ciclo. ([www.infoagro.com](http://www.infoagro.com))

Ciclo corto: 50 a 75 días desde transplante a cosecha

Ciclo mediano: 80 a 120 días desde transplante a cosecha

Ciclo largo: más de 150 días desde transplante a cosecha

([www.itescam.edu.mx/principal/sylabus/fpdb/recursos/r2205.DOC](http://www.itescam.edu.mx/principal/sylabus/fpdb/recursos/r2205.DOC))

### Plagas

Minador de hojas (*Liriomyza trifolii*)  
Mosca de la col (*Chorthophilla brassicae*)  
Oruga de la col (*Pieris brassicae*)  
Polilla de las crucíferas (*Plutella xylostella*)  
Pulguilla de la col (*Phyllotreta nemorum*)

### Enfermedades

#### *Producidas por bacterias*

Podredumbre negra de las crucíferas (*Xanthomonas campestris*)  
Podredumbre blanda de las hortalizas (*Erwinia carotovora*)  
Mancha bacteriana de la hoja de las crucíferas (*Pseudomonas syringae*)

#### *Producidas por virus*

Mosaico del coliflor (CaMV)  
Mosaico del nabo (TuMV)  
(Dal Bó y col, 1995)

#### *Producida por hongos*

Hernia de la col (*Plasmodiophora brassicae*)  
Mildiu (*Pernospora parasítia*)  
Alternaria sp (*Alternaria brassicae*)  
Roya (*Albugo candida*)  
Rizoctonia (*Rhizoctonia solani*)  
Mancha angular (*Mycosphaerella brassicicola*)

### Fisiopatías

*Tallo hueco:* es una cavidad en la parte central del tallo de la base de la inflorescencia. La superficie de corte en el pedúnculo se torna de color pardo.

*Amarillamiento de las inflorescencias:* La causa fisiológica es la senescencia de las inflorescencias. La aparición de un color amarillo en las inflorescencias termina con la vida comercial del brócoli.

*Pardeamiento de las flores:* Es una fisiopatía en la que ciertas áreas de las flores no se desarrollan correctamente, mueren y se tornan pardas. Se piensa que es provocada por un desbalance nutricional de la planta.

*Formación prematura de la cabeza:* La inflorescencia comienza a desarrollarse tempranamente provocando la formación de cabezas pequeñas sin valor comercial, es causada por un estrés hídrico y carencia de fertilizante nitrogenado en los primeros estadios de desarrollo.

*Yemas y/o floretes secos:* Este síntoma es causado por la deficiencia de molibdeno.

([www.abccagro.com/hortalizas/brocoli2.asp](http://www.abccagro.com/hortalizas/brocoli2.asp))

([www.infoagro.com/hortalizas/broculi.htm](http://www.infoagro.com/hortalizas/broculi.htm))

#### **I.4 VALOR NUTRITIVO**

La composición nutritiva del brócoli se presenta en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Composición nutritiva del brócoli

	Por 100 g de producto comestible
Proteínas	5,45 g
Lípidos	0,3 g
Glúcidos	4,86 g
Calorías	42
Vitamina A	3500 U.I
Vitamina B1	100 mg
Vitamina B2	210 mg
Vitamina C	118 mg
Calcio	130 mg
Fósforo	76 mg
Hierro	1,3 mg

El brócoli es llamado "la joya de la nutrición" (cita) ya que posee un alto contenido de vitamina C, alto contenido en fibras solubles, bajo contenido en calorías y alto contenido en potasio (Stoppani y Francescangeli, 2000).

([www.inta.gov.ar/sanpedro/info/doc/hor/nf\\_011.htm](http://www.inta.gov.ar/sanpedro/info/doc/hor/nf_011.htm))

**Los glucosinolatos**

Los glucosinolatos son un importante grupo de fitoquímicos presentes en forma abundante en las plantas de la familia de las Brassicáceas. Estos compuestos pertenecen al metabolismo secundario, y son ricos en azufre. Son químicamente estables hasta que se ponen en contacto con la enzima mirosinasa, la cual se almacena en compartimentos diferentes respecto a los glucosinolatos. El rol fisiológico de éstos compuestos es la defensa contra herbívoros. Cuando se produce un daño tisular, los glucosinolatos son liberados de las vacuolas y se ponen en contacto con la enzima mirosinasa, la cual rápidamente cataliza la hidrólisis del compuesto. El aglicón es inestable y se descompone en diferentes compuestos: isotiocianatos, tiocianatos o nitrilos, los cuales son normalmente repelentes para los insectos herbívoros (Halkier y Gershenzon, 2006). Diversos estudios epidemiológicos han demostrado que en humanos los isotiocianatos tienen un efecto protector contra distintos tipos de cáncer (Das y col, 2000). El consumo continuo de brócoli y otras crucíferas con alto contenido de glucosinolatos disminuye el riesgo de contraer este tipo de patologías (Das y col, 2000). Por ejemplo, la hidrólisis de la glucorafanina, un glucosinolato que se encuentra en grandes cantidades en brócoli, produce un isotiocianato, el sulfurofano que tiene un potente efecto contra el cáncer, el glucosinolato glucobrasicina presente también en brócoli se hidroliza a indol-3-carbinol que también es un conocido anticancerígeno (Keck y Finley, 2004).

**I.5 COSECHA**

Para el consumo de brócoli se cosechan las inflorescencias inmaduras. La recolección de las mismas comienza cuando la longitud del tallo alcanza 5 ó 6 cm. Posteriormente, se van recolectando a medida que se van produciendo los rebrotes de inflorescencias laterales. En general, las cabezas de brócoli se cosechan con algunas de las hojas que las rodean para que queden protegidas. La cosecha se realiza a mano y se debe comenzar en las primeras horas de la mañana y se deben mantener en condiciones de alta humedad para minimizar la deshidratación. Debido a que es un órgano que se cosecha en estado inmaduro y a que posee una tasa respiratoria muy elevada, se trata

de un producto altamente perecedero, por lo que luego de la cosecha, se recomienda bajar rápidamente la temperatura.

Un brócoli de buena calidad debe tener las flores bien cerradas y de color verde oscuro brillante, la cabeza debe ser compacta (firme a la presión de la mano) y el tallo bien cortado y de la longitud requerida. ([www.angelfire.com/ia2/ingenieriaagricola/brocoli.htm](http://www.angelfire.com/ia2/ingenieriaagricola/brocoli.htm), anónimo, 2004).

## **I.6 COMERCIALIZACION**

El impulso que ha tenido el brócoli en E.E.U.U. en los últimos años demuestra que existe un gran potencial de mercado para esta hortaliza. Su cultivo se introdujo en ese país a principios del siglo XIX y actualmente la superficie cultivada supera las 40.000 ha y la producción ronda las 450.000 Ton/año. El consumo entre los estadounidenses creció de 0,7 a 2,5 kg/cápita/año entre 1970 y 1994. En Europa, la superficie cultivada va aumentando paulatinamente, y aunque la producción total en toda la Comunidad Europea no supera las 35.000 Ton/año; en ciertas regiones ha tenido un desarrollo marcado, como por ejemplo en Murcia, donde se pasó de 940 ha en 1989 a 2200 ha en 1993. En Asia, a pesar de ser un cultivo también reciente, hay producción en diferentes países. Se destaca Japón, donde se ha realizado un significativo mejoramiento genético de esta variedad botánica. En Argentina, no hay registros precisos acerca del consumo de brócoli. Datos de la década de los 80 indican sólo 0,5 kg/habitante/año, pero durante el período 1990/95 los volúmenes históricos de ingreso al Mercado Central de Buenos Aires han crecido un 265 % (2285,4 Ton en 1995). La producción se concentra en la zona del conurbano bonaerense, y aunque no hay datos precisos sobre superficie cultivada, la oferta del producto sigue creciendo. Como en todo el mundo, la difusión en los medios locales de las cualidades nutritivas y propiedades anticancerígenas del brócoli ha servido de disparador para atraer a un segmento de consumidores que manifiesta una preocupación creciente por la salud. Los EEUU importan alrededor de 45.000 Ton anuales de brócoli, lo que constituye un mercado potencial para exportar brócoli de Argentina si se logra la calidad adecuada (Stoppani y Francescangeli, 2000). ([www.inta.gov.ar/actual/ant/2007/may08bis.htm](http://www.inta.gov.ar/actual/ant/2007/may08bis.htm))

## I.7 MANEJO POSTCOSECHA DE BRÓCOLI

### **Temperatura y humedad relativa óptima**

La refrigeración es extremadamente importante para conseguir una vida de anaquel adecuada. Se requiere una temperatura de 0 °C y una HR >95 % para optimizar la vida de almacenamiento (21-28 días). El brócoli almacenado a 5 °C puede tener una vida útil de 14 días, pero a 10 °C es de sólo 5 días. Generalmente, el brócoli se enfría rápidamente con la inyección de una mezcla de hielo-agua (liquid-icing) a los cartones encerados en los que se ha empacado el producto en el campo. El hidrogenfriamiento y el enfriamiento con aire forzado también pueden usarse, pero el manejo de la temperatura durante la distribución es más crítico que el empacado con hielo.

### **Daño por congelación**

Puede ocurrir si se agrega sal a la mezcla hielo-agua o cuando el brócoli sin hielo se almacena a una temperatura inferior a -1 °C. Las áreas dañadas (congeladas y después descongeladas) resultan de color verde oscuro y apariencia translúcida, pudiendo tornarse pardas y volverse muy susceptibles a la pudrición bacteriana.

### **Tasa de respiración**

Las cabezas de brócoli tienen tasas de respiración relativamente altas:

<b>Temperatura</b>	0 °C	5 °C	10 °C	15 °C	20 °C
<b>mL CO<sub>2</sub> kg h<sup>-1</sup></b>	10-11	16-18	38-43	80-90	140-160

La tasa de respiración de las flores cortadas es ligeramente superior al doble de la tasa respiratoria de las cabezas intactas por unidad de peso.

### **Tasa de producción de etileno y sus efectos**

El brócoli presenta una tasa de producción de etileno muy baja, menos de 0.1  $\mu\text{L kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$  a 20 °C, pero es extremadamente sensible al etileno presente en el ambiente postcosecha. El amarillamiento de las flores es el síntoma más común. El contacto con 2 ppm de etileno a 10 °C reduce la vida de anaquel en un 50 %.

**Efecto de las atmósferas controladas (AC)**

En general, el brócoli se puede almacenar adecuadamente en atmósferas conteniendo 1-2 % O<sub>2</sub> con 5-10 % CO<sub>2</sub> en un intervalo de temperatura de 0-5 °C. Aunque en condiciones controladas tales concentraciones bajas de O<sub>2</sub> extienden la vida de anaquel, las fluctuaciones de temperatura durante el manejo comercial hacen que estas concentraciones sean riesgosas pues el brócoli puede producir volátiles azufrados de olor desagradable. Como resultado, se recomienda una tasa de recambio de aire alta en los contenedores marítimos en los que se embarca el brócoli. La mayoría de los empaques con atmósfera modificada para brócoli están diseñados para mantener tanto el O<sub>2</sub> como el CO<sub>2</sub> a concentraciones de cerca del 10 % para evitar el desarrollo de estos volátiles de olores indeseables.

**Daño físico**

El manejo descuidado durante la cosecha puede causar daño mecánico a las flores, lo cual puede exacerbar la producción de etileno y acelerar la senescencia. Asimismo, las lesiones mecánicas en los tejidos representan una vía de acceso a organismos patógenos que conducen a un incremento en la incidencia de pudriciones.

**Consideraciones especiales**

La vida de almacenamiento varía considerablemente entre cultivares de brócoli. La vida útil (aparición de cualquier flor amarilla = terminación de la vida útil) puede variar de 12 a 25 días dependiendo del cultivar: Vida útil de diferentes cultivares de brócoli almacenados a 5 °C, y 95 % HR.

Corta (< 20 días): Baccus, Brigadier, Cruiser, De Cicco, Mariner, Zeus

Media (20 a 25 días): Embassy, Emperor, Galaxy, Gem, Green Lady, Green Valiant, Pinnacle

Larga (>25 días): Greenbelt, Marathon, Packman, Pirate, Shogun, Skiff

(Cantwell y Suslow, 1997)

([www.postharvest.ucdavis.edu/Produce/ProduceFacts/Espanol/Brocoli/html](http://www.postharvest.ucdavis.edu/Produce/ProduceFacts/Espanol/Brocoli/html))

## **I.8 FISIOLÓGÍA POSTCOSECHA DE BRÓCOLI**

El proceso de cosecha de un órgano implica la separación del mismo de la planta madre. En consecuencia, se produce un severo estrés ya que los órganos cosechados pierden drásticamente los aportes de energía, nutrientes, minerales, y hormonas provenientes de la planta madre. En muchos casos esto desencadena rápidamente el proceso de senescencia, por lo que el tiempo de vida postcosecha para estos vegetales es corto (King y Morris, 1994).

Del brócoli se consume su inflorescencia, la cual se cosecha en un estado completamente inmaduro. Precisamente, estos órganos requieren un aporte más importante de nutrientes, hormonas y energía por lo que se desencadena una senescencia muy acelerada durante la postcosecha. Su efecto más notorio es la rápida pérdida de clorofila de los sépalos de las flores inmaduras (King y Morris, 1994).

El corte y daño producido durante la cosecha aumenta la producción de etileno en brócoli 5-10 veces, lo cual acelera aún más la senescencia. Este pico de etileno puede ser reducido por efecto del almacenamiento refrigerado (Tian y col, 1994; Pogson y Morris, 1997). La pérdida de clorofila en brócoli puede ser retrasada por inhibidores de la síntesis de etileno y acelerada por la aplicación exógena de etileno y ácido 1-aminociclopropano 1-carboxílico (ACC) (Aharoni y col, 1985; Tian y col, 1994). Las citoquininas retrasan notablemente la senescencia postcosecha de brócoli, posponen la pérdida de clorofila, de proteína y la deshidratación, de todos modos su aplicación comercial no se encuentra permitida (Costa y col, 2004).

El brócoli posee una alta tasa respiratoria en la postcosecha, pero el almacenamiento refrigerado puede reducirla y prolongar la vida postcosecha (King y Morris, 1994). Una vez cosechados los brócolis respiran casi un 1 % de su peso seco por hora (King y Morris, 1994), la tasa respiratoria declina a más del 65 % dentro de las 12 horas después de la cosecha a 20 °C y luego se estabiliza (King y Morris, 1994). Atmósferas controladas con alta concentración de CO<sub>2</sub> y bajas de O<sub>2</sub> también reducen la tasa respiratoria (Aharoni y col, 1985).

Durante el almacenamiento a 20 °C se produce una disminución del contenido de ácidos grasos y un aumento de la peroxidación de lípidos que se



correlacionan con el deterioro que se produce durante la postcosecha (Zhuang y col, 1997).

## **II. SENESCENCIA**

### **II.1 La senescencia como un tipo de muerte celular programada**

La muerte celular programada, en inglés, “programmed cell death” (PCD) es definida como un proceso de autodestrucción de la célula disparado por factores externos o internos. Esta es mediada a través de un programa genético que se ha demostrado juega un rol crucial en el desarrollo y supervivencia de diversos organismos (Pontier y col, 2004).

Una de las PCD más características en plantas es la protección contra organismos patógenos a través de la denominada respuesta hipersensible. Cuando una planta es infectada por un organismo patógeno la célula en el sitio de infección acumula altas concentraciones de especies reactivas de oxígeno, compuestos fenólicos y muere, formando un pequeño halo circular alrededor de la zona de infección llamada lesión necrótica. La función de la lesión necrótica es rápidamente rodear al patógeno aislándolo y previniendo que se expanda a los tejidos sanos. En la respuesta hipersensible las señales liberadas por el patógeno inician rutas bioquímicas que conducen a la muerte de la célula.

Existen otros numerosos tipos de muerte celular programada y la senescencia es una de ellas. La senescencia se puede representar como una secuencia de eventos metabólicos que ocurren en la fase final del desarrollo y culmina en la muerte celular programada, de toda la planta, órganos, tejidos o células. Es un proceso activamente ordenado que resulta en cambios del metabolismo altamente coordinados y el desmantelamiento programado de la célula (Jones, 2004).

#### Etapas de la senescencia

1. Iniciación: Un estímulo hormonal y/o ambiental desencadena la senescencia y se produce un cambio a nivel genético que conduce a la activación de algunos genes e inactivación de otros, se produce un cambio en el estado redox de las células y se redirecciona el metabolismo, hay rutas metabólicas que se aceleran y otras que dejan de funcionar.

2. Reorganización: Activación de rutas que generan movilización y reciclado de nutrientes. Desorganización de cloroplastos, no se genera energía a partir de la luz sino a partir de las reservas. Se produce la diferenciación reversible de organelas, una característica de senescencia es la transición de cloroplasto a gerontoplasto (cloroplasto envejecido).
3. Fase terminal: Liberación de radicales libres, pérdida irreversible de integridad y viabilidad de las células. El estrés originado por radicales libres estimula la generación de antibióticos y otros compuestos que actúan en defensa contra patógenos, siendo ésta una respuesta secundaria de la planta.

#### La senescencia es un proceso genéticamente programado

Durante la senescencia, algunas organelas son destruidas mientras otras permanecen activas, el cloroplasto es la primer organela en deteriorarse, no así el núcleo y las mitocondrias que permanecen intactas hasta las últimas etapas, dado que hay cambios en la expresión de genes y generación de energía que se conservan hasta el final.

Los tejidos senescentes realizan procesos catabólicos que requieren de la síntesis *de novo* de varias enzimas hidrolíticas, como proteasas, lipasas, nucleasas, enzimas que degradan clorofila. La síntesis de enzimas específicas de la senescencia involucra la activación de genes específicos.

La expresión de muchos genes es reducida durante la senescencia pero la expresión de muchos otros es activada.

## **II.2 Tipos de senescencia**

La senescencia ocurre en varios tipos de órganos y en respuesta a numerosos factores. La senescencia de la planta entera luego de un ciclo reproductivo es llamada senescencia monocárpica. Otros tipos de senescencia incluyen la senescencia de los brotes aéreos de las plantas herbáceas perennes, la senescencia estacional de las hojas, por ejemplo en árboles caducifolios, la senescencia secuencial, en la cual el órgano muere luego de alcanzar cierta edad, senescencia de células especializadas como tricomas, traqueidas, etc. Los disparadores de los diferentes tipos de senescencia son varios; pueden ser

internos como en la senescencia monocárpica o externos como la longitud del día o la temperatura. Independientemente de cual sea el estímulo inicial, los diferentes patrones de senescencia podrían compartir el mismo programa interno en el cual un gen regulador de la senescencia inicia una cascada de expresión de genes secundarios que eventualmente conducen a la senescencia y muerte (Zeiger y Taiz, 2004).

### *Senescencia foliar*

Aunque el término “senescencia” usualmente evoca la idea de irreversibilidad, el proceso de degradación de los cloroplastos y redistribución de nutrientes es reversible, y las hojas pueden “reverdecir” aún después que han perdido el 90 % de la clorofila y proteínas (Zavaleta-Mancera y col, 1999).

La senescencia foliar es un proceso de importancia económica. Por ejemplo, los procesos de senescencia acortan la vida postcosecha de muchas hortalizas.

## **II.3 Causas de la senescencia**

La senescencia puede iniciarse en un órgano unido a la planta o en la planta entera como consecuencia de la edad o determinado estado fisiológico. Sin embargo, la senescencia también se puede desencadenar por diversos factores bióticos y abióticos causantes de estrés: infección por patógenos, déficit de agua o nutrientes, estrés oxidativo, etc. Los estudios de las vías de señalización de respuesta a estrés, han mostrado que existen muchos genes involucrados en éste proceso que también están vinculados a senescencia. De todas maneras, en los casos de senescencia no inducida por estrés, muchos de los genes que se expresan en estas situaciones se manifiestan luego de iniciada la senescencia, por lo que se considera que dicha expresión se activa porque la senescencia condujo a una situación de estrés (Buchanan-Wollaston y col, 2003).

La senescencia en plantas puede ser inducida por oscuridad, en esta situación se produce una disminución de la fotosíntesis y una consecuente disminución en los niveles de azúcares, induciendo la senescencia (Hensel y col, 1993). Otro factor que actúa como acelerador del proceso de senescencia es el estrés oxidativo. Asimismo, la degradación de macromoléculas que acompaña a la

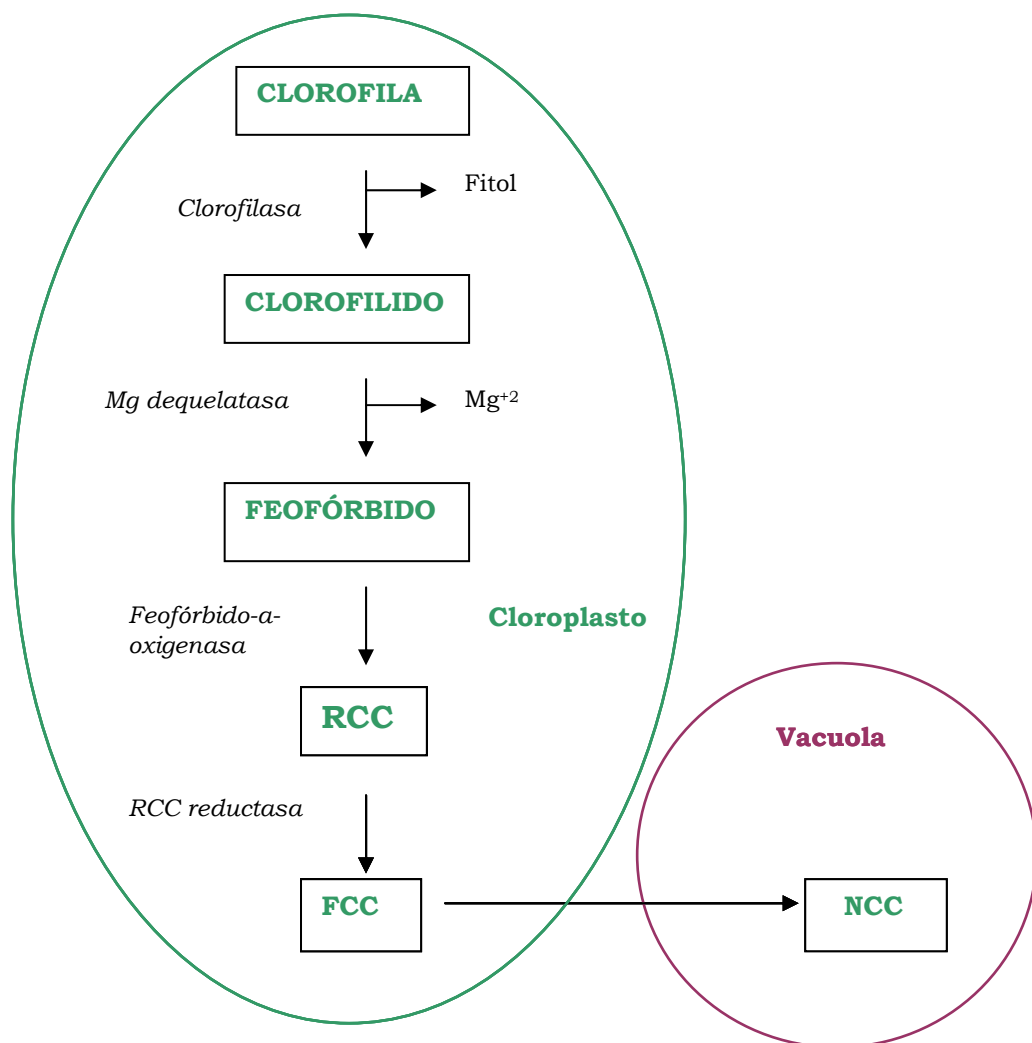
senescencia genera estrés oxidativo ya que se producen gran cantidad de especies reactivas del oxígeno (EROs) y radicales libres, que aceleran aún más la senescencia (Thompson y col, 1998).

#### **II.4 Alteraciones metabólicas que ocurren durante la senescencia**

Los tejidos en senescencia muestran un activo metabolismo destinado a reciclar nutrientes. Cuando un órgano entra en senescencia cesa la fotosíntesis (si el órgano previamente la realizaba) y deja de ser autótrofo para pasar a tener un metabolismo heterótrofo dominado por un intenso catabolismo. El objeto central de la senescencia es proveer energía y nutrientes a otras partes de la planta que puede necesitarla para diversos usos: acumulación de reservas en semillas, desarrollo de frutos, desarrollo de flores, formación de polen, etc.

##### *Degradación de clorofilas*

El amarillamiento de algunos órganos durante la senescencia es el rasgo característico de la senescencia y está dada principalmente por la degradación de clorofilas. El catabolismo de la clorofila comienza con el desmantelamiento de los complejos proteína-clorofila en las membranas tilacoidales de los cloroplastos. Una vez liberada, la clorofila sufre la eliminación del fitol por la enzima clorofilasa para dar un compuesto hidrosoluble, el clorofilido. El  $Mg^{2+}$  es luego removido por la enzima Mg-dequelatasa para generar feofórbido. En el paso subsiguiente la enzima feofórbido-a-oxigenasa transforma el feofórbido en catabolito rojo de la clorofila (RCC), luego mediante la enzima RCC reductasa se forman los metabolitos fluorescentes de clorofila (FCC) que son transportados a la vacuola. En esta organela son modificados hacia metabolitos no fluorescentes de clorofila (NCC) y almacenados (Matile y col, 1999) Esquema 1.



**Esquema 1:** Ruta de degradación de clorofila (De Matile y col, 1999).

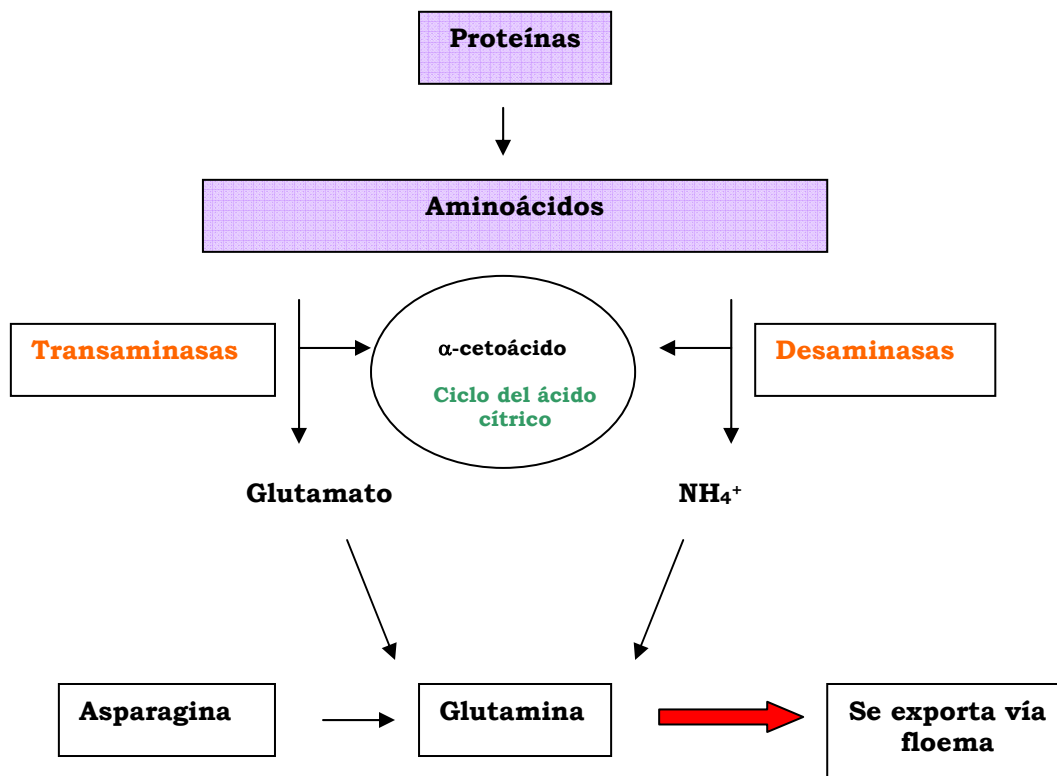
### Degradación de proteínas

La degradación de proteínas es probablemente el proceso catabólico más significativo que tiene lugar durante la senescencia ya que la removilización de aminoácidos es muy importante para el desarrollo de otros órganos de la planta. En la senescencia ocurre una activa proteólisis a cargo de proteasas específicas que se transcriben *de novo* durante este período. Se han identificado genes de proteasas asociados a la senescencia en diversas especies.

Muchas de las proteínas están localizadas en los cloroplastos y es probable que la etapa inicial de la degradación de las proteínas ocurra en estas organelas (Buchanan-Wollaston, 1997). Por tal razón la degradación de proteínas cloroplásticas es un proceso clave para la exportación de nitrógeno durante la senescencia foliar (Feller y Fischer, 1994). Los cloroplastos son desmantelados en una etapa temprana de la senescencia caracterizada por una disminución en la capacidad fotosintética y una pérdida de proteínas involucradas en los procesos de asimilación (Feller y Fischer, 1994; Feller, 2004).

El nitrógeno presente en proteínas y ácidos nucleicos es convertido a aminoácidos. Los aminoácidos son procesados de modo de reciclar el nitrógeno como glutamina y asparagina. La fuente de amonio y glutamato para este proceso se produce a través de transaminación y desaminación de aminoácidos liberados de las proteínas degradadas (Feller y Fischer, 1994). Finalmente se produce glutamina por acción de la glutamina-sintetasa. La glutamina se convierte también en asparagina, que junto con la glutamina es trasladada por el floema desde las hojas senescentes (Feller y Fischer, 1994). Un aumento en la expresión de genes de glutamina-sintetasa y asparagina sintetasa ha sido observado en tejidos senescentes.

Por otro lado, el esqueleto carbonado de los aminoácidos puede entrar a la gluconeogénesis como piruvato, acetil CoA o  $\alpha$ -cetoglutarato (Buchanan-Wollaston, 1997). Esquema 2.



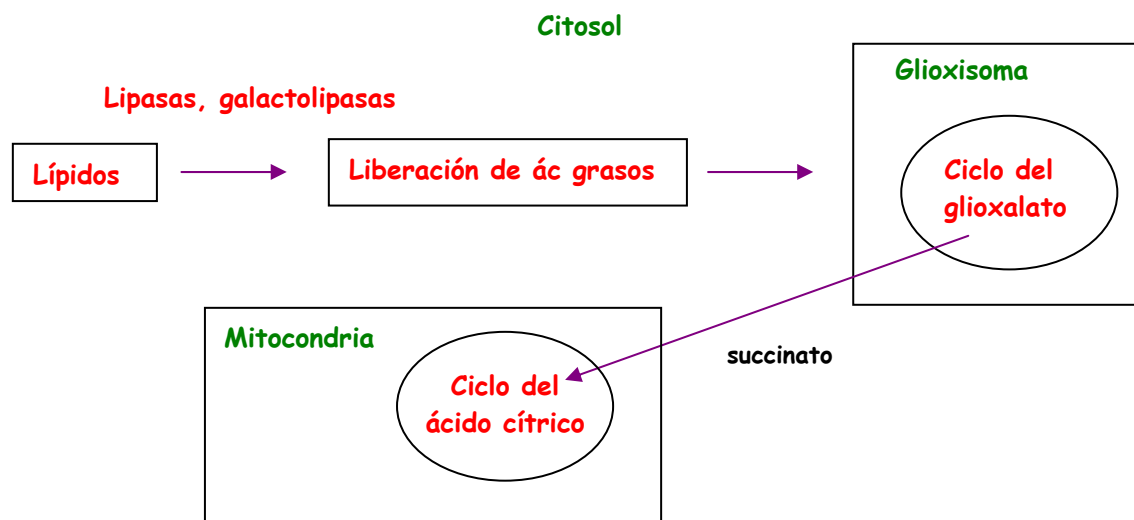
**Esquema 2:** Ruta de degradación de proteínas

### Degradación de lípidos

Las membranas celulares constituyen una reserva de lípidos que son movilizadas y utilizadas durante la senescencia. En hojas senescentes los niveles de lípidos totales disminuyen, incluidos los de las membranas tilacoidales. La actividad respiratoria en un tejido senescente es alta y es necesario un continuo abastecimiento de energía que permita los procesos de degradación y movilización. El suplemento de fotosintatos para mantener la respiración va disminuyendo debido al desmantelamiento de los cloroplastos. En su reemplazo, hay evidencia que sostiene que los componentes de las membranas celulares son metabolizados en hojas senescentes para proveer de energía a la respiración (Wanner y col, 1991). El cociente respiratorio de hojas senescentes tiende a ser bajo lo que indica que el sustrato para la respiración son ácidos grasos más que sacarosa. A partir de la degradación de lípidos se generan moléculas de acetil-CoA las que pueden utilizarse directamente para la respiración o bien ser utilizadas por la vía del glioxalato y gluconeogénesis para la síntesis de azúcares que podrían ser exportados. También enzimas del ciclo del glioxalato como la malato-sintasa y la isocitrato-sintasa aumentan



durante la senescencia. Los galactolípidos, los cuales son los principales componentes de las membranas celulares, podrían ser metabolizados vía el ciclo del glioxalato durante la senescencia (Vicentini y Matile, 1993). Por otro lado, el aumento en la formación de especies reactivas al oxígeno que se da durante la senescencia podría iniciar la peroxidación lipídica, contribuyendo a la degradación de los mismos. Esquema 3.



**Esquema 3:** Ruta de degradación de lípidos

#### Degradación de ácidos nucleicos

Los ácidos nucleicos, en particular el ARN ribosomal, son una importante fuente de carbono, nitrógeno y especialmente fósforo en la célula senescente. Los niveles de ADN permanecen relativamente constantes a medida que avanza la senescencia, pero los niveles de ARNr disminuyen. Se ha visto un incremento en la actividad de ARNasas en tejidos senescentes. En Arabidopsis genes de ARNasas aumentan su expresión en condiciones limitante de fósforo, y uno de estos genes, el RNS2, es también expresado en altos niveles en hojas senescentes y es probable que sea importante para la degradación de ARN y removilización del fósforo en hojas senescentes. Las purinas y pirimidinas, resultado de la degradación de ácidos nucleicos, son convertidas a carbono y nitrógeno para exportar. El aumento en los niveles de ureasa y xantina

oxidasa observada en peroxisomas de hojas senescentes indicaría que el catabolismo de purina tendría lugar en esta organela (Vicentini y Matile, 1993).

#### Alteración de membranas

El proceso de senescencia está vinculado a cambios en el sistema de membranas que mantiene la compartimentalización de las células.

Las membranas cambian su composición ya que hay un aumento de la actividad fosfolipasa lo que conduce a la degradación de fosfolípidos. Este factor más la degradación de triglicéridos y la peroxidación lipídica contribuye a un cambio en la viscosidad de las membranas y desorganización de las mismas. Esto ocasiona un aumento en la permeabilidad conduciendo a la pérdida de compartimentalización y a la pérdida de agua, generando deshidratación (Thompson y col, 1998).

#### Desorganización celular

Durante la senescencia se producen cambios citológicos importantes: reducción en el número de ribosomas, transición de cloroplastos hacia gerontoplastos, desaparición de los gránulos de almidón, pérdida de densidad en los tilacoides, se forman plastoglobulos que contiene material lipídico, el retículo endoplásmico tubular se transforma en vesicular, posteriormente desaparecen el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi, y se desintegran las membranas vacuolares. Las mitocondrias muestran algunos cambios de tamaño y morfología en las primeras etapas, pero se mantienen funcionales hasta el final de la senescencia. Los núcleos también se mantienen estables durante la senescencia hasta la etapa final donde las membranas se alteran, se llenan de vesículas y se pierde la cromatina (Gan y Amasino, 1997).

## **II.5 Reguladores de la senescencia**

### Etileno

El etileno es una hormona reguladora de muchos procesos vegetales tales como la germinación, el desarrollo de la semilla, maduración de frutos y senescencia de las flores. El etileno se encuentra también está involucrado en respuesta a

factores externos como el daño mecánico, ataque de patógenos, y otros tipos de estrés causado por factores ambientales como ozono o radiación UV. En frutos climatéricos el etileno promueve la maduración induciendo la expresión de muchos genes de enzimas necesarias para el proceso de maduración y en flores parece tener un rol en la regulación de la senescencia. Esta hormona, si bien tiene un rol importante en la senescencia no es el desencadenante de la misma.

La síntesis de etileno comienza con el aminoácido metionina que luego es transformado en S-adenosil metionina (SAM) por la enzima SAM-sintetasa, luego, por medio de la enzima ACC sintasa se forma ACC (ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico) que por acción de la enzima ACC oxidasa se transforma en etileno (Adams y Yang, 1979). En maduración de frutos, pétalos senescentes de flores, y poscosecha de brócoli, entre otros, se detectó un aumento en la expresión de genes que codifican para estas dos enzimas. (Hamilton y col, 1990; Park y col, 1992; Pogson y col, 1995). Experimentos con plantas transgénicas donde la expresión del gen es bloqueada (antisentido de ACC oxidasa) mostraron que la senescencia en las hojas fue retrasada 10 a 14 días y que éstas se mantuvieron fotosintéticamente activas durante este período. Sin embargo, una vez iniciada la senescencia ésta se emparejó con las plantas de tipo salvaje (John y col, 1995).

Por otro lado, plantas de tomate con la mutación *never ripe* donde ha sido bloqueada la percepción del etileno, produce fruta que madura muy lentamente (Lanahan y col, 1994).

### Citoquininas

Las citoquininas son hormonas esenciales para el desarrollo de las plantas. No se conocen mutantes que no sinteticen estas hormonas, por lo que se cree que son indispensables para la viabilidad vegetal. Las citoquininas promueven la división celular, la formación y crecimiento de brotes laterales, la movilización de nutrientes hacia las hojas, la germinación de las semillas, el desarrollo de brotes y la maduración de los cloroplastos. Promueven la expansión celular en hojas y cotiledones, al igual que las auxinas, por un incremento en la extensibilidad mecánica aunque sin bombeo de protones.

En el proceso de senescencia las citoquininas retrasan marcadamente el progreso de la misma. La senescencia está regulada por un balance hormonal

dado por los niveles de citoquininas y de etileno, es por ello que las citoquininas se podrían utilizar para mantener más tiempo el color verde de las hojas de hortalizas hasta su consumo.

Las citoquininas son sintetizadas en el meristema de la raíz y transportadas por el xilema al resto de la planta. Se ha visto que los niveles de citoquininas en xilema disminuyen cuando la senescencia es iniciada, y se ha sugerido que un bajo nivel de citoquininas podría causar el comienzo de la senescencia. Las citoquininas son un regulador natural de la senescencia y las mismas pueden inhibir la transcripción de genes asociados a la senescencia (Zeiger y Taiz, 2002).

Una prueba concluyente del rol de las citoquininas en senescencia se obtuvo mediante experimentos realizados con plantas de tabaco a las que se les incorporó un gen de isopentenyltransferasa (IPT, enzima clave en la síntesis de citoquininas) bajo la regulación de un promotor SAG12 (un gen específico de senescencia de *Arabidopsis*). En estas plantas, este gen sólo se transcribe durante la senescencia foliar. Consecuentemente, las hojas de las plantas transgénicas no mostraron signos de senescencia, la actividad fotosintética fue alta y se produjeron más flores (Gan y Amasino, 1995).

### Otras hormonas

Existen otras hormonas que participan en la senescencia

Acido abscísico (ABA): Promueve la senescencia de las hojas:

Por efecto propio

Por estimulación de la biosíntesis de etileno

Acido jasmónico: Promueve la senescencia

Poliaminas: Son inhibidores de la senescencia, ellas inhiben el aumento de ARNasas, proteasas, peroxidasas; reduce el periodo de senescencia de protoplastos, induce síntesis de ADN y actividad mitótica, promueve la síntesis de macromoléculas, estabiliza la membrana de los tilacoides, mantiene alto el contenido de las proteínas y previene la pérdida de clorofila en hojas.

### **III. VEGETALES FRESCOS CORTADOS**

#### **III.1 Definición**

Los vegetales frescos cortados pueden ser conocidos o denominados también como:

**Vegetales mínimamente procesados (minimally processed)**

**Productos procesados en fresco**

**Productos listos para consumir (ready to eat)**

**Productos frescos cortados (fresh cut)**

**Vegetales cuarta gama**

Se pueden encontrar diversas definiciones de este tipo de productos en la literatura:

- a. Hortalizas y frutas frescas limpias, trozadas y envasadas que mantienen sus propiedades naturales y que están listas para ser consumidas.
- b. Aquellas frutas y hortalizas procesadas para aumentar su funcionalidad sin cambiar de forma apreciable sus propiedades originales.
- c. Son productos frescos que se procesan con el objetivo de proveer al consumidor de un alimento listo para ser consumido (ready-to-eat) con características similares a los productos frescos.

El consumo de frutas y hortalizas en la dieta diaria tiene un efecto benéfico para la salud, ya que son una excelente fuente de vitaminas, minerales y fibra, además de poseer bajo contenido calórico. Sin embargo este consumo es todavía muy bajo, considerando las recomendaciones hechas por los profesionales de la salud. La introducción en los mercados de los productos frescos cortados es una forma de incrementar el consumo de frutas y hortalizas, debido a su atractiva presentación, apariencia y sabor. (Martín-Belloso y Rojas-Graü, 2005).

El procesamiento mínimo de productos frutihortícolas frescos es una tendencia de consumo que se encuentra en gran expansión, ya que partir de los años 80, la población mundial empezó a tener conciencia acerca de la relevancia que tiene para la alimentación la ingesta de frutas y hortalizas frescas, situación que ha

ido provocando modificaciones graduales en los hábitos alimentarios.

Además, entre otros fenómenos socioeconómicos que han ocurrido últimamente, se observa que en ciertos sectores de la población se ha reducido el número de integrantes de la familia, ha aumentado el número de personas que viven solas y de hogares en donde ambos integrantes de la pareja trabajan fuera del mismo, lo cual ha provocado un cambio en el estilo de vida y en las preferencias alimenticias. El ritmo de vida actual de determinados segmentos de la población, los cuales tienen un nivel de actividad y ocupación alto, evidencian una menor disponibilidad de tiempo para las tareas domésticas, por lo que se tiende a utilizar alimentos preparados, precocidos, etc. En consecuencia entre las alternativas que se pueden ofrecer para satisfacer las necesidades de estos consumidores, figuran los vegetales mínimamente procesados.

Por otro lado, los consumidores demandan productos libres de defectos, que tengan un grado de madurez óptimo, que posean una elevada calidad organoléptica y nutricional, inócuos y libres de compuestos tóxicos (Watada y col, 1996).

El procesado mínimo comprende distintas operaciones que pueden resumirse en: recepción; selección y clasificación; pre-enfriado; acondicionamiento; pelado; cortado; lavado/desinfección; tratamientos; escurrido; envasado; refrigeración.

Los vegetales frescos cortados se deterioran mucho más rápidamente que los productos intactos como resultado directo de las heridas asociadas al procesamiento, el cual conduce a numerosos cambios físicos y fisiológicos que afectan la calidad del alimento (Saltveit, 1997)

## **III.2 Efectos del procesado**

### III.2.1 Intensidad respiratoria y deshidratación

Como resultado del estrés sufrido por el procesamiento la tasa respiratoria aumenta. Por ejemplo, en brócoli la tasa aumenta 1,4 veces y en lechuga cortada se incrementa 2 veces.

El aumento de la relación superficie/volumen en los productos procesados incrementa enormemente la pérdida de agua. En kiwi, por ejemplo, el trozado

y el pelado incrementa la pérdida de peso respecto al fruto entero (Agar y col, 1999).

### III.2.2 Producción de etileno

La producción de etileno aumenta significativamente como respuesta al corte. En tomates cortados en discos la producción de etileno se incrementa 20 veces en comparación con el fruto entero. También en kiwi cortado la producción de etileno aumenta 16 veces, la producción de etileno en general es proporcional a la intensidad del estrés generado (Watada y col, 1990).

### III.2.3 Pérdida de firmeza

La pérdida de firmeza es otro factor a tener en cuenta en productos frescos cortados. La firmeza está dada por la integridad de las paredes celulares y el grado de hidratación de los productos. En kiwi, por ejemplo, rodajas almacenadas durante 2 días a 2 °C pierden el 50 % de su firmeza inicial. En general, la actividad de muchas enzimas que degradan la pared celular se incrementa frente a aumentos en la producción de etileno, en este caso inducido por el procesamiento del vegetal. Asimismo, Varoquaux y col. (1990) sugieren que hay una hidrólisis enzimática de la pared celular producto del corte donde enzimas pectinolíticas y proteolíticas son liberadas en los tejidos.

### III.2.4 Alteraciones microbiológicas

Una barrera que protege contra la contaminación microbiológica a los vegetales es su cáscara o cubierta. Los vegetales provienen del campo con una carga microbiana inicial, y si el vegetal no es desinfectado, al producirse el corte o el pelado, este se contaminará. Se sabe que la presencia de patógenos en los vegetales mínimamente procesados obedece a la contaminación en algunos de los puntos de la cadena de producción de los mismos (Díaz-Cinco y col, 2005).

### III.2.5 Alteraciones del color

Una de las principales reacciones que ocurre como consecuencia del procesado es el pardeamiento enzimático. El procesamiento destruye la compartimentalización celular, poniendo en contacto los compuestos fenólicos con las enzimas polifenoloxidasas (PPO), por lo que se produce su oxidación a

quinonas, las que a su vez experimentan procesos de polimerización que dan lugar a compuestos coloreados denominados melaninas.

Otras alteraciones de color son la formación de superficies blanquecinas en zanahorias “white blush or white bloom”, causada por una deshidratación en la superficie del corte y la posterior síntesis de lignina.

También se puede reducir la concentración de pigmentos verdes y acumulación de amarillos (“yellowing or degreening”) en lechuga, coliflor y brócoli; a causa de la degradación de clorofilas.

#### III.2.6 Pérdida de nutrientes y características organolépticas

El procesamiento puede contribuir a la pérdida de nutrientes por solubilización de los mismos en el agua de lavado o por eliminación de alguna parte del vegetal. Generalmente el contenido de vitamina C disminuye en la mayoría de los tejidos procesados.

Los cambios que ocurren dentro de los perfiles de aromas de los diferentes productos pueden ser muy importantes y afectar la aceptación del consumidor. Por ejemplo, en melón precortado se produce una disminución de ésteres y síntesis de terpenoides en 24 hs. (Lamikanra y Richard, 2002). En otros casos el estrés mecánico provoca la aparición de aromas que no se dan en el producto intacto. Por ejemplo, en ajo, después del daño mecánico se generan aromas donde el aminoácido aliina es oxidado por la alinasa para generar alicina. La peroxidación enzimática de los ácidos grasos insaturados es un ejemplo de la modificación de los aromas de los vegetales frescos cortados. Esta peroxidación es catalizada por la lipoxigenasa que conduce a la formación de diversos aldehídos y cetonas de olores característicos.

### **III.3 Factores que afectan la calidad de los productos mínimamente procesados**

Para obtener un producto de calidad hay que tener en cuenta factores como:

#### III.3.1 Variedad y estado de madurez

Previo al procesado es necesario realizar una adecuada selección del material vegetal, de manera que éste posea las mejores aptitudes para el



procesamiento. La correcta elección de la variedad es muy importante ya que no todas las variedades se comportan frente al procesado de la misma manera. Kim y col, (1993) encontraron que manzanas cortadas de distintas variedades diferían ampliamente en las tasa de respiración, pérdida de firmeza y en los cambios de color durante el almacenamiento.

La selección del estado de madurez es también esencial para el procesado. En el caso de frutos, se debe seleccionar producto lo suficientemente maduro como para que los aromas y sabores propios se hayan desarrollado, pero no sobremaduro ya que se deterioraría rápidamente.

### III.3.2 Sanidad

Debe partirse de una materia prima con las mejores características sanitarias, la implementación de las buenas prácticas agrícolas (BPA), las buenas prácticas de manufactura (BPM) y el análisis de peligros y puntos críticos de control (APPCC, HACCP), son necesarias para asegurar la inocuidad de estos productos.

Para reducir la carga microbiana generalmente se utiliza agua adicionada con hipoclorito sódico. Existen otras alternativas químicas como son el uso de peróxido de hidrógeno, la utilización de ozono, ácidos orgánicos y ácido peroxiacético.

Otro posible tratamiento es la utilización de antimicrobianos naturales como los aceites esenciales, así como también bacterias lácticas.

Entre los tratamientos físicos que se pueden utilizar se encuentran los tratamientos térmicos, las radiaciones ionizantes gamma y las no ionizantes como la radiación ultravioleta UV-C y la radio frecuencia.

### III.3.3 Temperatura de almacenamiento

Uno de los factores más importante que ha de ser controlado para mantener la calidad de los productos frescos cortados es la temperatura. La cadena de frío debe mantenerse durante todo el proceso y hasta que el producto sea consumido.

La temperatura determina la velocidad de las reacciones químicas. Cuando la temperatura aumenta de 0 ° a 10 °C, la respiración se incrementa sustancialmente por 2 o 3 (Ley de Van't Hoff) y cuando la respiración aumenta los sustratos son consumidos rápidamente con la consecuente pérdida de

calidad y vida media del producto. Como ya se mencionó previamente, la tasa respiratoria de los vegetales frescos cortados generalmente es más alta que el producto intacto. En algunos casos como en arvejas, uvas y zucchinis es ligeramente mayor, mientras que en kiwi y en lechuga el incremento en la tasa respiratoria como consecuencia del procesamiento es mayor al 100 % (Watada y col, 1996). Asimismo, el aumento de temperatura también acelera el desarrollo microbiano. La temperatura recomendada para la comercialización y distribución de los productos frescos cortados oscila entre 0 y 5 °C.

Aunque está comprobado que el uso de bajas temperaturas es necesario en productos frescos cortados, se debe tener precaución en aquellos vegetales sensibles al daño por frío. No obstante, se ha observado que el daño por frío observado en frutos frescos como calabacín (Izumi y Watada, 1995) y pepino (Watada y col, 1996) es mucho menor que el deterioro natural que se produce al exponer estos a temperaturas superiores.

El daño por frío va a depender de la variedad, temperatura y tiempo de almacenamiento del producto.

#### III.3.4 Uso de atmósferas modificadas y controladas

El almacenamiento en atmósferas modificadas (AM) o controladas (AC), consiste en colocar el alimento en una atmósfera diferente a la composición normal del aire, involucra una reducción en los niveles de oxígeno y/o una elevación en los niveles de dióxido de carbono. En la AC la concentración de gases introducida inicialmente se mantiene constante a través del todo el período de almacenamiento, mediante monitoreos y ajustes continuos, pero en las AM la concentración de los gases cambia pasivamente y depende de la tasa de respiración del producto y de las características de las películas utilizadas.

El uso adecuado de las AM y AC trae efectos beneficiosos al producto, como disminución en la velocidad de respiración, reducción de los efectos del etileno, retención de la firmeza y la turgencia, mantenimiento de la calidad nutritiva del producto, disminución de la incidencia del daño por frío, reducción del pardeamiento enzimático y menor crecimiento microbiano, aumentando la vida comercial del producto (Rodríguez-Félix y col, 2005).

## **OBJETIVOS**

## **OBJETIVO GENERAL**

Estudiar la aplicación de tecnologías limpias sobre la calidad y senescencia postcosecha de brócoli mínimamente procesado almacenado a diferentes temperaturas.

## **OBJETIVOS ESPECIFICOS**

### ***Capítulo I:***

Estudiar el efecto de bajas dosis de radiación UV-C sobre diferentes parámetros de calidad y senescencia en brócoli mínimamente procesado almacenado a bajas temperaturas.

### ***Capítulo II:***

Estudiar el efecto de un tratamiento térmico con aire caliente sobre parámetros de calidad y senescencia en brócoli mínimamente procesado almacenado a bajas temperaturas.

### ***Capítulo III:***

Estudiar el efecto la combinación de tratamientos térmicos con aire caliente y radiación UV-C sobre parámetros de calidad y senescencia en brócoli mínimamente procesado almacenado a 0 y 20 °C.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

## **MATERIALES Y METODOS**

### **I. Material vegetal**

Inflorescencias de brócoli (*Brassica oleracea* var. *Itálica*) cultivar Cicco, fueron obtenidas de un productor local, en las cercanías de la ciudad de La Plata. Se seleccionaron cabezas centrales verdes en un grado de desarrollo apto para la comercialización. La muestra fue cosechada e inmediatamente trasladada al laboratorio. Se utilizaron cabezas libres de enfermedades y cualquier tipo de daño, las cuales fueron procesadas y divididas de modo de obtener ramilletes.

### **II. Tratamientos físicos**

#### **II.1 Tratamiento con radiación UV-C**

Los ramilletes se lavaron en agua conteniendo 150 mg L<sup>-1</sup> de hipoclorito de sodio durante 5 min. Posteriormente, se colocaron aproximadamente 100-120 g de ramilletes en bandejas de plástico. Las muestras se irradiaron con 4 lámparas UV (TUV, G30T8, 30 W, Phillips) a una distancia de 30 cm, con una dosis de 8 kJ.m<sup>-2</sup>. Los ramilletes fueron cuidadosamente ubicados con las inflorescencias hacia la radiación UV-C. La intensidad de flujo de las lámparas se midió con un radiómetro digital UV (Cole-Parmer, Instrument Company, Vernon Hills, IL, USA). Luego del tratamiento las bandejas fueron cubiertas con PVC de 15 µm de espesor y almacenadas a 4 °C durante 21 días. Simultáneamente se realizó un testigo lavado con hipoclorito pero sin tratamiento UV-C que fue envasado como se indicó anteriormente y directamente almacenado a 4° C. Se tomaron muestras inmediatamente después del tratamiento y a los 7, 14 y 21 días de almacenamiento a 4 °C, que se utilizaron inmediatamente o se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -20 °C para su posterior análisis.

Se utilizaron cuatro bandejas para cada tratamiento y tiempo de almacenaje. La experiencia completa se realizó por triplicado.

## **II.2 Tratamiento térmico**

Las cabezas de brócoli fueron cuidadosamente divididas en ramilletes y sumergidas en agua clorada con  $150 \text{ mg L}^{-1}$  de hipoclorito de sodio durante 15 min a  $15 \text{ }^\circ\text{C}$ . Una vez lavadas se dejaron escurrir y se secaron levemente con papel. Aproximadamente 100-120 g de ramilletes de brócoli fueron ubicados en bandejas de plástico y cubiertas con un film de PVC de  $15 \text{ }\mu\text{m}$  de espesor perforado para prevenir la deshidratación. Dieciseis bandejas conteniendo los ramilletes fueron tratadas con aire caliente a  $48 \text{ }^\circ\text{C}$  por 3 horas en una estufa sin circulación de aire. Una vez terminado el tratamiento, se les retiró el film perforado, las muestras se ventilaron y se cubrieron nuevamente con el mismo film, en este caso sin perforar, y se almacenaron a  $0 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 21 días. El mismo número de bandejas conteniendo los ramilletes pero sin tratamiento térmico fueron almacenadas en las mismas condiciones y usadas como muestras controles. Se recolectaron muestras inmediatamente después del tratamiento y luego de 7, 14, y 21 días de almacenamiento. Los ramilletes fueron utilizados para alguna medida en fresco o bien congelados en nitrógeno líquido y almacenados a  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  hasta su posterior análisis. Se utilizaron cuatro bandejas para cada tratamiento y tiempo de almacenaje. La experiencia completa se realizó por triplicado.

## **II.3 Tratamiento con radiación UV-C combinado con tratamiento térmico de alta temperatura**

### *Selección de las condiciones de tratamiento*

Los ramilletes de brócoli se procesaron y lavaron de acuerdo a lo descrito en los párrafos anteriores. Las muestras se irradiaron con 4 lámparas UV (TUV, G30T8, 30 W, Phillips) a una distancia de 30 cm, con dosis de 5, 8 o  $10 \text{ kJ.m}^{-2}$  de una manera similar a lo descrito previamente. Luego del tratamiento con UV-C las bandejas fueron cubiertas con PVC de  $15 \text{ }\mu\text{m}$  de espesor para disminuir la pérdida de humedad. Se las colocó en una estufa y se las trató con aire caliente a 42, 45 o  $48 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 3 horas. Luego de los tratamientos las bandejas fueron almacenadas a  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 4 días. Se realizaron todas las combinaciones posibles de tratamiento con radiación UV-C (5, 8 y  $10 \text{ kJ.m}^{-2}$ ) y temperatura (42, 45 y  $48 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Se utilizaron 16 bandejas por cada

combinación UV-C/temperatura. El mismo número de bandejas con ramilletes pero sin tratamiento, fueron almacenadas en las mismas condiciones y usadas como controles. Para seleccionar el tratamiento óptimo se determinó la pérdida de peso, el color superficial y síntomas de daño.

Cuatro bandejas de cada combinación se tomaron inmediatamente después de los tratamientos y después de 2, 3 y 4 días de almacenamiento a 20 °C. La experiencia completa se repitió tres veces.

#### *Tratamiento combinado con almacenamiento a 20 °C y a 0 °C*

Una vez seleccionado el tratamiento óptimo, un grupo de 16 bandejas conteniendo ramilletes fueron tratadas como se describe anteriormente para obtener una dosis de radiación de UV-C de 8 kJ.m<sup>-2</sup> y un tratamiento térmico con aire caliente de 48 °C por 3 horas. Otro grupo de 16 bandejas conteniendo ramilletes de brócoli sin tratar fueron utilizadas como controles. Los dos grupos de bandejas fueron almacenadas en las mismas condiciones ya sea a 20 °C durante 4 días y a 0 °C durante 21 días. Los ramilletes fueron muestreados inmediatamente después de los tratamientos y después de 2, 3 y 4 días de almacenamiento para el caso del almacenamiento a 20 °C y después de 7, 14 y 21 días para las muestras almacenadas a 0 °C, las muestras se congelaron con N<sub>2</sub>. Las muestras que se almacenaron a 20 °C se guardaron a -80 °C hasta su análisis, y las muestras que se almacenaron a 0 °C se guardaron a -20 °C hasta su análisis.

### ***III. Determinaciones***

#### *III.1 Calidad organoléptica*

Se evaluó la calidad organoléptica (CO) de las muestras mediante un índice que se obtuvo evaluando siete variables. Cada variable recibió los siguientes puntajes de referencia:

- Condensación dentro del envase (1 sin condensación, 2 con condensación)
- Deshidratación (0 sin deshidratación, 1 incipiente, 2 regular, 3 severa)



- Presencia de hongos (0 sin presencia de hongos, 1 incipiente: menos del 10 % de la superficie con hongos, 2 regular: de 10 a 40 % de la superficie con hongos, 3 severa: más del 40 % de la superficie con hongos)
- Presencia de exudado (1 sin exudado, 2 con exudado)
- Olor desagradable (1 sin olor, 2 con olor)
- Pardeamiento (0 sin pardeamiento, 1 incipiente, 2 regular: de 10 a 40 % de la superficie con pardeamiento, 3 severa: más del 40 % de la superficie con pardeamiento)
- Amarillamiento (0 totalmente verdes, 1 incipiente: de 0 a 25 % de la superficie con amarillamiento, 2 regular: de 25 a 75 % de la superficie con amarillamiento, 3 severa: más del 75 % de la superficie con amarillamiento)

En cada bandeja se evaluó cada ramillete según la escala correspondiente a cada variable, sumándose los puntajes de cada parámetro y dividiéndose por el número de ramilletes totales en la bandeja. Se obtuvo un puntaje promedio por bandeja. Los resultados finales se obtuvieron promediando los valores de las bandejas de cada tratamiento y día de almacenamiento. Un índice bajo indica mejor calidad organoléptica.

### *III.2 Pérdida de peso*

Las bandejas fueron pesadas el día de comienzo del ensayo y a distintos tiempos durante el almacenamiento. La pérdida de peso se expresó como porcentaje del peso respecto al valor inicial. Las determinaciones se realizaron para cada tratamiento y tiempo de almacenamiento

### *III.3 Actividad respiratoria*

Aproximadamente 150 g de ramilletes se colocaron en jarras herméticas de 1000 mL, durante 1 hora a 20 °C. La actividad respiratoria se evaluó a través de la producción de CO<sub>2</sub>. Para ello, se extrajo una muestra de la atmósfera

confinada en la jarra con una jeringa a través de un septum. La muestra se inyectó en un cromatógrafo gaseoso Varian CX 3400, equipado con una columna CTR 1 (Alltech, San José, CA) y un detector de conductividad térmica. El gas portador fue helio con una velocidad de flujo de 25 mL min<sup>-1</sup>. La temperatura en el inyector, columna y detector fue de 120, 30 y 120 °C respectivamente. Se calibró con una mezcla de 10 % de CO<sub>2</sub> y 15 % de O<sub>2</sub>. Los resultados se expresaron como mg CO<sub>2</sub> producido g<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>. Las determinaciones se realizaron por duplicado para cada tratamiento, y tiempo de almacenamiento.

#### *III.4 Pérdida de electrolitos*

Se seleccionaron ramilletes, se pesaron y se colocaron en recipientes con 150 mL de agua destilada de modo que se colocó un ramillete por vaso. Se midió la conductividad del líquido que bañaba las muestras utilizando un conductímetro al comienzo de la incubación (a) y luego de 75 min (b). Se evaluó además la cantidad residual de electrolitos que quedó en los tejidos luego de la incubación. Para ello la muestra fue molida en la misma solución de incubación en un Omnimixer (Sorvall Inc., Norwalk, CT, USA), filtrada a través de un papel de filtro y centrifugada a 16.000  $\times g$  por 10 min. Se midió la conductividad de la solución resultante (c). Los resultados fueron calculados como  $[(b - a)/(b + c - 2a)] \times 100$  y expresados como el % de pérdida de electrolitos. Las determinaciones se realizaron por triplicado para cada tratamiento y tiempo de almacenamiento.

#### *III.5 Color superficial*

La medida de color superficial se realizó con un colorímetro Minolta (modelo CR-300, Osaka, Japón) determinándose los parámetros L\* y Hue. El valor del ángulo Hue (h°) fue calculado como  $h^\circ = \tan^{-1}(b/a)$  cuando  $a > 0$  y  $b > 0$  o como  $h^\circ = 180^\circ + \tan^{-1}(b/a)$  cuando  $a < 0$  y  $b > 0$ .

Para cada determinación se midieron 25 ramilletes en tres posiciones diferentes.

### III.6 Contenido de clorofilas

Las muestras de brócoli congeladas se trituraron con un molinillo y aproximadamente 0,4 g del polvo resultante se homogeneizó con 5 mL de acetona-agua 80:20, se agitó en vortex, y se centrifugó a 16.000  $\times g$  durante 5 min. En el sobrenadante se midió el contenido de clorofilas por el método espectrofotométrico midiendo la absorbancia a 663,2 y 646,8 nm en un espectrofotómetro Beckman DU 650.

Se determinó la clorofila a (Ca), la clorofila b (Cb) y la clorofila total (CT) de acuerdo a Lichtenthaler (1987).

$$Ca = 12,25 A_{663,2} - 2,79 A_{646,8}$$

$$Cb = 21,5 A_{646,8} - 5,1 A_{663,2}$$

$$CT = Ca + Cb$$

Los resultados se expresaron como  $\mu\text{g}$  de clorofila por g de tejido. Las determinaciones se realizaron por cuadruplicado, para cada tratamiento y tiempo de almacenamiento.

### III.7 Contenido de azúcares reductores

#### **Preparación de la muestra**

Las muestras de brócoli congeladas se trituraron con un molinillo y aproximadamente 2 g del polvo resultante se agregó sobre 12 mL de etanol. Se agitó en vórtex y el homogenato se centrifugó a 16.000  $\times g$  durante 15 min a 4 °C. En el sobrenadante de los extractos etanólicos se determinó el contenido de azúcares reductores por el método de Somogyi-Nelson (Nelson, 1944).

#### **Preparación de los reactivos**

Reactivo de sulfato de cobre: Se disolvieron 28 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  anhidro y 4 g de tartrato de sodio y potasio en aproximadamente 700 mL de agua. Se agregaron 100 mL de NaOH 1 N agitando, y luego 80 mL de  $\text{CuSO}_4$  10 % (p/v). Una vez lograda la disolución de los reactivos se agregaron 180 g de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro y se llevó a volumen de 1 litro.

Reactivo de arsenomolibdato: Se disolvieron 25 g de molibdato de amonio en 450 mL de agua, se agregaron 21 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  98 % (p/p). Luego se añadió 3 g de

$\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  disueltos en 25 mL de agua destilada, se mezcló e incubó a 37 °C por 24-48 hs.

Glucosa standard: se preparó una solución madre de glucosa 1 % (p/v). Esta solución se diluyó para obtener soluciones standard de 50, 150 y 300  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

### **Determinación**

A 0,5 mL de extracto etanólico de brócoli, se le agregaron 0,5 mL de reactivo de cobre. Se incubaron los tubos en un baño de agua hirviendo durante 10 min. Posteriormente se añadieron 0,25 mL de reactivo arsenomolibdato y se llevó a un volumen definido de 2,5 mL con agua destilada. Se midió la absorbancia a 520 nm en un espectrofotómetro Beckman DU 650 luego de 30 min. Los resultados se expresaron como mg de glucosa por g de tejido.

Las determinaciones se realizaron por cuadruplicado para cada tratamiento y tiempo de almacenamiento.

### III.8 Contenido de azúcares totales

#### **Preparación del extracto**

Se prepararon extractos etanólicos similares a los descritos en el párrafo anterior. Sobre alícuotas de los mismos se realizó la cuantificación de azúcares totales por el método de la antrona (Southgate, 1976).

#### **Preparación del reactivo**

Antrona: la solución stock 66 % (v/v) de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  se preparó agregando 660 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  sobre 340 mL de agua destilada. Posteriormente, se disolvieron 0,5 g de antrona (9,10 dihidro-9-oxoantraceno) en esta solución.

Glucosa standard: se preparó por dilución de una solución stock madre para obtener standards en el rango de 25-300  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

#### **Determinación**

Se colocaron 0,2 mL del extracto etanólico en un tubo de vidrio y se agregó 2 mL de reactivo de antrona. Se calentó en un baño de agua a ebullición durante 15 min. Se enfrió a temperatura ambiente en un baño de agua y en oscuridad. Se midió la absorbancia a 620 nm después de 20 min en un espectrofotómetro

Beckman DU 650. Simultáneamente se realizó una curva de calibración con glucosa. Los resultados se expresaron como mg de glucosa por g de tejido. Las determinaciones se realizaron por cuadruplicado para cada tratamiento y tiempo de almacenamiento.

### *III.9 Contenido de proteínas solubles*

#### **Preparación del extracto**

Las muestras de brócoli congeladas se trituraron con un molinillo y aproximadamente 0,5 g del polvo resultante se agregó sobre 10 mL de solución reguladora de extracción de proteínas solubles (tris-HCl 50 mM, EDTA 2 mM, mercaptoetanol 0,04 % (v/v) a pH 7,5. La mezcla se agitó y el homogenato se centrifugó a 16.000  $\times$  g, 20 min, a 4 °C. El sobrenadante se utilizó para determinar proteínas solubles de acuerdo al método de Bradford (Bradford, 1976).

#### **Preparación del reactivo**

Se disolvieron 100 mg de Coomassie Brilliant Blue G-250 en 50 mL de etanol 95 % (v/v). A esta solución se le agregó 100 mL de ácido fosfórico 85 % (p/v). La solución resultante se llevó a un volumen final de 1 L.

#### **Determinación**

La reacción se realizó agregando 100  $\mu$ L del extracto enzimático completando a volumen de 500  $\mu$ L con agua destilada y 1 mL del reactivo de Bradford. Se incubó 15 min a temperatura ambiente y se midió la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro Beckman DU 650. Simultáneamente se realizó una curva de calibración utilizando 0,1 mg mL<sup>-1</sup> de albúmina bovina como patrón. Los resultados se expresaron como mg proteína por g de tejido.

Los extractos y determinaciones fueron hechos por cuadruplicado para cada tratamiento y tiempos de almacenamiento.

### *III.10 Contenido de proteínas totales*

#### ***Preparación del extracto***

Las muestras de brócoli congeladas se trituraron con un molinillo y aproximadamente 0,4 g del polvo resultante se homogeneizó con 10 mL de NaOH 0,1 M y dodecil sulfato de sodio (SDS) 1 % (p/v). El homogenato se incubó en un baño de agua a 100 °C durante 10 min y se centrifugó a 12.000  $\times g$  durante 20 min a 4 °C. Se tomó el sobrenadante y en el mismo se precipitaron las proteínas mediante el agregado de 2 mL de 25 % (p/v) de ácido tricloroacético (TCA). Se incubó en un baño de hielo-agua durante 1 hora y luego se centrifugó a 15.000  $\times g$  durante 10 min a 4 °C. El precipitado se disolvió en 0,2 mL de NaOH 0,1 M; SDS 1 % (p/v) y las proteínas se determinaron utilizando el método de Lowry (Lowry, 1951).

#### ***Preparación de los reactivos***

- Reactivo A: Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2 % (p/v), NaOH 0,1 M
- Reactivo B<sub>1</sub>: CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 0,5 % (p/v)
- Reactivo B<sub>2</sub>: tartrato sódico-potásico 1 % (p/v)
- Reactivo C: Se prepara en el momento de iniciar el ensayo, mezclando A, B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub> en proporciones 50:0,5:0,5 (en volumen)
- Reactivo Folin-Ciocalteu: reactivo comercial diluido en agua (1:1)
- Solución patrón de albúmina de suero bovino (1 mg mL<sup>-1</sup>)

#### ***Determinación***

A los tubos conteniendo la muestra o patrón (0-100  $\mu$ L) se le adicionaron 2 mL de la solución C, luego de 10 min se le agregó 200  $\mu$ L del reactivo de Folin. Se agitó y se dejó reposar durante 30 min. Se determinó la absorbancia a 600 nm en un espectrofotómetro Beckman DU 650.

Se prepararon cuatro extractos para cada tratamiento y tiempo de almacenamiento.

### III.11 Contenido de compuestos fenólicos

#### **Preparación de la muestra**

Las muestras de brócoli congeladas se trituraron con un molinillo y aproximadamente 0,4 g del polvo obtenido se colocó en 12 mL de etanol. La mezcla se agitó y el homogenato se centrifugó a 16.000  $x g$  durante 15 min a 4 °C. Se tomó el sobrenadante, se alicuotó y se almacenó a -80 °C hasta ser analizado.

#### **Determinación**

Estos extractos se utilizaron para determinar fenoles utilizando el reactivo de Folin. Se tomaron 100  $\mu\text{L}$  de muestra y se mezclaron con 1,11 mL de agua y 200  $\mu\text{L}$  de reactivo de Folin 1 N. Luego de 3 min a 25 °C se agregó 1,5 mL de solución de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  2 % (p/v) en NaOH 0,1 N. Se incubó durante una hora a 25 °C y se midió la absorbancia a 760 nm en un espectrofotómetro Beckman DU 650. Se realizó en paralelo una curva de calibración empleando 200  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de fenol como patrón. Los resultados se expresaron como mg o  $\mu\text{g}$  de fenol por g de tejido.

Las determinaciones se efectuaron por cuadruplicado para cada tratamiento y tiempo de almacenamiento.

### III.12 Contenido de ácido ascórbico

#### **III.12.1 Metodología 1**

#### **Preparación de la muestra**

Las muestras de brócoli congeladas se trituraron con un molinillo y aproximadamente 0,4 g del polvo obtenido se homogenizaron en 5 mL de ácido cítrico 3 % (p/v). Se agitó y el homogenato se centrifugó a 12.000  $x g$  durante 10 min a 4 °C. Alícuotas de cada uno de los extractos fueron nuevamente centrifugados, en una centrífuga Eppendorf 5415C a 14.000  $x g$  durante 5 min a 4 °C.

#### **Determinación**

La determinación de ácido ascórbico se realizó utilizando un equipo HPLC Waters equipado con un detector UV-VIS. Se utilizó una columna  $\text{C}_{18}$  (5  $\mu\text{m}$  de

diámetro de partículas, 4,6 mm de diámetro interno y 25 cm de longitud). La fase móvil fue  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,2 M pH 2,4 ajustado con ácido ortofosfórico. El caudal fue de  $1 \text{ mL min}^{-1}$  y la detección se realizó a 254 nm. Para la identificación y cuantificación se utilizó una solución patrón de ácido ascórbico de  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Los resultados se expresaron como mg de ácido ascórbico cada 100 g de tejido.

Las determinaciones se realizaron por cuadruplicado para cada tratamiento y tiempo de almacenamiento.

### **III.12.2 Metodología 2**

#### **Preparación de la muestra**

Las muestras de brócoli congeladas se trituraron con un molinillo y aproximadamente 3 g del polvo obtenido se homogenizaron con aproximadamente 20 mL de ácido tricloroacético (TCA) 6 % (p/v). La mezcla se agitó y el homogenato se centrifugó a  $12.000 \times g$  durante 20 min a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ . Se tomó el sobrenadante, se alicuotó y se almacenó a  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  hasta ser analizado.

#### **Determinación**

La determinación de ácido ascórbico (ASA) se realizó por el método descrito por Kampfenkel y col. (1995). La determinación se basa en la reducción del  $\text{Fe}^{+3}$  a  $\text{Fe}^{+2}$  por el ácido ascórbico, y la detección espectrofotométrica del  $\text{Fe}^{+2}$  formando un complejo con el 2,2'-dipiridilo. El ácido dehidroascórbico (ADA) es reducido a ácido ascórbico por incubación de la muestra con ditiotreitól (DTT), el exceso de DTT es posteriormente removido con N-etilmaleimida (NEM). La concentración de ADA es calculada de la diferencia de ASA con DTT (ASA TOTAL) menos (ASA) sin DTT.

Se realizó en paralelo una curva de calibración empleando  $160 \mu\text{g mL}^{-1}$  de ácido ascórbico. Los resultados se expresaron como mg de ácido ascórbico cada 100 g de tejido.

Las determinaciones se realizaron por cuadruplicado para cada tratamiento y tiempo de almacenamiento.



La determinación se realizó de la siguiente manera:

Componentes de la mezcla (mL)	ASA		ASA total	
	Muestra	Blanco	Muestra	Blanco
Patrón o muestra	0,2		0,2	
DTT 10 mM			0,2	0,2
TCA 6 %		0,2		0,2
Tampón fosfato pH= 7,4 0.2 M	0,6	0,6	0,4 <sup>a</sup>	0,4 <sup>a</sup>
NEM 0.5 %			0,2 <sup>b</sup>	0,2 <sup>b</sup>
Agua bidestilada	0,2	0,2		
TCA 10 %	1,0	1,0	1,0	1,0
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 42 %	0,8	0,8	0,8	0,8
2,2'-dipiridilo 4 %	0,8	0,8	0,8	0,8
FeCl <sub>3</sub> 3 %	0,4 <sup>c</sup>	0,4 <sup>c</sup>	0,4 <sup>c</sup>	0,4 <sup>c</sup>

a. Se incubó 15 min a 42 °C

b. Se incubó 1 min a temperatura ambiente

c. Se incubó a 42 °C en baño de agua 40 min y se leyó la absorbancia a 525 nm.

### III.13 *Actividad antioxidante*

#### **Preparación de la muestra**

Las muestras de brócoli congeladas se trituraron con un molinillo y aproximadamente 2 g de tejido se mezclaron con 12 mL de etanol. Se agitó y el homogenato se centrifugó a 12.100  $\times g$  durante 10 min, a 4 °C. Se determinó la actividad antioxidante en los sobrenadantes de acuerdo al procedimiento descrito por (Brand Williams y col, 1995).

#### **Preparación del reactivo**

Se preparó una solución de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) 250 mg L<sup>-1</sup> en etanol.

#### **Cuantificación**

Para determinar la actividad antioxidante de la muestra se colocaron volúmenes variables del extracto desde 0,1 hasta 0,5 mL. Se agregaron 2 mL del reactivo de DPPH y se incubó a temperatura ambiente. Se determinó la disminución de la absorbancia a 517 nm en un espectrofotómetro Beckman DU 650 cada minuto, desde el tiempo 0 hasta los 20 min, y luego cada 5 min. Con esto se determinó que luego de 1 h de incubación se alcanzaba una absorbancia constante indicando que se habían consumido la totalidad de

antioxidantes en el extracto. Con el valor de absorbancia final se calculó el valor de  $EC_{50}$  (cantidad de extracto necesario para disminuir la absorbancia inicial del DPPH 50 %) y se expresó como actividad antioxidante ( $EC_{50}^{-1}$ ). Las determinaciones se realizaron por duplicado para cada tratamiento y tiempos de almacenamiento.

### *III.14 Análisis microbiológico*

Se tomaron 25 g de ramilletes, se sumergieron en 225 mL de agua peptona estéril (peptona 0,1 % (p/v)) durante aproximadamente 15 min. Con la solución resultante se realizó una dilución seriada entre  $10^{-1}$  y  $10^{-6}$ .

Para el cultivo se utilizó un medio indicado para bacterias totales, PCA: (peptona de caseína, extracto de levadura, glucosa y agar a pH 7) y un medio de cultivo general para hongos y levaduras YGC: (extracto de levadura, glucosa, agar y cloranfenicol), ambos esterilizados en autoclave a 120 °C, 15 minutos. Cada dilución se sembró por duplicado. El cultivo bacteriano se incubó en estufa a 37 °C durante 36 horas y el cultivo de hongos y levaduras se incubó en estufa a 20 °C durante 120 horas. Los resultados se expresaron en unidades formadoras de colonias por gramo de tejido (UFC  $g^{-1}$ ). El análisis microbiológico se realizó para cada tratamiento y tiempos de almacenamiento.

## **IV. DETERMINACIONES ENZIMÁTICAS**

### **IV.1 SUPEROXIDO DISMUTASA (SOD)**

#### ***Preparación del extracto***

Las muestras de brócoli congeladas se trituraron con un molinillo y aproximadamente 5 g de tejido se agregó a 20 mL de buffer (fosfato de sodio 100 mM, PMSF 1 mM, EDTA 0,1 mM, PVPP 10 g L<sup>-1</sup>, pH 7,8). La suspensión resultante se sometió a agitación durante 45 min a 4 °C y se centrifugó a 13.000 *x g* durante 20 min. Se separó el sobrenadante, se distribuyó en alícuotas y finalmente se almacenó a -80 °C hasta su utilización. Se realizaron dos moliendas para cada tratamiento y tiempo de almacenamiento ensayado y de cada una de ellas se hicieron dos extractos. Las medidas se realizaron por triplicado.

#### ***Medida de la actividad***

La actividad de SOD fue determinada según Giannopolitis y Ries (1977), con ligeras modificaciones. La mezcla de reacción contenía buffer fosfato de sodio 100 mM pH 7,8; metionina 13 mM; nitroblue tetrazolium (NBT) 75 µM; riboflavina 2 µM; EDTA 0,1 mM y 200 µL de extracto enzimático en un volumen total de 3,0 mL. La mezcla de reacción fue preparada en tubos transparentes y uniformes, una vez homogenizados se colocaron a 30 cm bajo 4 lámparas fluorescentes de 30 W a temperatura ambiente por 15 min. La reacción empieza/termina con el encendido/apagado de las lámparas, respectivamente. Una mezcla de reacción sin extracto enzimático se utilizó como control y una mezcla completa de reacción no irradiada fue usada como blanco. La absorbancia de la mezcla de reacción fue medida a 560 nm. Una unidad de actividad de SOD se define como la cantidad de enzima que, bajo las condiciones de ensayo, causa un 10 % de inhibición de la reacción (o absorbancia) observada en ausencia de enzima.

## IV.2 CATALASA (CAT)

### ***Preparación del extracto***

Las muestras de brócoli congeladas se trituraron con un molinillo y aproximadamente 2,5 g de tejido se adicionaron a 20 mL de buffer fosfato ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,1 M,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,1 M, pH 7,0) conteniendo PMSF 1 mM; EDTA 0,1 mM; Tritón X-100 0,1 % (v/v) y PVPP 10 g  $\text{L}^{-1}$ . La suspensión resultante se sometió a agitación durante 45 min a 4 °C y se centrifugó a 13.000  $\times g$  durante 20 min. Se separó el sobrenadante, se distribuyó en alícuotas y se almacenó a -80 °C hasta su utilización. Se realizaron dos moliendas para cada tratamiento y tiempo de almacenamiento ensayado y de cada una de ellas se hicieron dos extractos. Las medidas se realizaron por triplicado.

### ***Medida de la actividad enzimática***

La actividad de CAT se determinó según el método de Du y Bramlage (1995) con ligeras modificaciones. Se cuantificó la concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  remanente que queda luego de la acción de la catalasa, a través de la reacción con  $\text{TiSO}_4$  el cual forma un compuesto estable de color amarillo.



La mezcla de reacción contenía 1300  $\mu\text{L}$  de buffer fosfato de potasio 100 mM, pH 7,0; 300  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  15 mM y 400  $\mu\text{L}$  de extracto enzimático. La mezcla se incubó a 37 °C. Se tomaron alícuotas de 150  $\mu\text{L}$  a los 0; 0,5; 1; 2; 3 y 5 min y la reacción se detuvo por adición de las alícuotas a una solución conteniendo 1200  $\mu\text{L}$  de  $\text{TiSO}_4$  0,1 % (p/v); 200  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado y 450  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$ , para completar un volumen final de reacción de 2000  $\mu\text{L}$ . Se realizó además un blanco sin extracto. La absorbancia de las muestras se midió a 410 nm y la concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  fue calculada usando una curva de calibración de 2 a 16 mM. Una unidad de CAT se definió como 1  $\mu\text{mol}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  consumido por minuto por mg de proteína. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

Para comprobar que el extracto enzimático no produce interferencia con la formación del compuesto entre Ti y  $\text{H}_2\text{O}_2$ , se realizó una curva estándar de

concentración conocida de  $H_2O_2$  (de 2 a 16 mM) solución de Titanio y extracto enzimático inactivo (hervido 15 min aproximadamente).

### **IV.3 PEROXIDASA (POX)**

#### ***Preparación del extracto***

Se utilizó una metodología de extracción similar a la indicada en el párrafo de catalasa.

#### ***Medida de la actividad enzimática***

La actividad POX fue estimada por la medida del incremento de la absorbancia por la formación del producto de dehidrogenación del guayacol a 470 nm, según el método de Flurkey y Jen, (1978) con ligeras modificaciones. La mezcla de reacción contenía 660  $\mu$ L de buffer fosfato de potasio 100 mM, pH 7,0; 100  $\mu$ L de extracto enzimático; 2000  $\mu$ L guayacol 40 mM y 240  $\mu$ L de  $H_2O_2$  8 mM en un volumen final de 3 mL. La mezcla de reacción se incubó a 25 °C y se evaluaron los cambios de absorbancia a 470 nm durante 5 min.

Se realizaron además los siguientes blancos.

a. Blanco de extracto: 760  $\mu$ L de buffer fosfato de potasio 100 mM, pH 7, 0; 2000  $\mu$ L guayacol 40 mM; 240  $\mu$ L de  $H_2O_2$  8 mM, en un volumen final de 3 mL.

b. Blanco con extracto hervido 15 min: 660  $\mu$ L de buffer fosfato de potasio 100 mM, pH 7,0; 100  $\mu$ L de extracto enzimático hervido; 2000  $\mu$ L guayacol 40 mM; 240  $\mu$ L de  $H_2O_2$  8 mM, en un volumen final de 3 mL.

Una unidad de actividad de POX fue definida como el cambio en una unidad de absorbancia por minuto por mg de proteína.

### **IV.4 FENILALANINA-AMONIO-LIASA (PAL)**

#### ***Preparación del extracto:***

Las muestras de brócoli congeladas se trituraron con un molinillo y aproximadamente 5 g de tejido se adicionaron a 20 mL de buffer de extracción conteniendo  $Na_2B_4O_7 \cdot H_2O$  0,1 M; 2-mercaptoetanol 5 mM; EDTA 2 mM; PVPP 3 % (p/v); pH 8,8. Se agitó durante 1 h a 4 °C y se centrifugó a 13.000  $\times$  g

durante 20 min a 4 °C. Se tomó el sobrenadante, se alicuotó y se almacenó a -80 °C hasta ser utilizado. Se realizaron dos moliendas para cada tratamiento y tiempo de almacenamiento ensayado y de cada una de ellas se hicieron dos extractos. Las medidas se realizaron por triplicado.

#### ***Medida de la actividad***

Se preparó una mezcla de reacción con 3,4 mL  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0,03 M pH 8,8; 0,6 mL L-fenilalanina 0,01 M y 2 mL de extracto enzimático hasta un volumen final de 6 mL. Se incubó la mezcla a 37 °C. Se tomaron 400  $\mu\text{L}$  de la mezcla de reacción (por duplicado) a tiempos de 0; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0 y 4,0 h, se agregaron sobre 400  $\mu\text{L}$  de HCl 5 M y se colocaron rápidamente en hielo. Se centrifugó y midió la DO a 290 nm. Se realizaron además blancos de sustrato (mezcla de reacción sin fenilalanina) y blanco de extracto (mezcla de reacción sin extracto). Una unidad de actividad de PAL fue definida como la variación de absorbancia ( $\Delta\text{DO}$ ) por hora por mg proteína.

### **IV.5 ASCORBATO PEROXIDASA (APX)**

#### ***Preparación del extracto***

Las muestras de brócoli congeladas se trituraron con un molinillo y aproximadamente 5 g de tejido se adicionaron a 20 mL de buffer fosfato ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  100 mM pH 7) conteniendo PMSF 1 mM, EDTA 0,1 mM, Tritón X-100 0,1 % (v/v) y PVPP 10 g  $\text{L}^{-1}$ . La suspensión resultante se sometió a agitación por 60 min a 4 °C y se centrifugó a 13.000  $\times g$  durante 20 min a 4 °C. Se separó el sobrenadante, se distribuyó en alícuotas que finalmente se almacenaron a -80 °C hasta su utilización. Se realizaron dos moliendas para cada tratamiento y tiempo de almacenamiento ensayado y de cada una de ellas se hicieron dos extractos. Las medidas se realizaron por triplicado.

#### ***Medida de la actividad***

La actividad de la enzima APX fue determinada según Nakano y Asada (1981) La mezcla de reacción contenía 2350  $\mu\text{L}$  de buffer fosfato ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  100 mM pH 7); 200  $\mu\text{L}$  de ascorbato de sodio 0,25 mM; 300  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  10 mM y 150  $\mu\text{L}$  de extracto enzimático en un volumen final de 3 mL. Se incubó a 25

°C y se determinó la oxidación del ascorbato a través del cambio de absorbancia a 290 nm durante 5 min.

Se realizaron dos controles de reacción: sin extracto (para considerar la posibilidad de oxidación química debida a otros componentes de la mezcla de reacción) y sin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (para considerar la oxidación del ascorbato dependiente del extracto). Una unidad de actividad de APX fue definida como la cantidad de enzima que oxida 1 μmol de ascorbato por minuto.

#### **IV.6 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE PROTEÍNAS DE LOS EXTRACTOS ENZIMÁTICOS**

El contenido de proteína soluble de cada extracto fue determinado según el método de Bradford, (Bradford, 1976). La concentración de proteína fue calculada usando albúmina sérica bovina (BSA) como estándar proteico, con una curva de calibración de 0 a 10 μg BSA mL<sup>-1</sup>.

#### **V ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Las experiencias completas fueron realizadas tres veces. Los resultados fueron analizados por ANOVA y la comparación de medias por el test LSD con un nivel de significancia del 0,05 %.

## **CAPÍTULO I**

Influencia de la radiación UV-C sobre la senescencia y calidad postcosecha de brócoli mínimamente procesado almacenado a baja temperatura



## **I.1 INTRODUCCIÓN**

Los productos hortifrutícolas sufren numerosas pérdidas durante el período postcosecha. Estas pérdidas están causadas por un sinnúmero de factores incluyendo lesiones mecánicas, deshidratación, senescencia y/o maduración acelerada y ataque de patógenos. Estas pérdidas pueden llegar a ser particularmente altas dependiendo de la especie, el método de cosecha, el tiempo de almacenamiento y las condiciones en la comercialización.

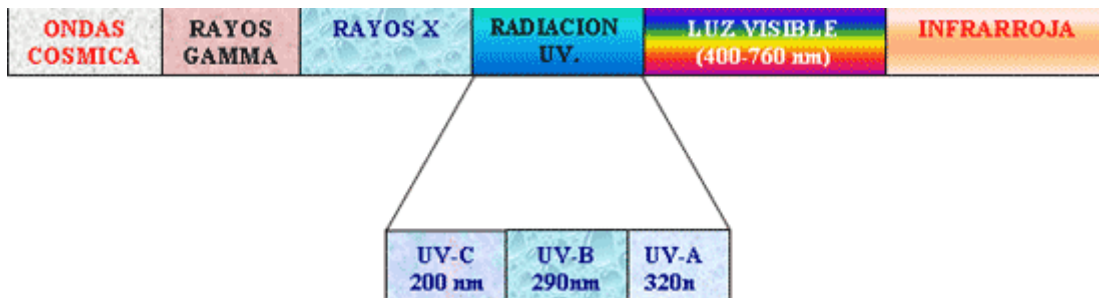
Con el fin de controlar las pérdidas postcosecha se han aplicado diferentes estrategias, siendo el uso de diferentes pesticidas y agroquímicos la principal estrategia de control desde mediados del siglo XX. Sin embargo, actualmente el uso de estos compuestos está siendo cuestionado debido a los riesgos para la salud humana, el potencial riesgo para el medio ambiente y el desarrollo de resistencia de algunos patógenos a los pesticidas. Por tales razones los residuos de pesticidas en vegetales frescos están siendo restringidos en la mayoría de los países.

Una tecnología usada desde hace tiempo para controlar las pérdidas postcosecha es el almacenamiento refrigerado. Esta tecnología por si sola no ha sido suficiente para evitar el deterioro, por lo que en los últimos años se han estudiado nuevas tecnologías amigables para el medio ambiente y la salud humana como complemento de la refrigeración. Una de estas tecnologías es la aplicación de radiación ultravioleta C (UV-C) (Civello y col, 2007).

Recientemente ha habido un aumento en el consumo de vegetales frescos cortados debido a la toma de conciencia de los consumidores de los beneficios para la salud que pueden acarrear estos productos. Pero como ya mencionamos anteriormente el procesamiento de vegetales promueve cambios negativos tanto bioquímicos como microbiológicos en estos productos, los que pueden ser controlados mediante la utilización de radiación UV-C (Allende y Artés, 2003).

La radiación ultravioleta comprende una parte del espectro electromagnético, entre los 200 nm y 400 nm de longitud de onda, se la considera radiación no ionizante. Los fotones UV presentan suficiente energía como para destruir enlaces químicos, pudiendo producir reacciones fotoquímicas las cuales tendrían un efecto biológico.

Espectro electromagnético



La radiación ultravioleta se divide en tres rangos de longitud de onda:

Onda larga	UV-A	320-400 nm
Onda media	UV-B	280-320 nm
Onda corta	UV-C	200-280 nm

La radiación UV-C en altas dosis es nociva para los tejidos vegetales. Sin embargo si la radiación UV-C es aplicada en bajas dosis, los tejidos podrían generar un sistema de defensa modificando su metabolismo y reaccionando en forma positiva a este nuevo tipo de estrés. Este concepto es conocido como “hormesis” (Luckey, 1980).

Diferentes dosis de radiación UV-C de 254 nm de longitud de onda han sido aplicado a numerosos vegetales como batatas (Stevens y col, 1999), zanahorias (Mercier y col, 2000), tomate (Maharaj y col, 1999), duraznos (Stevens y col, 1998), manzanas (Stevens y col, 1996), pimiento (Vicente y col 2005 (b)), uvas (Nigro y col, 1998), arándanos (Perkins-Veazie y col, 2008) pomelos (Dhallewin y col, 2000), y naranjas (Dhallewin y col, 1999). Los efectos de la radiación UV-C no sólo está restringida al producto entero; (Erkan y col, 2001) demostraron los efectos positivos tratando zucchinis cortados (*Cucurbita pepo*), también se probó en melón cantaloupe cortado (Lamikanra y col, 2002), mango cortado (González-Aguilar y col, 2007 (a)), en lechuga procesada (Allende y Artés, 2003) y granada procesada (López-Rubira y col, 2005).

Los tratamientos postcosecha con radiación UV-C consisten en la exposición del producto por un cierto período de tiempo bajo lámparas UV con un máximo de emisión a los 254nm.

La radiación UV tiene baja penetración en los tejidos y se considera que es un tratamiento superficial. Sin embargo, el estrés que desencadena este tratamiento puede generar señales que influyan sobre regiones del tejido no afectadas directamente por la radiación.

El objetivo primario de la aplicación de radiación UV-C es aprovechar su efecto germicida a través del daño severo que ocasiona en el ADN. Estos efectos van a depender fuertemente de la cantidad de radiación absorbida y la resistencia específica de cada patógeno a la exposición con radiación UV-C. En general las dosis utilizadas para irradiar productos frescos son suficientes para afectar el crecimiento, esporulación y viabilidad de los principales patógenos responsable de las enfermedades postcosecha (Shama y col, 2005).

Sin embargo, la radiación UV-C tiene además un efecto indirecto sobre los patógenos, ya que muchos vegetales tratados con radiación UV-C aumentan su resistencia al ataque de patógenos. Entre las causas que aumentan esta resistencia es la mayor integridad de la pared celular debido a la disminución temporaria de la actividad de enzimas involucradas en su degradación tales como la poligaracturonasa (Stevens y col, 2004). Otro factor importante es la elicitación de compuestos involucrados en respuestas de defensa luego de la irradiación con UV-C. Entre ellos cabe destacar a las fitoalexinas, compuestos antimicrobianos que se sintetizan en la planta como respuesta al ataque de patógenos. En uvas, por ejemplo, se ha informado la acumulación de resveratrol, una fitoalexina, como respuesta a la radiación UV-C (Langcake y col, 1977). Asimismo, se ha descrito la síntesis de diversas proteínas relacionadas a la patogénesis (PR) tales como glucanasa o quitinasa que atacan la pared celular de los patógenos (Ghaouth y col, 2003).

La radiación UV-C no sólo tiene efectos directos o indirectos sobre los patógenos, sino que también puede reducir o disminuir la incidencia de diversos desórdenes que afectan la postcosecha. Tratamientos con radiación UV-C disminuyen la aparición de daño por frío en duraznos (González-Aguilar y col, 2004) y pimientos (Vicente y col, 2005 (b)) y retrasan la senescencia en tomates (Maharaj y col, 1999).

Los tratamientos postcosecha con radiación UV-C tienen la ventaja de ser simples, rápidos, de bajo mantenimiento y bajo costo. Necesitan poco capital invertido, no tienen restricciones legales para su aplicación y pueden ser utilizados en combinación con otras tecnologías.

## **I.2 OBJETIVO**

En brócoli, se ha descrito que las aplicaciones de dosis bajas de radiación UV-C en cabezas enteras permiten retrasar la senescencia durante el almacenamiento a 20 °C (Costa y col, 2006). En este capítulo se describe el efecto de una dosis baja de radiación UV-C (8 kJ.m<sup>-2</sup>) sobre la senescencia y calidad de brócoli mínimamente procesado durante el almacenamiento refrigerado. El procesamiento induce un estrés muy severo por lo que se torna necesario evaluar si el efecto benéfico del UV-C se mantiene en este tipo de muestras cuando son almacenadas a bajas temperaturas.

### **I.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Un trabajo reciente demostró que un tratamiento corto con radiación UV-C en una dosis de  $10 \text{ kJ.m}^{-2}$  puede retrasar la senescencia en cabezas de brócoli intactas almacenadas a  $20 \text{ }^{\circ}\text{C}$  (Costa y col, 2006). Dado que en este trabajo se utiliza brócoli mínimamente procesado, condición que acelera la senescencia, se decidió probar diversas dosis de UV-C cercanas a las utilizadas en el caso de cabezas enteras. Así se ensayaron dosis de 5, 8 y  $10 \text{ kJ.m}^{-2}$ . Los resultados mostraron que las muestras a las que se les aplicó la dosis de  $8 \text{ kJ.m}^{-2}$  fueron las que presentaron mejor calidad organoléptica (apariencia general) al cabo de 4 días a  $20 \text{ }^{\circ}\text{C}$  (datos no mostrados). Por esta razón se seleccionó esta dosis para la realización de las experiencias posteriores.

En este capítulo se analiza el efecto de un tratamiento con la dosis mencionada de UV-C sobre la senescencia y calidad de brócoli mínimamente procesado almacenado a  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### **I.3.1 Apariencia general**

Los ramilletes de brócoli mínimamente procesados fueron tratados con radiación UV-C y luego almacenados durante 21 días a  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ . Hacia el final del almacenamiento, la apariencia general de las muestras tratadas con radiación UV-C era buena, no se detectaba deshidratación, ni síntomas visibles de ataque de patógenos. Su color fue verde intenso, mientras que las muestras controles se mostraban amarillas.

#### **I.3.2 Pérdida de peso**

Los ramilletes de brócoli presentaron en promedio una pérdida de peso de cerca del 4 % luego de 21 días de almacenamiento a  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$  (tabla I.1). Sin embargo, no se detectaron diferencias significativas entre las muestras controles y tratadas con radiación UV-C durante este período, indicando que el tratamiento no afectó la pérdida de peso con respecto a las muestras controles. Resultados similares obtuvieron Maharaj y col. (1999) en tomate

irradiado con una dosis de 3,7 kJ.m<sup>-2</sup> y Vicente y col. (2005(b)) en pimientos irradiados con una dosis de 10 kJ.m<sup>-2</sup> luego de 18 días a 10 °C.

### I.3.3 Pérdida de electrolitos

La pérdida de electrolitos es un parámetro que se utiliza como una medida del daño que sufren los tejidos. Cuanto mayor es el daño, mayor será el valor de éste parámetro. La senescencia está acompañada por el deterioro en los tejidos y a medida que este proceso progresa la membrana plasmática pierde su integridad y los solutos son liberados del citosol.

En este trabajo, hasta el día 7 no se detectó aumento significativo en la fuga de electrolitos para ambos tratamientos. En el día 14 se produjo un aumento significativo en la cantidad de electrolitos de las muestras controles y este aumento continuó hasta el día 21. En tanto, en las muestras tratadas el incremento de la pérdida de electrolitos se observó recién a los 21 días de almacenamiento, lo que indicaría menor daño en los tejidos en las muestras tratadas con UV-C (tabla I.1).

Tabla I.1. Pérdida de peso, pérdida de electrolitos y tasa de respiración en brócoli mínimamente procesado control (C) y tratados con UV-C (8 kJ.m<sup>-2</sup>) (T) almacenados a 4 °C durante 21 días.

		<b>Días a 4 °C</b>			
		0	7	14	21
<b>Pérdida de peso (%)</b> (LSD <sub>0,05</sub> =0,25)	C		1,8 ± 0,21	2,98 ± 0,24	4,20 ± 0,22
	T		1,6 ± 0,20	2,75 ± 0,23	4,05 ± 0,17
<b>Pérdida de electrolitos (%)</b> (LSD <sub>0,05</sub> =18,95)	C	8,26 ± 3,31	6,12 ± 0,80	43,13 ± 3,06	67,23 ± 18,30
	T	4,4 ± 3,90	8,09 ± 0,19	8,93 ± 0,11	46,73 ± 11,4
<b>Producción de CO<sub>2</sub> (mL g<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>)</b> (LSD <sub>0,05</sub> =0,03)	C	0,118 ± 0,044	0,072 ± 0,0048	0,077 ± 0,005	0,12 ± 0,012
	T	0,113 ± 0,031	0,064 ± 0,011	0,59 ± 0,002	0,1 ± 0,01

Vicente y col. (2005 (b)) observaron que en pimientos tratados con UV-C la pérdida de electrolitos fue menor que en los respectivos controles después de 15 días a 0 °C más 4 días a 20 °C. La ausencia de un aumento en la pérdida de electrolitos al inicio del almacenamiento en las muestras irradiadas

probablemente indica que la dosis de radiación utilizada en estas experiencias puede ser considerada como baja y probablemente no afectó la integridad de los tejidos.

#### **I.3.4 Actividad respiratoria**

El aumento de la velocidad respiratoria en condiciones de almacenamiento prolongado de frutas y hortalizas puede estar asociado con algún tipo de lesión en los tejidos. Por lo tanto la medida de la producción de CO<sub>2</sub> es también un buen parámetro para estimar daño tisular.

Inmediatamente después del tratamiento con UV-C se detectó un ligero aumento en la producción de CO<sub>2</sub> probablemente como un efecto directo de la radiación, aunque éste no fue significativo. Posteriormente, se observó un ligero aumento en la actividad respiratoria a partir del día 14 en las muestras controles, alcanzando al día 21 un valor aproximadamente 4 veces superior al valor inicial. En tanto, las muestras tratadas, mantuvieron una actividad respiratoria similar a la inicial hasta el día 14, aumentando hacia el final de la experiencia, siendo este valor un 20 % inferior al de la muestra control (tabla I.1).

Maharaj y col. (1999), trabajando con tomates almacenados a 16 °C, hallaron un retraso y menor intensidad en el pico respiratorio de aquellas muestras irradiadas con UV-C en comparación con los controles. Por otro lado, Costa y col. (2006) hallaron, en cabezas enteras de brócoli irradiadas con UV-C y almacenados a 20 °C, un aumento en la producción de CO<sub>2</sub> en las muestras controles, en concordancia con nuestros resultados.

Estos resultados sugieren que la radiación UV-C reduce el daño tisular que ocurre durante el avance de la senescencia.

#### **I.3.5 Color superficial**

Un factor determinante en la calidad de postcosecha brócoli es el amarilleamiento de las flores, por lo que la mayoría de los tratamientos tienen como objetivo retrasar este proceso. Por lo tanto, es muy importante poder

cuantificar el color de una forma objetiva. Para ello, la medida de color se realizó por medio de un colorímetro. Una de las escalas de color más difundidas es la escala CIE que utiliza los parámetros  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$ , y, a partir de ellos, se puede calcular el ángulo de color Hue.

$L^*$ : indica la luminosidad

$a^*$ : indica el balance de color entre rojo y verde

$b^*$ : indica el balance de color entre azul y amarillo

Hue: es el tono o matiz e indica la longitud de onda predominante, se calcula como  $\tan^{-1}(b^*/a^*)$ , cuando  $a^*$  y  $b^*$  son positivos y  $180 - \tan^{-1}(b^*/a^*)$ , cuando  $a^*$  es negativo y  $b^*$  es positivo

La pérdida de color verde está asociada con la disminución del parámetro Hue. Durante el almacenamiento a 4 °C el valor de Hue en los ramilletes controles, disminuyó significativamente a partir del día 14, alcanzando al final del mismo un valor del 50 % inferior al inicial, indicando su amarilleamiento. En cambio, las muestras tratadas mostraron un descenso más moderado, manteniendo un valor de Hue mayor que los controles en los días 14 y 21 de almacenamiento (Figura I.1). De esta manera, hacia el final del almacenamiento, el valor del Hue fue un 40 % superior a los controles.

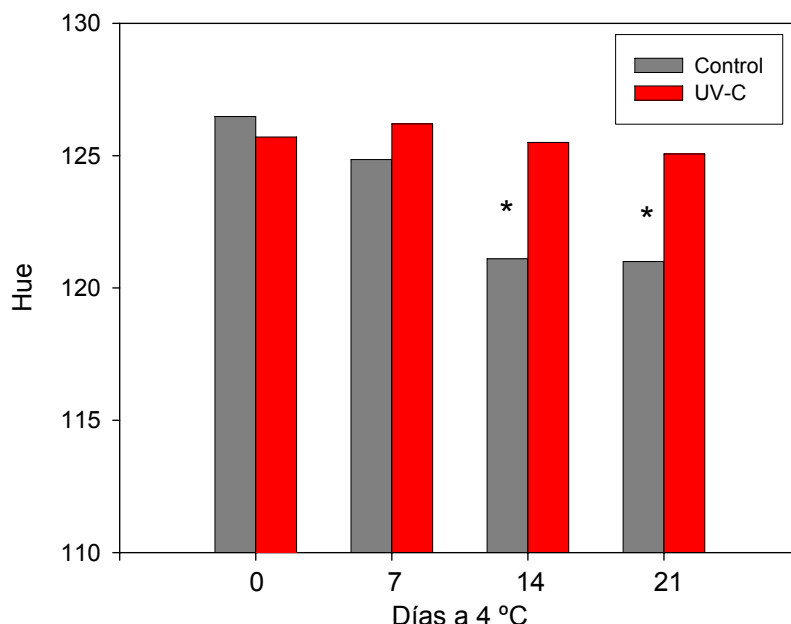


Figura I.1: Cambios en el ángulo Hue en muestras controles y tratadas con UV-C (8  $\text{kJ.m}^{-2}$ ) de brócoli mínimamente procesado almacenado durante 21 días a 4 °C. El asterisco (\*) indica diferencias significativas del respectivo control a un nivel de significancia  $\alpha = 0,05$ . ( $\text{LSD}_{\text{Hue}}=2,12$ ).



El aumento de  $L^*$  también está relacionado con el cambio de color de verde a amarillo, ya que este último representa un color más luminoso. En las muestras tratadas con radiación UV-C, se observó un aumento de  $L^*$  más lento respecto a las muestras controles. En los días 14 y 21 de almacenamiento (Figura I.2), el valor observado en las muestras tratadas fue significativamente menor.

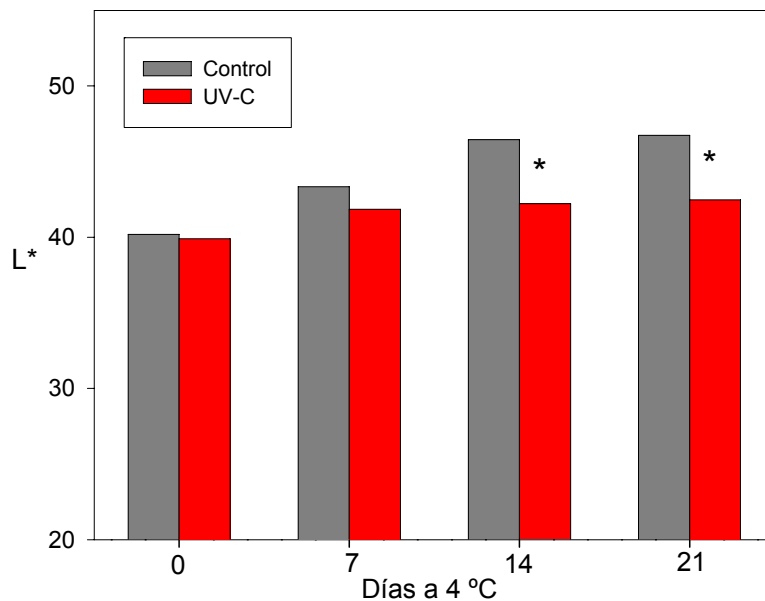


Figura I.2: Cambios en la luminosidad ( $L^*$ ) en muestras controles y tratadas con UV-C ( $8 \text{ kJ}\cdot\text{m}^{-2}$ ) de brócoli mínimamente procesado almacenado durante 21 días a 4 °C. El asterisco (\*) indica diferencias significativas del respectivo control a un nivel de significancia de  $\alpha = 0,05$ . ( $\text{LSD}_{L^*}=1,25$ )

Los resultados obtenidos para Hue y  $L^*$  indicarían que el tratamiento con radiación UV-C produjo un atraso en el amarilleamiento de las inflorescencias. La degradación de clorofila resulta en la pérdida de calidad en muchos vegetales (Mir y Beaudry, 2004). Se ha demostrado que la aplicación de bajas dosis de radiación UV-C en postcosecha reduce también la degradación de clorofila en tomates (Stevens y col, 1998).

### I.3.6 Contenido de clorofila

Durante el almacenamiento postcosecha de brócoli las cabezas muestran un intenso desverdizado y amarilleamiento causado por la degradación de clorofila (Yamauchi y col, 1997).

Las muestras controles mostraron una importante pérdida de clorofilas desde los 7 días de almacenamiento. Hacia el final de los ensayos el contenido de clorofilas era aproximadamente la mitad del inicial (Figura I.3). Las muestras tratadas con UV-C presentaron una velocidad de degradación de clorofila significativamente menor que las muestra no irradiadas. En general, el contenido de clorofila fue un 30 % mayor en los brócolis tratados con respecto a los controles.

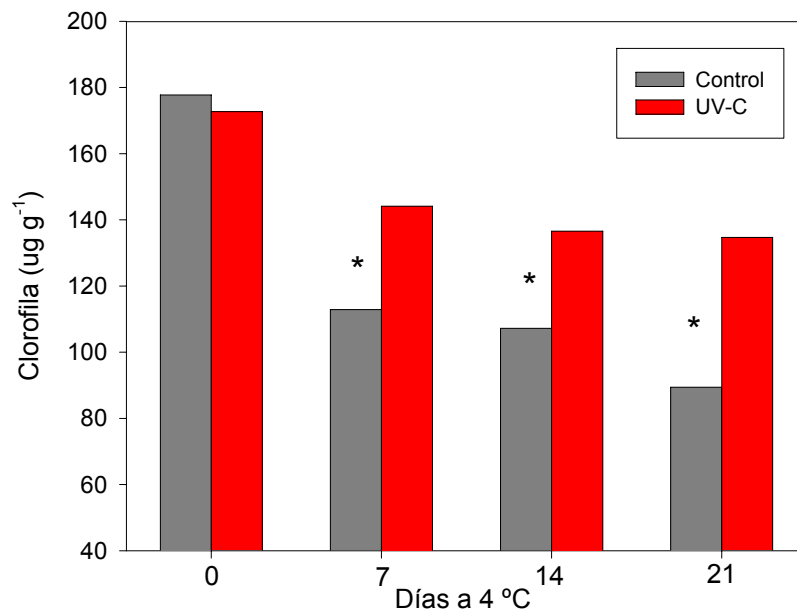


Figura I.3: Cambios en el contenido de clorofilas en muestras controles y tratadas con UV-C ( $8 \text{ kJ.m}^{-2}$ ) de brócoli mínimamente procesado almacenado durante 21 días a 4 °C. El asterisco (\*) indica diferencias significativas del respectivo control a un nivel de significancia de  $\alpha = 0,05$ . ( $\text{LSD}_{\text{clorofila}}=11,37$ ).

Costa y col. (2006) mostraron que la actividad de las enzimas clorofilasa y Mg dequelatasa, que degradan clorofila, fue menor en las cabezas enteras tratadas con radiación UV-C que en las no tratadas durante el almacenamiento a 20 °C. Trabajos previos han demostrado que las enzimas clorofilasa y peroxidasa son estimuladas por etileno (Maeda y col, 1998; Jacob-Wilk y col, 1999). Se ha demostrado que los tratamientos con radiación

UV-C reducen la producción de etileno en muchas hortalizas (Stevens y col, 1996; Maharaj y col, 1999) y podría contribuir a mantener menor actividad de las enzimas que degradan la clorofila en las flores de brócoli mínimamente procesado durante el almacenamiento a 4 °C.

### I.3.7 Contenido de azúcares totales

El cambio de metabolismo autótrofo a heterótrofo durante la senescencia conduce a un consumo de los azúcares presentes en el tejido y una consecuente disminución de su contenido. En nuestro caso, se detectó una disminución en el contenido de azúcares totales en las muestras controles y en las muestras tratadas con radiación UV-C. No se detectaron diferencias significativas en este parámetro a lo largo del almacenamiento a 4 °C (Figura I.4).

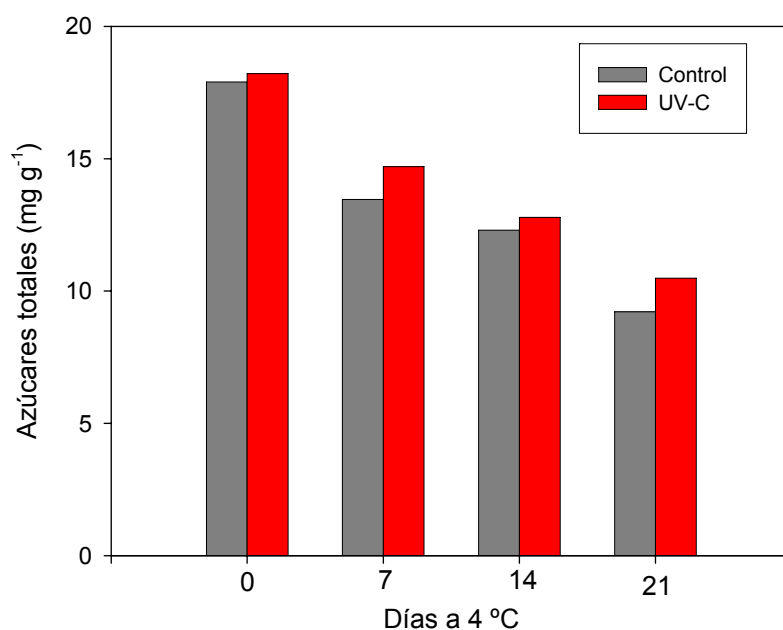


Figura I.4: Cambios en el contenido de azúcares totales en muestras controles y tratadas con UV-C (8 kJ.m<sup>-2</sup>) de brócoli mínimamente procesado almacenado durante 21 días a 4 °C. El asterisco (\*) indica diferencias significativas del respectivo control a un nivel de significancia de  $\alpha = 0,05$ . ( $LSD_{\text{azúcares totales}}=1,31$ )

### I.3.8 Contenido de azúcares reductores

El contenido de azúcares reductores disminuyó tanto en las muestras controles como en las muestras irradiadas. Sin embargo, las muestras tratadas mantuvieron niveles significativamente superiores en el contenido de azúcares reductores a lo largo del almacenamiento a 4 °C (Figura I.5). Hacia el final del mismo, las muestras tratadas mostraron un contenido de azúcares reductores un 38 % superior al de las muestras controles.

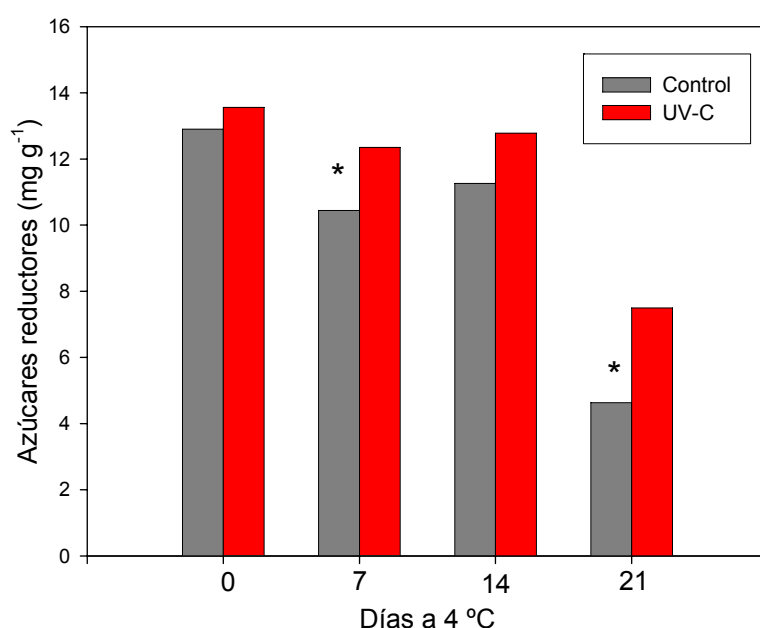


Figura I.5: Cambios en el contenido de azúcares reductores en muestras controles y tratadas con UV-C (8 kJ.m<sup>-2</sup>) de brócoli mínimamente procesado almacenado durante 21 días a 4 °C. El asterisco (\*) indica diferencias significativas del respectivo control a un nivel de significancia de  $\alpha = 0,05$ . ( $LSD_{\text{azúcares reductores}}=0,94$ ).

La disminución más marcada en el contenido de azúcares reductores de las muestras controles con respecto a las muestras irradiadas podría deberse a la mayor tasa respiratoria de las muestras control hacia el final del almacenamiento. Sin embargo, no se detectaron diferencias significativas en el contenido de azúcares totales entre las muestras tratadas y controles, indicando niveles más altos de azúcares no reductores en las muestras controles. Sánchez-Mata y col. (2003) y Able y col. (2005) encontraron una reducción en el contenido de azúcares reductores y un aumento en el contenido de azúcares no reductores durante el almacenamiento de arvejas verdes y hojas de pak choy respectivamente. Se asoció el incremento tardío en

los azúcares no reductores a la degradación de almidón presente en los tejidos. Tian y col. (1997) y Finger y col. (1999) detectaron una intensa degradación de almidón durante la senescencia postcosecha de brócoli. Asimismo, una acumulación transitoria de azúcares no reductores probablemente como producto de la degradación del almidón también ha sido descrita en brócoli durante la senescencia (Finger y col, 1999). De acuerdo a nuestros resultados y otros previos (Costa y col, 2006) el tratamiento con UV-C causa una disminución temporaria del metabolismo general del tejido. Podría haberse generado una reducción de la degradación de almidón en los brócolis tratados, reduciendo la producción de azúcares no reductores durante el almacenamiento y la senescencia.

### **I.3.9 Contenido de proteínas solubles**

Uno de los procesos característicos de la senescencia es la desorganización de las membranas, lo cual conduce a un aumento en la solubilización de proteínas. En los ensayos realizados, se detectó un aumento significativo en ambos tratamientos de las proteínas solubles luego de 7 días de almacenamiento a 4 °C. Sin embargo, no se detectaron diferencias significativas entre muestras controles y muestras tratadas. Luego de este período, el contenido de proteínas solubles permaneció constante a lo largo de todo el almacenamiento a 4 °C (Figura I.6).

En forma similar, Masih y col. (2002), trabajando con brócoli mínimamente procesado almacenado a 12 °C observaron que la cantidad de proteína soluble al día 7 disminuía para luego aumentar al día 12. Estos autores sugirieron que los pasos seguidos durante el procesamiento podrían producir estrés y activar algún sistema metabólico que dispare la formación de proteína soluble.

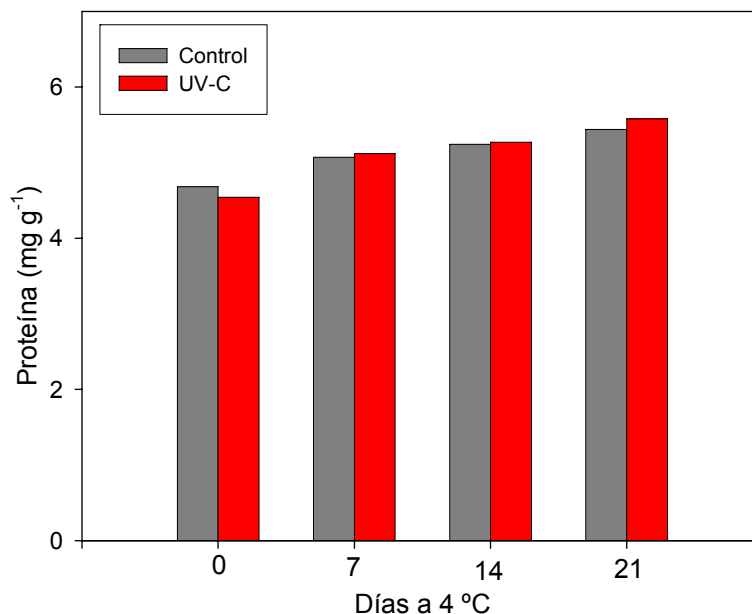


Figura I.6: Cambios en el contenido de proteínas solubles en muestras controles y tratadas con UV-C ( $8 \text{ kJ}\cdot\text{m}^{-2}$ ) de brócoli mínimamente procesado almacenado durante 21 días a  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ . El asterisco (\*) indica diferencias significativas del respectivo control a un nivel de significancia de  $\alpha = 0,05$ . ( $\text{LSD}_{\text{proteinas solubles}}=0,45$ ).

### I.3.10 Contenido de compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos, así como el ácido ascórbico, contribuyen al poder antioxidante de los vegetales, proveyendo calidad nutricional al producto.

Las muestras no tratadas mostraron una disminución significativa en la cantidad de compuestos fenólicos a partir del día 14, manteniéndose constante hasta el día 21 de almacenamiento a  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ . Por el contrario, las muestras tratadas con radiación UV-C mantuvieron prácticamente constante la cantidad de estos compuestos durante 14 días de almacenamiento y presentaron un aumento significativo en el contenido de compuestos fenólicos hacia el día 21 de almacenamiento alcanzando un valor superior al inicial (Figura I.7).

Stevens y col. (1998) y Brown y col. (2001) hallaron un aumento en la actividad de fenilalanina amonioliasa (PAL) en duraznos y semillas de repollo respectivamente después de un tratamiento con radiación UV-C. Dado que PAL es una de las enzimas claves en la síntesis de fenoles, el incremento en el

contenido de compuestos fenólicos en las flores tratadas podría estar relacionado con el aumento de la actividad de PAL.

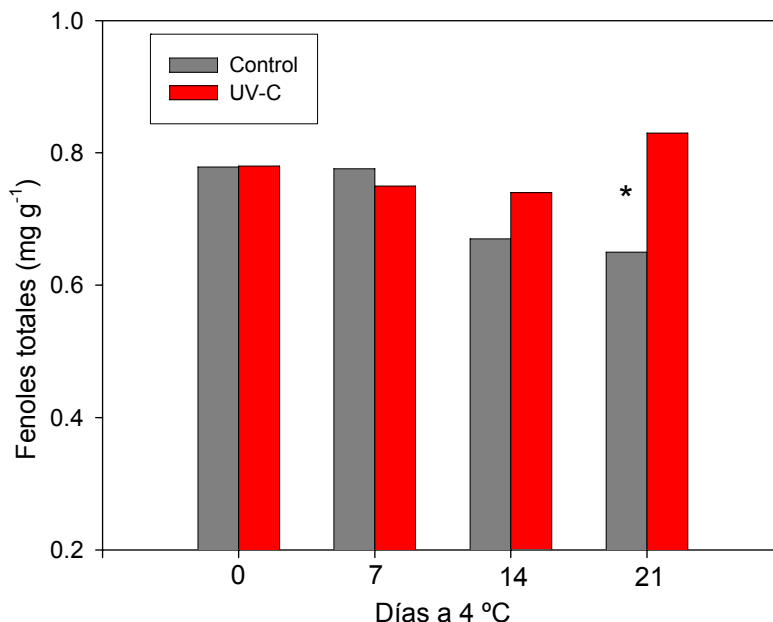


Figura I.7: Cambios en el contenido de fenoles totales en muestras controles y tratadas con UV-C ( $8 \text{ kJ.m}^{-2}$ ) de brócoli mínimamente procesado almacenado durante 21 días a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ . El asterisco (\*) indica diferencias significativas del respectivo control a un nivel de significancia de  $\alpha = 0,05$ . ( $\text{LSD}_{\text{fenoles totales}}=0,04$ ).

### I.3.11 Contenido de ácido ascórbico

El contenido de ácido ascórbico fue disminuyendo durante el almacenamiento a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  tanto en las muestras controles como en las tratadas. Este descenso fue muy importante en los controles, alcanzando un valor aproximadamente 50 % inferior al inicial (Figura I.8). Sin embargo, en las muestras tratadas con UV-C el descenso fue más moderado y hacia el día 21 estas muestras contenían un 33 % más que los respectivos controles.

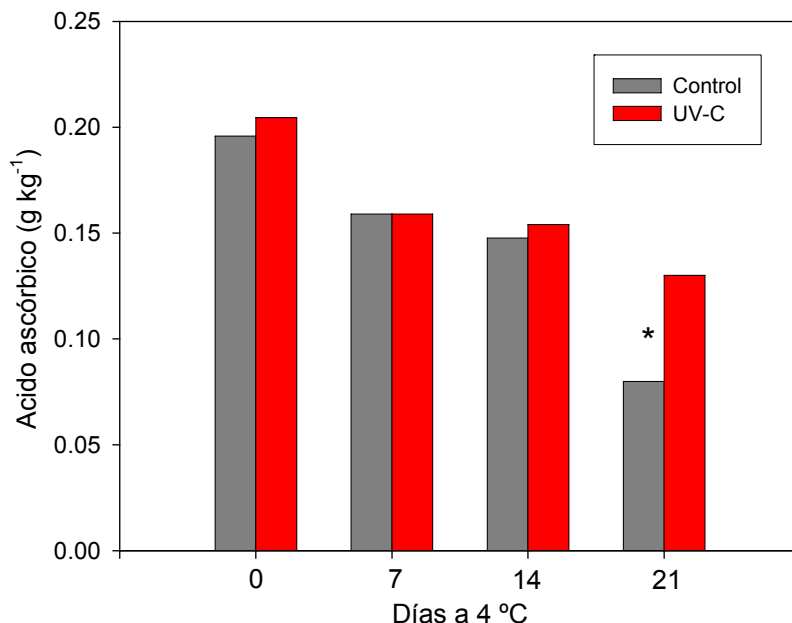


Figura I.8: Cambios en el contenido de ácido ascórbico en muestras controles y tratadas con UV-C ( $8 \text{ kJ.m}^{-2}$ ) de brócoli mínimamente procesado almacenado durante 21 días a  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ . El asterisco (\*) indica diferencias significativas del respectivo control a un nivel de significancia de  $\alpha = 0,05$ . ( $\text{LSD}_{\text{ácido ascórbico}}=0,016$ ).

La disminución en el contenido de ácido ascórbico también fue observada durante la senescencia de cabezas enteras de brócoli almacenadas a  $20 \text{ }^{\circ}\text{C}$  (Nishikawa y col, 2003). Sin embargo, otros estudios encontraron que en brócoli almacenado 21 días a  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$  el ácido ascórbico se mantenía estable (Paradis y col, 1995). Estas diferencias podrían deberse a los diferentes cultivares utilizados en los experimentos.

### I.3.12 Actividad antioxidante

Desde el punto de vista nutricional, un parámetro interesante es el nivel de antioxidantes. Estos compuestos podrían jugar un rol crítico en la salud humana pudiendo prevenir el daño oxidativo de moléculas y componentes celulares.

Las muestras controles tuvieron una actividad antioxidante prácticamente constante durante toda el período de almacenamiento. Las muestras tratadas con radiación UV-C también mostraron una actividad antioxidante constante,



similar a las muestras control, hasta el día 14. Sin embargo, en el día 21 se produce un aumento significativo en la actividad antioxidante (Figura I.9).

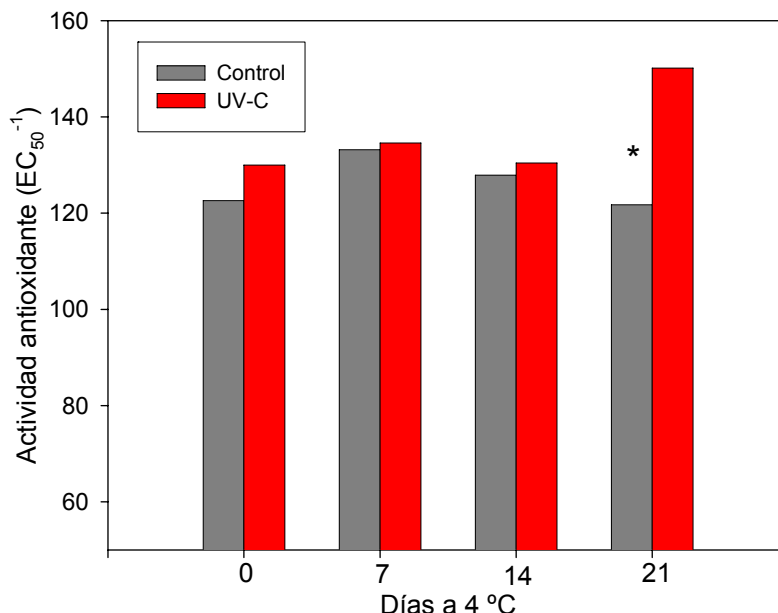


Figura I.9: Evolución de la actividad antioxidante en muestras controles y tratadas con UV-C (8 kJ.m<sup>-2</sup>) de brócoli mínimamente procesado almacenado durante 21 días a 4 °C. El asterisco (\*) indica diferencias significativas del respectivo control a un nivel de significancia de  $\alpha = 0,05$ . (LSD<sub>actividad antioxidante</sub>=8,33).

Como consecuencia, las muestras tratadas con radiación UV-C presentaron en el día 21 una mayor actividad antioxidante que las muestras controles.

Costa y col. (2002) encontraron que la radiación UV-B induce el sistema antioxidante de defensa en cotiledones de girasol, mientras que Boveris y col. (2001) sugieren que la radiación UV-C aumenta la capacidad antioxidante en cotiledones de soja. Costa y col. (2006), utilizando cabezas enteras de brócoli almacenadas a 20 °C, observaron que la capacidad antioxidante de las muestras tratadas con radiación UV-C se mantenía constante durante todo el almacenamiento, mientras que este parámetro disminuía significativamente en los controles.

El aumento en la capacidad antioxidante de las muestras tratadas con radiación UV-C podría estar relacionado con el aumento observado en el contenido de fenoles de las mismas.

### I.3.13 Análisis microbiológico

Se detectó un aumento continuo en el recuento de las UFC de hongos y bacterias durante el almacenamiento tanto en las muestras controles como en las tratadas (Figuras I.10 y I.11). Sin embargo, este aumento fue significativamente superior en los controles respecto a las muestras tratadas con radiación UV-C, para todos los días de almacenamiento a 4 °C.

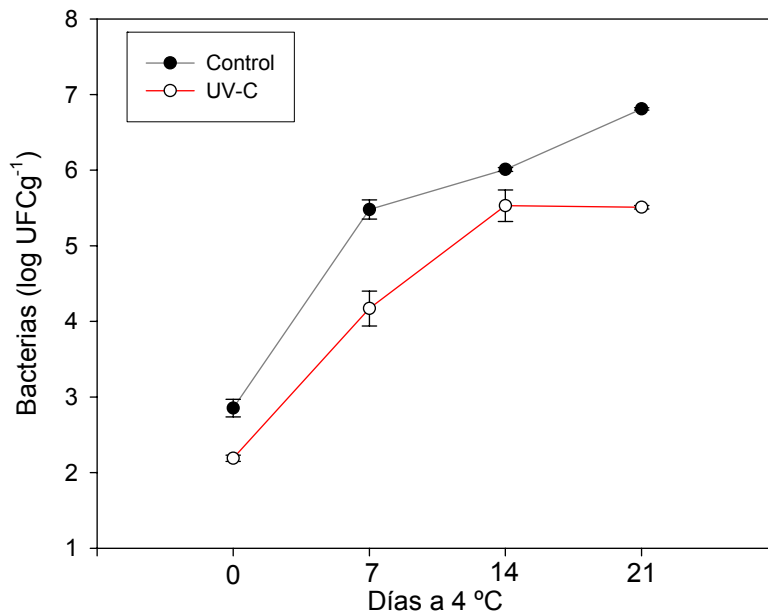


Figura I.10: Evolución de las unidades formadoras de colonias (log UFC g<sup>-1</sup>) de bacterias totales en muestras controles y tratadas con UV-C (8 kJ.m<sup>-2</sup>) de brócoli mínimamente procesado almacenado durante 21 días a 4 °C. (LSD<sub>bacterias</sub>=0,22).

Estos resultados indican que el tratamiento con radiación UV-C sobre brócoli mínimamente procesado fue efectivo en reducir la población inicial de hongos y bacterias y retardar su crecimiento durante el almacenamiento a 4 °C. Análogamente, Stevens y col. (1998) habían demostrado que la radiación UV-C puede reducir la germinación de conidios de “podredumbre parda” en duraznos y reducir el porcentaje de fruta infectada. Vicente y col. (2005 (b)) encontraron que la radiación UV-C redujo la incidencia de enfermedades en pimiento.

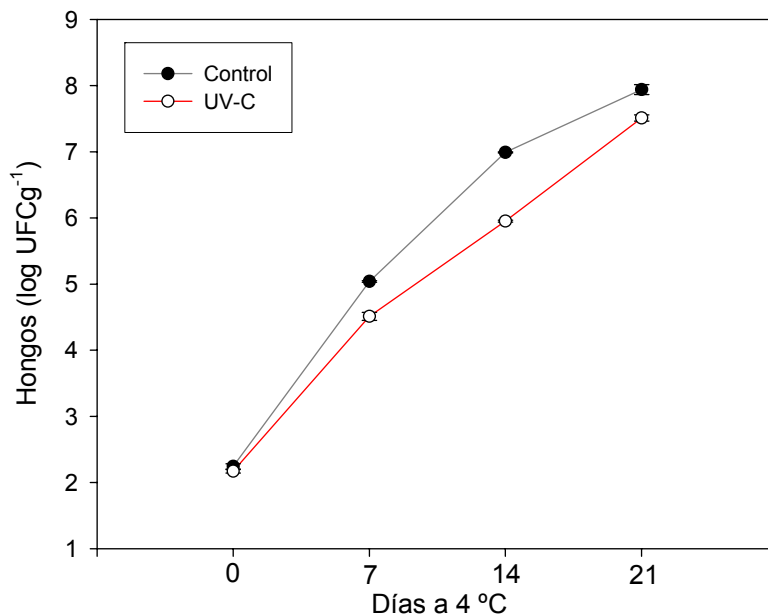


Figura I.11: Evolución de las unidades formadoras de colonias (log UFC g<sup>-1</sup>) de hongos en muestras controles y tratadas con UV-C (8 kJ.m<sup>-2</sup>) de brócoli minimamente procesado almacenado durante 21 días a 4 °C. (LSD<sub>hongos</sub> = 0,07).

La radiación UV-C produce un efecto directo sobre la población de microorganismos afectando el ADN microbiano pero también puede generar un efecto indirecto induciendo resistencia, tal como observaron Nigro y col, (1998) con un pre-tratamiento con radiación UV-C en uvas de mesa seguido de una inoculación artificial con *B. cinerea*. Estos autores detectaron una reducción en el porcentaje de infección lo que indicaría una inducción de la resistencia del fruto al ataque del patógeno. Por su parte, Stevens y col. (1998), en duraznos, y Brown y col. (2001), en semillas de repollo, encontraron que la radiación UV-C aumenta la actividad de PAL, a la vez que disminuye el porcentaje de infección. Como ya se mencionó previamente, un aumento en la actividad de PAL estaría relacionado con un aumento en el contenido de compuestos fenólicos, los cuales pueden participar en mecanismos de defensa. La radiación UV-C induce la formación de fitoalexinas, compuestos fenólicos que participan activamente en mecanismos de defensa frente a enfermedades, como por ejemplo resveratrol en uvas (Langcake y Pryce, 1997) y hidroxifaseolina en soja (Bridge y Klarman, 1973).

#### **I.4 CONCLUSIONES**

La aplicación de radiación UV-C en una dosis de 8 kJ.m<sup>-2</sup> en brócoli mínimamente procesado permite retrasar la pérdida de color y degradación de clorofilas durante el almacenamiento a 4 °C. Asimismo, el tratamiento provoca una menor pérdida de electrolitos y actividad respiratoria, sugiriendo un retraso en el daño tisular que acompaña a la senescencia. Este retraso de la senescencia permite mantener el producto con mejor calidad durante este período. Sin embargo, este no fue el único efecto benéfico del tratamiento observado. Esta dosis de radiación permite aumentar los niveles de antioxidantes y disminuir el desarrollo de microorganismos lo que conlleva a mejorar el producto desde el punto de vista nutricional y sanitario.

## **CAPÍTULO II**

Efecto del tratamiento térmico con aire caliente sobre  
la senescencia y calidad postcosecha de brócoli  
mínimamente procesado almacenado a baja  
temperatura

## II.1 INTRODUCCIÓN

Tal como fue mencionado en el capítulo I, en los últimos tiempos ha habido un interés creciente en disminuir el uso de agroquímicos durante la postcosecha con el objetivo de controlar bacterias, hongos e insectos patógenos. En este sentido, los tratamientos térmicos de alta temperatura surgieron como una alternativa para dicho control.

Uno de los objetivos principales de la utilización de tratamientos térmicos de alta temperatura es lograr un efecto diferencial sobre los tejidos y sobre los patógenos (insectos, hongos, bacterias). El tratamiento debe resultar agresivo para los patógenos pero no debe causar daño en el producto tratado. De esta manera, se logra que en el tejido se produzca una situación de estrés muy leve de la cual se puede recuperar. Por esta razón, antes de utilizar esta tecnología en un sistema determinado es muy importante seleccionar la temperatura y el tiempo de tratamiento que resulte adecuado para cada caso particular.

Hay tres maneras de efectuar el tratamiento térmico:

➤ *Inmersión en agua caliente o asperjado*

La inmersión en agua caliente originalmente fue usada para el control de hongos pero luego se extendió su uso para la desinfección de insectos. La inmersión en agua caliente es efectiva para el control de hongos patógenos debido a que las esporas se encuentran sobre la superficie o sobre las primeras capas de células de la piel del vegetal. Generalmente estos tratamientos son aplicados pocos minutos a temperaturas mayores a las necesarias para matar a los patógenos. Muchas frutas y hortalizas toleran temperaturas del agua entre 50 y 60 °C por más de 10 minutos (Lurie, 1998)

➤ *Vapor*

El tratamiento con vapor es un método por el cual se calienta el material con aire a 40-50 °C saturado con vapor de agua para eliminar huevos y larvas de insectos como tratamientos cuarentenarios (Lurie, 1998).

➤ *Aire caliente*

El aire caliente puede aplicarse colocando el vegetal en cámaras de calentamiento con o sin aire forzado. El proceso de calentamiento con aire es más lento que en el caso de los tratamientos con agua o vapor, lo que determina en general la realización de tratamientos a temperaturas más bajas y períodos más prolongados. Los tratamientos térmicos con aire caliente resultan de especial interés para estudiar los efectos fisiológicos que el choque térmico ocasiona sobre diversos productos vegetales (Klein y Lurie, 1991; 1992). Por otra parte, resultan la única estrategia posible en el caso de materiales que puedan ser afectados por elevada humedad o mojado superficial. En el caso de los tratamientos para el control de insectos, la utilización de tratamientos con aire caliente resulta beneficiosa en algunos productos que puedan ser sensibles al calentamiento a velocidades elevadas. Se han desarrollado tratamientos con aire caliente para el control de la mosca del Mediterráneo, la mosca del melón y la mosca oriental en papayas (Armstrong y col, 1995). La exposición a altas temperaturas con aire caliente forzado también puede reducir el ataque de *Botrytis cinerea* (Klein y col, 1997; Fallik y col, 1993) y de *Penicillium expansum* en manzanas (Fallik y col, 1996; Klein y col, 1997).

Por otro lado, se ha demostrado que los tratamientos térmicos de alta temperatura generan una situación de estrés leve y transitorio que retrasa el proceso normal de maduración o senescencia postcosecha. Asimismo, en muchos casos el estrés generado hace que el tejido se torne más resistente frente a una nueva situación de estrés, permitiendo atenuar y/o retrasar desórdenes fisiológicos que ocurren durante el almacenamiento.

Entre los efectos generados podemos mencionar:

*Termotolerancia*

En general, las altas temperaturas inducen la síntesis de un tipo específico de proteínas, las proteínas de choque térmico (HSP). El desarrollo de termotolerancia ha sido asociada a la acumulación de HSPs y la pérdida de ésta con la desaparición de las HSP (Vierling, 1991). El desarrollo de termotolerancia es dependiente de la temperatura de exposición, esta debe ser

suficiente para iniciar la síntesis de HSP, pero no excesiva como para inhibir la transcripción de las HSP. Temperaturas de 35-40 °C han probado ser efectivas, dependiendo del producto.

#### *Daño por frío*

Se ha observado que los tratamientos térmicos permiten disminuir el daño por frío. Por ejemplo, en pomelos almacenados a bajas temperaturas (Porat y col, 2000) se observó que la aplicación de un tratamiento térmico disminuyó la incidencia del daño por frío. En manzanas, tratamientos térmicos aplicados antes del almacenamiento refrigerado, disminuyen la acumulación de  $\alpha$ -farneseno y por lo tanto la formación de escaldaduras como consecuencia de la oxidación de este compuesto (Lurie y Klein, 1990). En granadas tratadas con agua caliente a 45 °C por 4 minutos, y luego almacenadas a 2 °C por 90 días, los síntomas debido al daño por frío fueron reducidos significativamente. El tratamiento térmico podría inducir mecanismos de tolerancia a las bajas temperaturas a través de la estimulación de la síntesis de poliaminas (Mirdehghan, 2007).

#### *Ablandamiento*

Se ha demostrado que los tratamientos térmicos pueden retrasar la degradación de la pared celular. En frutilla un tratamiento térmico 45 °C 3 horas con aire caliente redujo la actividad de enzimas de degradación de pared como la glucanasa, xilosidasa, poligaracturonasa y galactosidasa (Vicente y col, 2005 (a)). Este tratamiento provoca una inhibición temporaria de la transcripción de genes que codifican para proteínas asociadas a la degradación de la pared, conduciendo a un retraso en el ablandamiento del fruto (Martínez y Civello, 2008)

#### *Cambio de color*

Los tratamientos térmicos postcosecha pueden retrasar la degradación de algunos pigmentos. Por ejemplo, pueden inhibir síntesis de antocianinas en espárragos (Siomos y col, 2005) y disminuir el pardeamiento en lechugas (Saltveit, 2000). La síntesis de carotenoides también es inhibida por temperaturas superiores a 30 °C, por ejemplo la inhibición en la síntesis de



licopeno en tomate es causada por la inhibición de la transcripción de genes de fitoeno-sintasa que codifican para la síntesis de licopeno (Lurie y col, 1996).

#### *Síntesis de etileno*

La inhibición de la maduración como respuesta al tratamiento térmico está mediada por su efecto sobre la hormona de maduración: el etileno. Durante el periodo de calentamiento no sólo es inhibida la producción endógena de etileno sino también la respuesta al etileno exógeno, aunque la inhibición es reversible (Lurie, 1998). Este fenómeno se debería a la inhibición de la síntesis de ARNm relacionado a la producción de etileno y a los receptores del mismo necesarios para la maduración. Por ejemplo, estrés con altas temperaturas sobre kiwi inhibieron la síntesis de etileno y disminuyeron significativamente la actividad de las enzimas ACC sintasa y ACC oxidasa (Antunes y Sfakiotakis, 2000).

El tratamiento térmico debe generar una situación de estrés que no sea demasiado intensa y que permita al tejido recuperarse luego de un cierto tiempo. En general, luego de los tratamientos, los frutos o vegetales son almacenados a temperaturas entre 15 °C y 20 °C de modo de poder evaluar rápidamente el efecto del calor aplicado sobre diversos procesos de maduración y senescencia postcosecha. Así, por ejemplo, el tratamiento térmico retrasa la maduración en frutillas (Vicente y col, 2002) o en manzana (Lurie y Klein, 1990) durante el almacenamiento a 20 °C. Sin embargo, el efecto del tratamiento térmico puede suavizarse o incluso desaparecer si el material es almacenado a bajas temperaturas. En frutillas, el efecto benéfico del tratamiento térmico mencionado previamente (Vicente y col, 2002) se torna nulo si el fruto es almacenado durante más de 2 semanas a 0 °C.

#### **Tratamientos térmicos en vegetales frescos cortados**

Los tratamientos térmicos de alta temperatura también han sido ensayados en vegetales frescos cortados. Por ejemplo, un tratamiento térmico en agua a 45 °C por periodos cortos preservó la firmeza y el contenido de sólidos solubles en kiwi cortado (Beirão-da-Costa y col, 2006). En cebollas mínimamente procesadas, el tratamiento térmico permitió mantener el contenido de azúcares solubles constante (Hong y col, 2000). En el caso de duraznos el

tratamiento con agua a 50 °C por 10 minutos cuatro horas antes del corte permitió controlar el pardeamiento y retener la firmeza durante el almacenamiento (Koukounaras y col, 2008). Un shock térmico a 45 °C en discos de tomate protegió los componentes de la membrana del daño causado por el almacenamiento a baja temperatura (Saltveit, 2005).

### **Tratamiento térmico en brócoli**

Desde hace ya algunos años se ha estado estudiando también el efecto de los tratamientos térmicos de alta temperatura en brócoli. Tratamientos con agua caliente (Forney, 1995; Tian y col, 1996, 1997) y aire caliente (Terai y col, 1999) demostraron retrasar el amarilleamiento y reducir la tasa de producción de etileno en cabezas enteras de brócoli. Suzuki y col. (2005) sugirieron que la inhibición en la producción de etileno en brócoli tratado térmicamente podría deberse a la supresión de la expresión de la enzima ACC sintasa.

Funamoto y col. (2002) indicaron que el tratamiento de brócoli con aire caliente a 50 °C durante 2 horas reduce la degradación de clorofila, debido a la disminución de la actividad de enzimas que degradan clorofila. Costa y col. (2005) hallaron que las actividades de clorofilasa, Mg-dequelatasa y peroxidasa disminuyeron por la aplicación de un tratamiento con aire caliente a 48 °C durante 3 horas.

## **II.2 OBJETIVO**

El tratamiento térmico puede retrasar la senescencia de cabezas enteras de brócoli almacenadas 20 °C (Costa y col, 2005). Sin embargo, el almacenamiento a bajas temperaturas sumado al intenso estrés que genera el procesamiento mínimo introduce una cierta incertidumbre a los efectos beneficiosos que pueden producir los tratamientos térmicos. En este capítulo se evalúa el efecto de un tratamiento de alta temperatura con aire caliente sobre la senescencia y calidad de brócoli mínimamente procesado durante el almacenamiento a 0 °C.

## **II.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Las inflorescencias de brócoli se procesaron mínimamente, se trataron con aire caliente a 48 °C por 3 horas y luego se almacenaron a 0 °C durante tres semanas. Las condiciones del tratamiento se seleccionaron de acuerdo a resultados previos obtenidos en el laboratorio del CIDCA (Costa y col, 2005)

### **II.3.1 Apariencia general**

Durante el almacenamiento a 0 °C las muestras tratadas térmicamente poseyeron mejor apariencia general que las muestras controles especialmente hacia el final del almacenamiento. En cuanto al color se observó que las muestras tratadas conservaban el verde y se mantenían más frescas que los controles a lo largo del almacenamiento.

### **II.3.2 Pérdida de peso**

Se detectó un aumento progresivo en la pérdida de peso durante el almacenamiento, tanto en las muestras control como en las tratadas térmicamente. Dicha pérdida alcanzó un máximo de 4 % después de 21 días de almacenamiento en las muestras control. Si bien el tratamiento térmico reduce ligeramente la pérdida de peso, las diferencias entre muestras controles y tratadas no fueron significativas (Tabla II.1).

### **II.3.3 Actividad respiratoria**

Diferentes tipos de daños o lesiones pueden incrementar la actividad respiratoria en tejidos vegetales. Se midió la tasa respiratoria de brócoli mínimamente procesado y se detectó un leve incremento en la actividad respiratoria después de 14 días de almacenamiento tanto en las muestras tratadas como en las muestras controles (Tabla II.1). Posteriormente se observó una reducción en la producción de CO<sub>2</sub> alcanzando valores cercanos a

los iniciales. El tratamiento térmico no afectó la actividad respiratoria durante todo el almacenamiento. Se ha observado que, en muchos casos, la senescencia poscosecha de brócoli presenta un incremento en la actividad respiratoria (Makhlouf y col, 1989). En cabezas intactas de brócoli, un tratamiento térmico similar al descrito en el presente trabajo, provocó un retraso en la senescencia e inhibió la tasa respiratoria (Costa y col, 2005). Sin embargo, en este caso no se detectó ninguna inhibición en el pico de producción de CO<sub>2</sub> por el tratamiento térmico. Probablemente, el mayor daño producido por el procesamiento y corte de las inflorescencias genera una actividad respiratoria más elevada que no puede ser revertida por el tratamiento térmico aplicado.

Tabla II.1: Cambios en la pérdida de peso, pérdida de electrolitos y producción de CO<sub>2</sub> en muestras controles (C) y tratadas con aire caliente 48 °C / 3h (T) de brócoli mínimamente procesado almacenado a 0 °C durante 21 días.

		Días a 0 °C			
		0	7	14	21
<b>Pérdida de peso (%)</b>	<b>C</b>	0	1,81 ± 0,19	2,83 ± 0,33	4,02 ± 0,66
	<b>T</b>	0	1,56 ± 0,13	2,46 ± 0,14	3,96 ± 0,56
LSD = 0,586					
<b>Pérdida de electrolitos (%)</b>	<b>C</b>	0.04 ± 0,01	2.35 ± 0,2	5,99 ± 2	23,91 ± 5.6
	<b>T</b>	0.03 ± 0,01	2.29 ± 0,2	4,82 ± 3.2	5,28 ± 1.8
LSD = 3,2					
<b>Producción de CO<sub>2</sub> (mL.g<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>)</b>	<b>C</b>	0,123 ± 0,008	0,111 ± 0,014	0,154 ± 0,021	0,096 ± 0,006
	<b>T</b>	0,130 ± 0,043	0,101 ± 0,009	0,153 ± 0,031	0,084 ± 0,009
LSD = 0,033					

(\*) Indica diferencia significativa entre (C) y (T). P < 0,05.

### II.3.4 Pérdida de electrolitos

La medida de la pérdida de electrolitos es un buen parámetro para evaluar la integridad de las membranas celulares. En este trabajo, hasta el día 14 de almacenamiento no se encontraron aumentos significativos en la pérdida de electrolitos, tanto en las muestras control como en las tratadas térmicamente. Sin embargo, después de 21 días de almacenamiento, en las muestras no

tratadas se observó un aumento importante en la pérdida de electrolitos, mientras que en las muestras tratadas térmicamente el aumento fue mucho menor (Tabla II.1), por lo que estas muestras presentaron un valor significativamente menor a aquel medido en los controles. Diversos trabajos sugieren que los tratamientos térmicos de alta temperatura protegen a los componentes de la membrana involucrados en el movimiento de iones a través de ella (Saltveit, 2005). La protección conferida por el tratamiento térmico podría reducir la pérdida de electrolitos desde el citosol tal como se lo describe en tomate (Saltveit, 2005), en frutilla (Vicente y col, 2006) y en bok choy (Lu, 2007).

### II.3.5 Color superficial

Diferentes trabajos han demostrado la reducción del amarilleamiento en cabezas de brócoli tratadas con agua caliente (Forney y col, 1995; Tian y col, 1997) o aire caliente (Funamoto y col, 2002; Costa y col 2005).

En este caso, el color superficial se evaluó a través de los parámetros Hue y L\*.

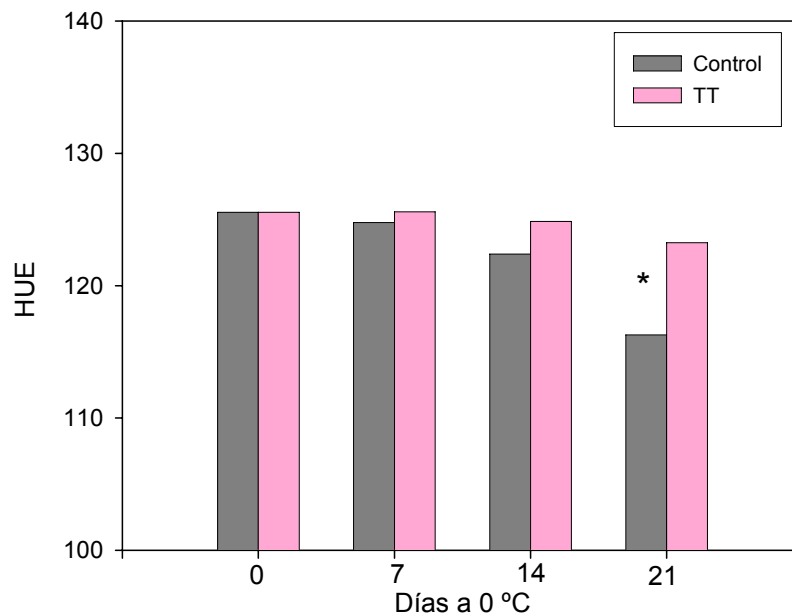


Figura II.1: Efecto del tratamiento térmico con aire caliente 48 °C / 3h (TT) sobre el ángulo Hue en brócoli mínimamente procesado almacenado durante 21 días a 0 °C. El asterisco (\*) indica diferencias significativas. ( $LSD_{Hue}=1,8$ )

Las muestras controles mostraron valores iniciales de Hue de aproximadamente 125, que prácticamente no varió hasta los 14 días de almacenamiento, sin embargo después de 21 días el valor de Hue disminuyó aproximadamente hasta 116 (Figura II.1), indicando un amarilleamiento de las inflorescencias.

El almacenamiento a bajas temperaturas en general reduce la pérdida de color verde. En nuestro caso, el amarilleamiento se hizo visible hacia el final del almacenamiento. Las muestras tratadas térmicamente no mostraron el mismo comportamiento. En éstas, la disminución del ángulo Hue fue menor respecto a las controles, mostrando valores de 123 después de 21 días de almacenamiento, indicando una permanencia más duradera del color verde.

La luminosidad ( $L^*$ ) no varió durante los primeros 14 días de almacenamiento en muestras controles y tratadas. Un aumento en los valores de  $L^*$  del 9 % con respecto al valor inicial fue observado en las muestras controles a los 21 días de almacenamiento. En tanto, en las muestras tratadas el valor de  $L^*$  sólo aumentó un 4 % respecto al valor inicial, observándose diferencias significativas con los controles en este parámetro luego de 21 días de almacenamiento (Figura II.2).

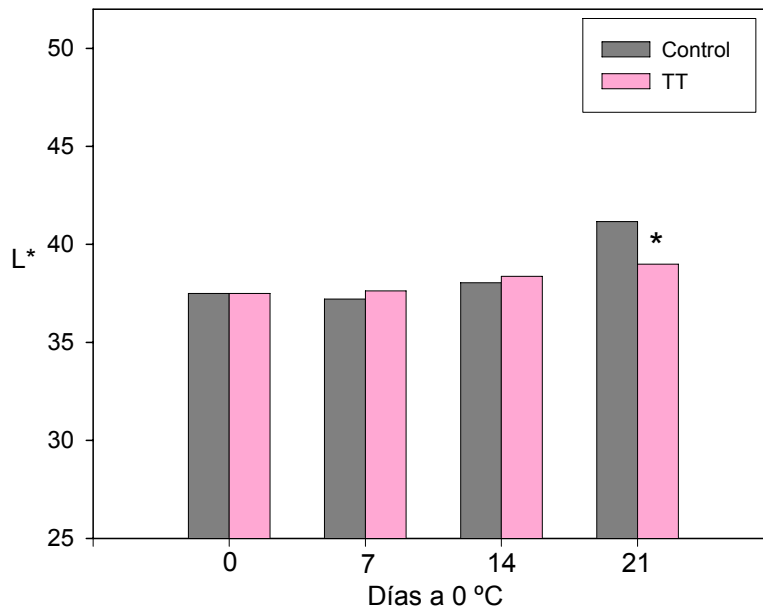


Figura II.2: Efecto del tratamiento térmico con aire caliente 48 °C / 3h (TT) sobre la luminosidad ( $L^*$ ) en brócoli mínimamente procesado almacenado durante 21 días a 0 °C. El asterisco (\*) indica diferencias significativas ( $LSD_{L^*}=1,09$ ).

Considerando los cambios en ambos parámetros, se puede concluir que las muestras tratadas térmicamente conservaron mejor el color superficial después de 21 días de almacenamiento a 0 °C.

### II.3.6 Contenido de clorofilas

Los cambios en el contenido total de clorofila mostraron tendencias similares a aquellas observadas en el color superficial. En las muestras controles se observó una disminución continua en el contenido de clorofila alcanzando una pérdida de aproximadamente un 50 % del valor inicial después de tres semanas a 0 °C. Las muestras tratadas térmicamente presentaron un importante retraso en la degradación de clorofila las cuales sólo perdieron aproximadamente un 20 % durante el mismo período (Figura II.3).

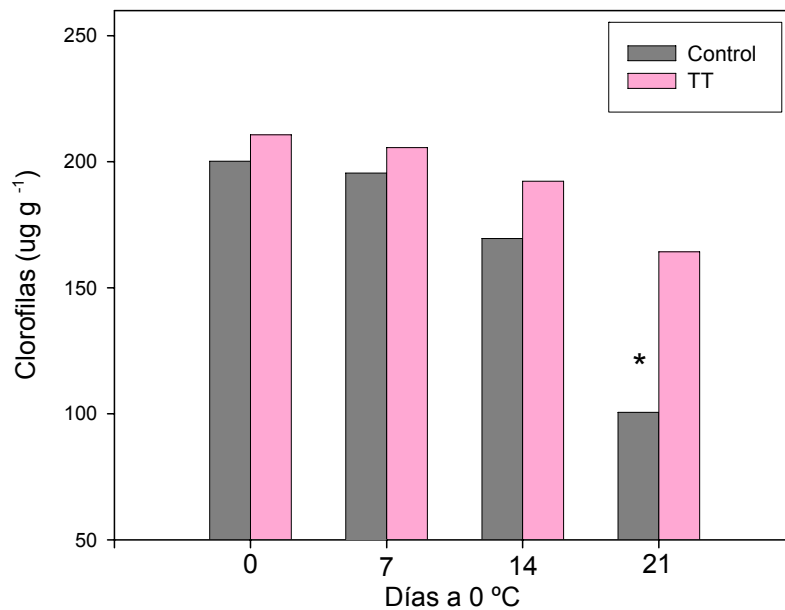


Figura II.3: Efecto del tratamiento térmico con aire caliente 48 °C / 3h (TT) sobre el contenido de clorofila en brócoli mínimamente procesado almacenado durante 21 días a 0 °C. El asterisco (\*) indica diferencias significativas. ( $LSD_{clorofila}=23$ ).

La pérdida de clorofila durante la senescencia postcosecha de brócoli fue correlacionada con un incremento en las actividades de enzimas involucradas en su catabolismo como clorofilasa y Mg-dequelatasa (Costa y col, 2005). Trabajos previos demostraron que los tratamientos térmicos de alta temperatura disminuyeron la actividad de estas enzimas (Funamoto y col,



2002; Costa y col, 2005) lo que podría explicar la menor degradación de clorofilas en el brócoli mínimamente procesado tratado térmicamente.

### II.3.7 Contenido de compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos son importantes desde el punto de vista nutricional ya que contribuyen a mantener un alto nivel de antioxidantes. En el presente trabajo, el contenido de fenoles totales en brócoli mínimamente procesado disminuyó levemente en las muestras controles después de 21 días de almacenamiento. (Figura II.4). En las muestras tratadas, los fenoles disminuyeron abruptamente hacia el día 7 de almacenamiento recuperándose hacia el día 14. Con este comportamiento, las muestras tratadas presentaron contenidos de fenoles significativamente menores a los 7 y 14 días. El descenso de fenoles en los controles al cabo de 21 días hizo que las muestras tratadas alcanzaron un nivel similar a los controles en el contenido de compuestos fenólicos.

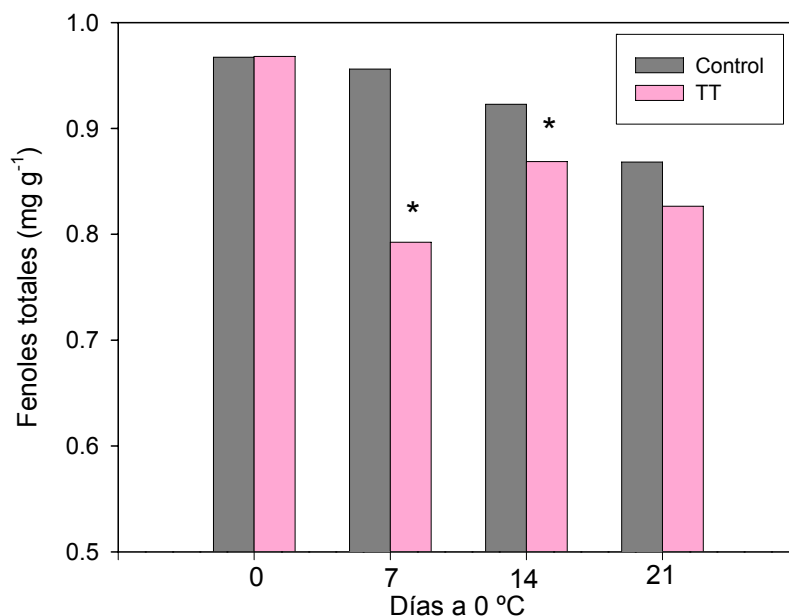


Figura II.4: Efecto del tratamiento térmico con aire caliente 48 °C / 3h (TT) sobre el contenido de fenoles totales en brócoli mínimamente procesado almacenado durante 21 días a 0 °C. El asterisco (\*) indica diferencias significativas. (LSD<sub>Fenoles totales</sub>=0,046)

Una de las enzimas claves en la síntesis de compuestos fenólicos es la fenilalanina amonioliasa (PAL) cuya actividad estaría relacionada directamente

con el contenido de compuestos fenólicos. En frutillas un tratamiento térmico redujo la actividad de PAL y disminuyó la acumulación de antocianinas, el principal pigmento en esta fruta (Civello y col, 1997). De manera similar, la aplicación en lechuga cortada de un tratamiento térmico con agua a 50 °C durante 2 minutos provocó una reducción en la actividad de PAL (Roura y col, 2008). En este caso, la reducción en los compuestos fenólicos a los 7 días de almacenamiento en los brócolis tratados térmicamente podría reflejar una inhibición reversible de la actividad de PAL debido al tratamiento térmico.

### II.3.8 Actividad antioxidante

La actividad antioxidante de las muestras controles se mantuvo casi constante hasta el día 14 de almacenamiento y luego disminuyó (Figura II.5). En los brócolis tratados térmicamente hubo una reducción significativa en la actividad antioxidante al día 7 de almacenamiento alcanzando valores más bajos que los controles. Hacia el día 14, la actividad antioxidante se incrementó pero se mantuvo más baja que los controles. Al final del almacenamiento las muestras controles y tratadas térmicamente presentaron similares niveles de actividad antioxidante.

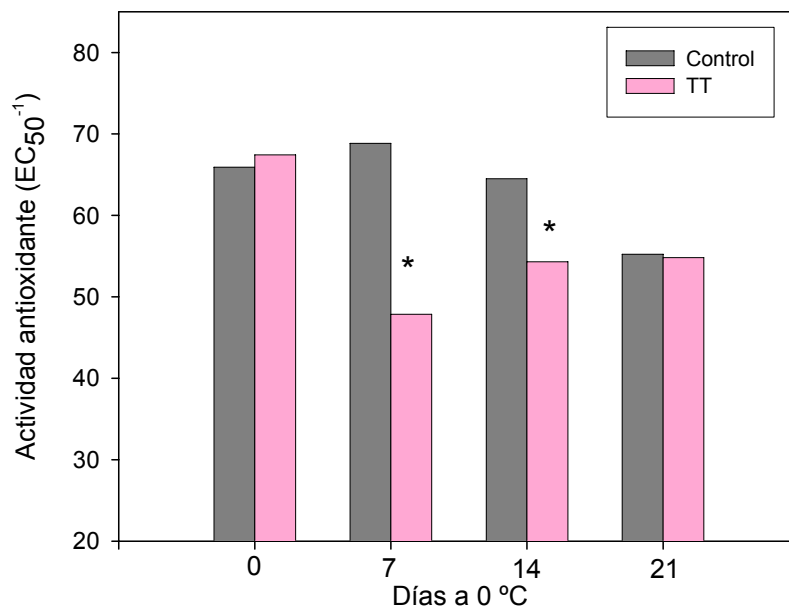


Figura II.5: Efecto del tratamiento térmico con aire caliente 48 °C / 3h (TT) sobre la actividad antioxidante en brócoli mínimamente procesado almacenado durante 21 días a 0 °C. El asterisco (\*) indica diferencias significativas. ( $LSD_{EC_{50}^{-1}}=6,21$ )

Los cambios ocurridos en la actividad antioxidante siguen patrones similares a aquellos detectados en el contenido de compuestos fenólicos (Figura II.4), lo que probablemente indicaría que la capacidad antioxidante de brócoli es debida principalmente a los compuestos fenólicos.

### II.3.9 Contenido de proteínas

Durante la senescencia postcosecha de brócoli, se observó una disminución en el contenido de proteína soluble en las muestras controles y tratadas térmicamente durante el almacenamiento a 0 °C. Este descenso fue menor en las muestras tratadas térmicamente, lo que causó que hacia el final del almacenamiento estas muestras contuvieran un 25 % más de proteínas solubles que los respectivos controles (Figura II.6).

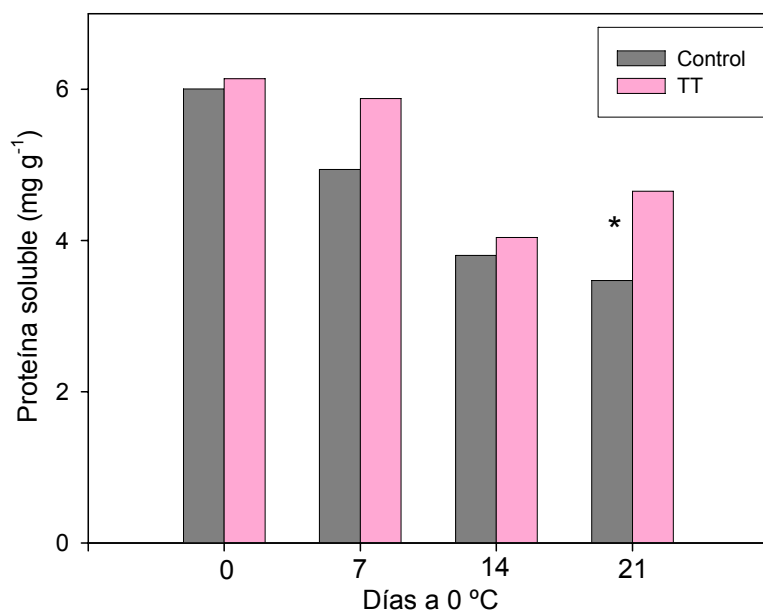


Figura II.6: Efecto del tratamiento térmico con aire caliente 48 °C / 3h (TT) sobre el contenido de proteína soluble en brócoli mínimamente procesado almacenado durante 21 días a 0 °C. El asterisco (\*) indica diferencias significativas. ( $LSD_{\text{proteína soluble}}=3,17$ )

Por otro lado, el contenido de proteínas totales en las muestras controles disminuyó luego de 21 días de almacenamiento a 0 °C, mientras que en los brócolis tratados térmicamente este valor se mantuvo constante durante todo el almacenamiento. Como consecuencia, luego de 21 días los brócolis tratados contenían un 25 % más de proteína total que los controles (Figura II.7). Una

inhibición similar de la proteólisis fue previamente observada en cabezas de brócoli intactas tratadas térmicamente y almacenadas a 20 °C (Costa y col, 2005).

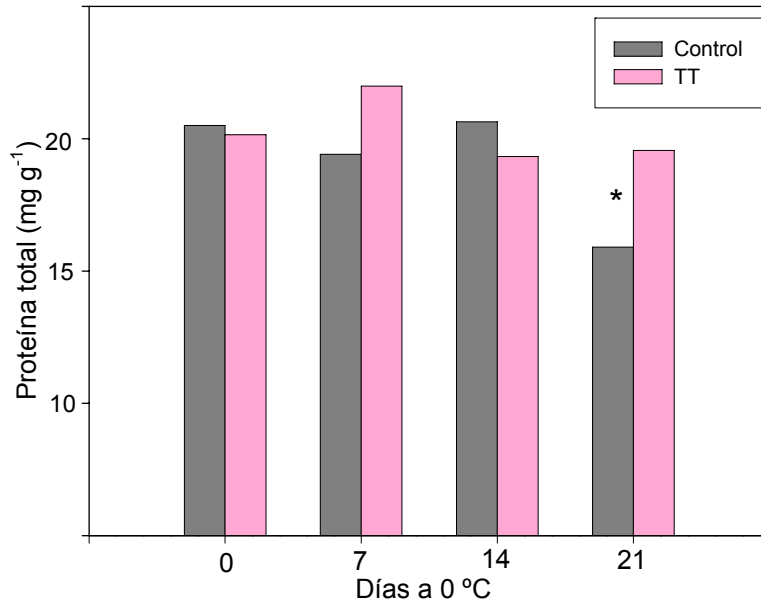


Figura II.7: Efecto del tratamiento térmico con aire caliente 48 °C / 3h (TT) sobre el contenido de proteína total en brócoli mínimamente procesado almacenado durante 21 días a 0 °C. El asterisco (\*) indica diferencias significativas. ( $LSD_{\text{proteína total}}=1,6$ )

### II.3.10 Contenido de azúcares

Generalmente, el contenido de azúcares disminuye durante la poscosecha de modo de mantener los niveles normales en la tasa respiratoria de los tejidos. En brócoli mínimamente procesado, el contenido de azúcares totales disminuyó durante el almacenamiento a 0 °C tanto en los controles como en las muestras tratadas (Figura II.8). Sin embargo la disminución fue más severa en los brócolis no tratados, en los que el nivel bajó un 49 % luego de 21 días de almacenamiento, en tanto que en los brócolis tratados térmicamente esta disminución fue menor, siendo el contenido de azúcares 2 veces mayor que en los controles a los 21 días de almacenamiento a 0 °C.

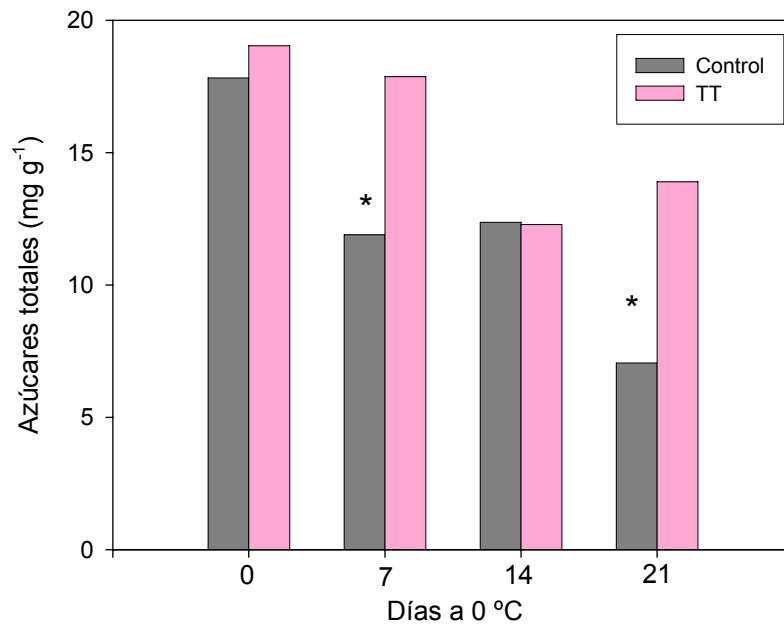


Figura II.8: Efecto del tratamiento térmico con aire caliente 48 °C / 3h (TT) sobre el contenido de azúcares totales en brócoli mínimamente procesado almacenado durante 21 días a 0 °C. El asterisco (\*) indica diferencias significativas. ( $LSD_{\text{azúcares totales}}=0,92$ )

Un resultado similar fue descrito en cabezas de brócoli intactas tratadas térmicamente, donde se detectó un retraso importante en el consumo de azúcares (Costa y col, 2005).

Ha sido demostrado que este tipo de tratamientos térmicos causa un estrés temporario que detiene el metabolismo normal de los tejidos, los cuales se recobran luego de un cierto tiempo (Martínez y Civello, 2008). Es probable que los altos niveles de azúcares totales en los brócolis tratados podría deberse a la menor actividad metabólica debida al estrés térmico.

#### **II.4 CONCLUSIONES**

La aplicación de un tratamiento térmico con aire caliente a 48 °C durante 3 h, en brócoli mínimamente procesado permite retrasar el amarilleamiento de las inflorescencias durante el almacenamiento refrigerado. Este tratamiento causa un retraso en la degradación de clorofilas y otros síntomas de senescencia tales como la pérdida de proteínas y azúcares y la integridad de membranas, indicada por una menor pérdida de electrolitos en las muestras sometidas al tratamiento térmico. A pesar que el tratamiento disminuye el contenido de fenoles y capacidad antioxidante al inicio del almacenamiento, estos parámetros se recuperan luego de 21 días.

### **CAPÍTULO III**

Selección y aplicación del tratamiento combinado de radiación UV-C y aire caliente. Análisis de su efecto sobre la calidad y senescencia de brócoli mínimamente procesado.

### **III.1.1 INTRODUCCIÓN**

Tal como se mencionó en capítulos anteriores, la aplicación de tratamientos de tipo físico, con el objetivo de mejorar la conservación postcosecha de productos vegetales mínimamente procesados, ha sido estudiada en diversas frutas y hortalizas. Así, por ejemplo, los tratamientos térmicos han sido empleados en productos tales como cebolla (Hong y col, 2000), apio (Viña y Chaves, 2006), puerro (Tsouvaltzis y col, 2005) y ajo (Cantwell y col, 2003). La radiación UV-C, a su vez, ha sido utilizada en productos tales como lechuga (Allende y Artés 2003) y granada (López-Rubira y col, 2005). Sin embargo, la combinación de ambos tratamientos no ha sido ampliamente utilizada a pesar de la relativa sencillez en la aplicación de ambas metodologías. Se ha descrito la combinación de ambos tratamientos en frutilla, observándose una prolongación de la vida postcosecha mayor que en la generada por cada tratamiento individual (Pan y col, 2004). En brócoli, particularmente, se demostró que cada uno de estos tratamientos puede extender la vida postcosecha de brócoli entero (Costa y col, 2005; Costa y col, 2006) o mínimamente procesado (capítulos I y II).



En el presente capítulo se describe el efecto del tratamiento combinado con radiación UV-C y un tratamiento térmico con aire caliente sobre la calidad y senescencia de brócoli mínimamente procesado.

Este capítulo comprende dos partes:

Parte 1:

A-Se analizará primeramente el efecto de dicha combinación sobre la calidad en muestras donde se fuerza la senescencia con alta temperatura (20 °C).

B-A esta temperatura se describe el efecto de la influencia del tratamiento sobre la capacidad antioxidante del tejido y la actividad de las enzimas relacionadas con este metabolismo.

Parte 2

-Finalmente, se describe el efecto del tratamiento combinado sobre la calidad y senescencia de las muestras almacenadas a 0 °C.

**PARTE I:**

**III.1 A) Selección y aplicación del tratamiento combinado. Efecto sobre la calidad y senescencia de muestras almacenadas a 20 °C.**

### **III.1.2 OBJETIVO**

Estudiar el efecto del tratamiento combinado con radiación UV-C y un tratamiento térmico con aire caliente sobre la calidad y senescencia, en muestras de brócoli mínimamente procesado donde se fuerza la senescencia con alta temperatura (20 °C).

### **III.1.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

#### **III.1.3.1 Selección de la combinación de radiación UV-C y tratamiento térmico con aire caliente**

Las temperaturas y las dosis de radiación UV-C ensayadas estuvieron basadas en las utilizadas en trabajos previos realizados en cabezas enteras de brócoli (Costa y col, 2005; Costa y col, 2006). De acuerdo a estos trabajos se emplearon entonces tratamientos térmicos de 3 h de duración a 42 °C; 45 °C y 48 °C y aplicaciones de radiación UV-C en dosis de 5; 8 y 10 kJ.m<sup>-2</sup>; en todas las combinaciones posibles. En un trabajo previo (Costa y col., 2005) se demostró que tratamientos con temperaturas mayores a 48 °C causaban un estrés muy severo provocando una situación de deterioro irreversible en los tejidos. Por tales razones, se utilizó como temperatura superior de ensayos el tratamiento con 48 °C.

Luego de aplicar las combinaciones de tratamientos mencionadas, los ramilletes de brócoli fueron almacenados a 20 °C para acelerar el proceso de senescencia, evaluándose el color superficial y la pérdida de calidad organoléptica a los 4 días.

Inmediatamente después de los tratamientos no se observaron síntomas visibles de deshidratación en ninguna de las muestras. Durante el almacenamiento a 20 °C, la pérdida de peso varió entre 1 y 1,5 % por día en todas las muestras. No se detectaron diferencias significativas en el porcentaje de pérdida de peso entre las muestras controles y tratadas con aire caliente a 48 °C, pero la pérdida de peso fue significativamente más alta en las muestras tratadas con aire caliente a 42 y 45 °C. No se observaron diferencias en el porcentaje de pérdida de peso entre las diferentes dosis de radiación UV-C 5, 8, y 10 kJ.m<sup>-2</sup> para cada uno de los tratamientos térmicos (datos no mostrados).

Respecto a los cambios detectados en el color superficial, se midieron valores iniciales del ángulo Hue de aproximadamente 126-128°, los cuales disminuyeron durante el almacenamiento. Los valores iniciales de L\* fueron aproximadamente 40,5 y aumentaron durante el almacenamiento a 20 °C (Tabla III.1).

**Tabla III.1** Cambios en los valores de Hue, luminosidad (L\*), y pérdida de calidad organoléptica (PCO) en brócoli mínimamente procesado controles y tratados con radiación UV-C/tratamiento térmico en el día 0 (inicial) y después de 4 días de almacenamiento a 20 °C. (LSD,P<0,05), (LSD<sub>L\*</sub>=1,74), (LSD<sub>Hue</sub>=3,58), (LSD<sub>PCO</sub>=0,97).

Tratamiento	HUE		L*		PCO	
	0 días	4 días	0 días	4 días	0 días	4 días
<b>Control</b>	127,63	105,31	40,66	55,93	0	3,85
<b>42°C-5 kJ.m<sup>-2</sup></b>	127,66	104,46	40,75	55,52	0	3,64
<b>42°C-8 kJ.m<sup>-2</sup></b>	126,98	108,46	40,67	54,51	0	2,94
<b>42°C-10 kJ.m<sup>-2</sup></b>	127,05	105,04	40,68	52,83	0	2,75
<b>45°C-5 kJ.m<sup>-2</sup></b>	126,97	106,45	40,58	54,17	0	2,68
<b>45°C-8 kJ.m<sup>-2</sup></b>	127	117,62	40,61	49,15	0	1,06
<b>45°C-10 kJ.m<sup>-2</sup></b>	127,09	120,22	40,64	47,12	0	1,43
<b>48°C-5 kJ.m<sup>-2</sup></b>	126,63	123,38	40,59	44,99	0	0,92
<b>48°C-8 kJ.m<sup>-2</sup></b>	<b>127,72</b>	<b>127,70</b>	<b>40,66</b>	<b>44,80</b>	<b>0</b>	<b>0,46</b>
<b>48°C-10 kJ.m<sup>-2</sup></b>	126,47	121,86	40,66	44,90	0	0,94

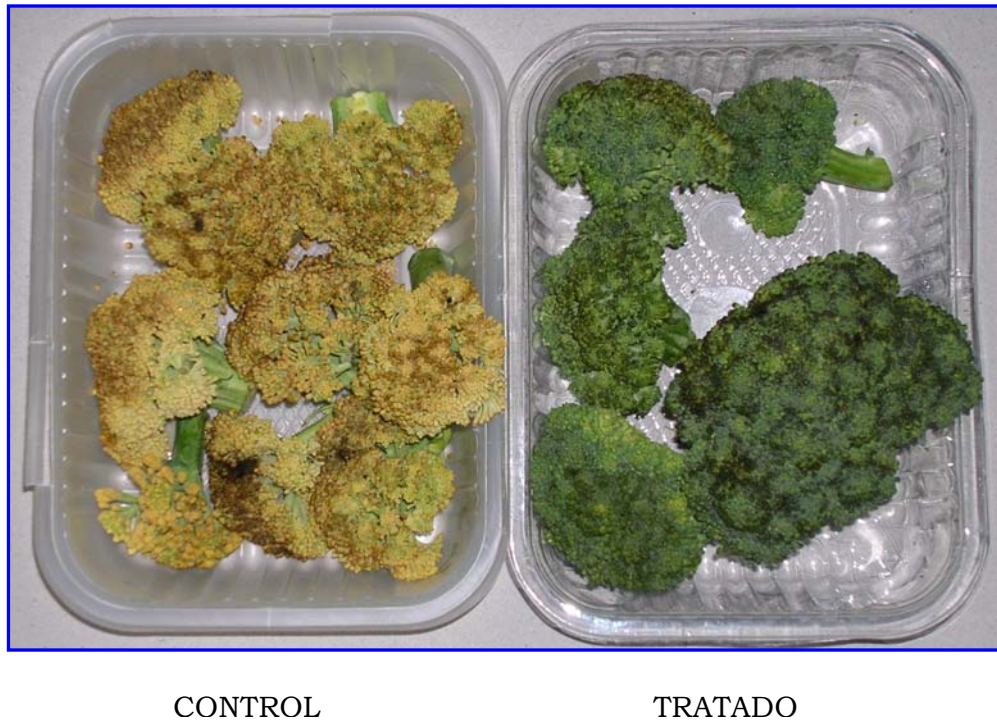
En las muestras tratadas a 42 °C se observaron los mismos valores de Hue y de L\* que las muestras controles después de 4 días de almacenamiento, independientemente de la dosis de UV-C utilizada, en cambio el tratamiento térmico con 45 °C condujo a diferentes resultados de acuerdo a la dosis de radiación UV-C empleada. Las muestras tratadas con 5 kJ.m<sup>-2</sup> no mostraron diferencias con las muestras controles, mientras que aquellas tratadas con dosis de 8 y 10 kJ.m<sup>-2</sup> presentaron valores más altos de Hue y menores de L\* en relación a las muestras controles. En el caso de muestras tratadas a 48 °C se detectó una importante retención en los valores de Hue y L\* con respecto a los controles después de 4 días de almacenamiento. Los brócolis tratados con la dosis de 8 kJ.m<sup>-2</sup> presentaron los valores más altos de Hue respecto a las muestras tratadas con dosis de 5 y 10 kJ.m<sup>-2</sup>. En el caso de L\*, no se detectaron diferencias entre las muestras tratadas con diferentes dosis de radiación UV-C a 48 °C.

La pérdida de calidad organoléptica (PCO), que se evalúa a través de un índice (ver Materiales y Métodos), aumenta durante el almacenamiento (Tabla III.1). El tratamiento a 42 °C con dosis de UV-C de 5 y 8 kJ.m<sup>-2</sup> no evitó la pérdida de calidad organoléptica. En cambio, a la misma temperatura de tratamiento y con una dosis de 10 kJ.m<sup>-2</sup> se logró disminuir esta pérdida. El tratamiento a 45 °C redujo también la pérdida de calidad organoléptica con las tres dosis de

UV-C ensayadas. Sin embargo, el mejor comportamiento fue observado con las dosis más altas. Finalmente, el tratamiento térmico con aire caliente a 48 °C mostró el mejor puntaje en la escala de calidad, observándose con esta temperatura la mejor retención de la calidad organoléptica, y la dosis de radiación de UV-C de 8 kJ.m<sup>-2</sup> fue visualmente la de mejor comportamiento (Tabla III.1). Teniendo en cuenta la pérdida de peso, los valores del Hue y L\* y la calidad organoléptica, la combinación de 8 kJ.m<sup>-2</sup>/48 °C 3h fue seleccionada para la realización de los posteriores ensayos.

De acuerdo a éstos resultados, puede generalizarse que el efecto del tratamiento térmico fue más marcado que el de la radiación UV-C. Por ejemplo a 42 °C no se observó ningún efecto sobre el desverdizado en ninguna dosis de UV-C utilizada aunque una leve mejora en la calidad se observó a 10 kJ.m<sup>-2</sup>. A medida que la temperatura del tratamiento térmico aumenta, los efectos sobre el desverdizado se vuelven más notorios. A 45 °C el efecto del tratamiento térmico puede ser mejorado con dosis de radiación UV-C de 8 y 10 kJ.m<sup>-2</sup>. Pero a una temperatura más alta como 48 °C la dosis de UV-C de 8 kJ.m<sup>-2</sup> logró mejores resultados que la dosis de 10 kJ.m<sup>-2</sup>. El tratamiento a 48°C está cercano al límite de temperatura que puede soportar el tejido, por eso, para obtener mayores beneficios, el tratamiento con radiación UV-C debe ser moderado (8 kJ.m<sup>-2</sup>). La dosis de 10 kJ.m<sup>-2</sup> causa un estrés adicional que no puede ser revertido por el tejido. Se consideró que la combinación de radiación UV-C (8kJ.m<sup>-2</sup>) y tratamiento térmico 48 °C / 3 h era la óptima y la misma fue utilizada en los ensayos posteriores. El aspecto de las muestras sometidas a este tratamiento luego de 4 días a 20 °C se muestra en la foto III.1

*Foto III.1: Efecto de la combinación de una dosis de radiación UV-C de 8 kJ.m<sup>-2</sup> con un tratamiento térmico con aire caliente de 48 °C 3 horas, luego de 4 días de almacenamiento.*



**III.1.3.2 Efecto de la combinación de una dosis de radiación UV-C de 8 kJ.m<sup>-2</sup> con un tratamiento térmico con aire caliente de 48 °C durante 3 horas**

Una vez seleccionada la combinación óptima de tratamientos, se aplicó la misma a brócoli mínimamente procesado y se evaluó su efecto sobre diversos parámetros de senescencia y calidad durante el almacenamiento a 20 °C

**III.1.3.3 Pérdida de calidad organoléptica**

Todos los parámetros utilizados para evaluar la pérdida de calidad organoléptica de brócoli mínimamente procesado (ver Materiales y Métodos) mostraron un incremento durante el almacenamiento a 20 °C. Entre estos

parámetros, el amarillamiento de los ramilletes es la principal causa de pérdida de calidad. Los brócolis controles mostraron una gran disminución de la calidad, que se reflejó con un puntaje elevado del índice, al día 2, alcanzando valores cercanos a 6 después de 4 días de almacenamiento a 20 °C. Por el contrario los brócolis tratados mostraron sólo una leve pérdida de calidad que se evidenció con un bajo índice (Figura III.1).

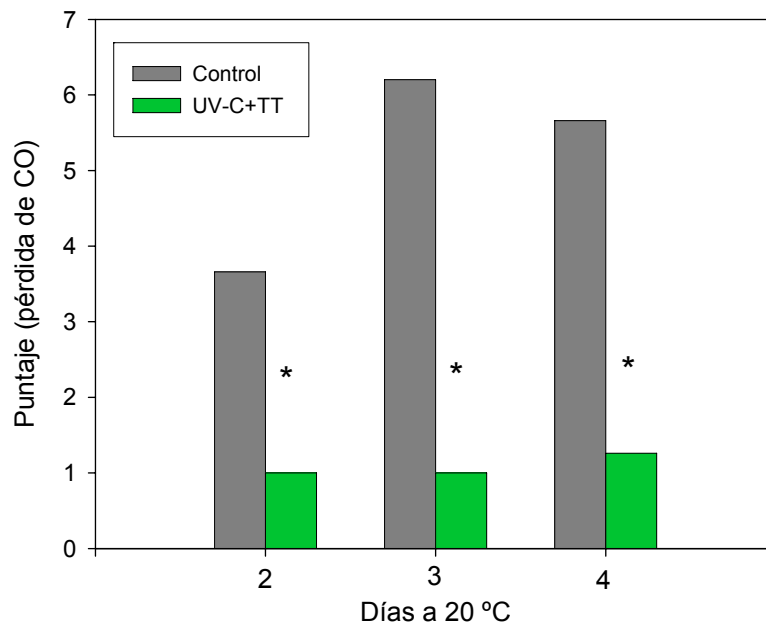


Figura III.1: Efecto del tratamiento combinado con radiación UV-C ( $8 \text{ kJ.m}^{-2}$ ) y aire caliente  $48 \text{ °C}/3 \text{ h}$ , sobre la pérdida de calidad organoléptica de brócoli mínimamente procesado almacenado a  $20 \text{ °C}$ . El asterisco (\*) indica diferencias significativas. (LSD =2,28).

#### III.1.3.4 Color superficial

Inmediatamente después del tratamiento combinado no se observaron diferencias en los valores de Hue entre los ramilletes controles y los tratados. En el transcurso del almacenamiento las muestras controles mostraron un importante disminución en el valor de Hue mientras que las muestras tratadas casi no mostraron cambios en este parámetro con respecto al valor inicial. En consecuencia las muestras tratadas presentaron diferencias significativas con los controles en los valores de Hue después de 2, 3 y 4 días de almacenamiento a  $20 \text{ °C}$  (Figura III.2).



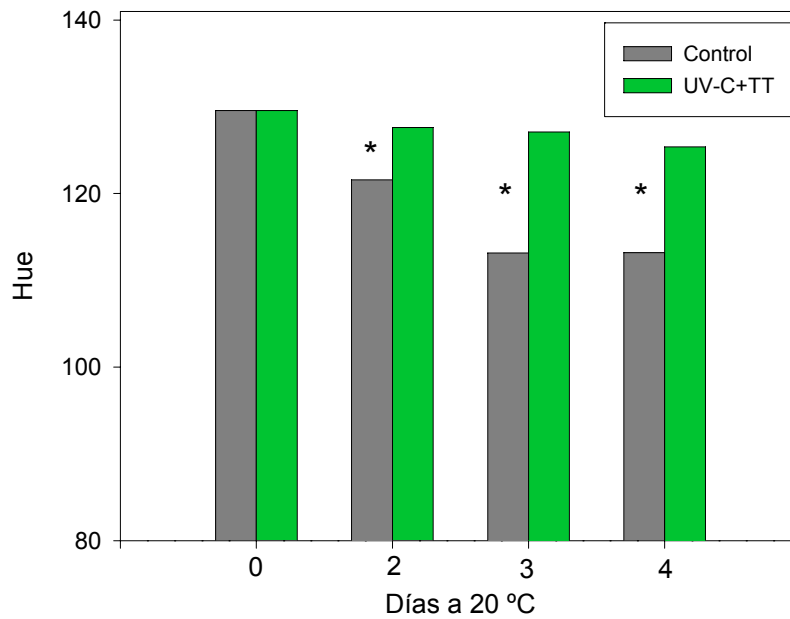


Figura III.2: Efecto del tratamiento combinado con radiación UV-C ( $8 \text{ kJ.m}^{-2}$ ) y aire caliente  $48 \text{ °C}/3 \text{ h}$ , sobre el valor del ángulo Hue en brócoli mínimamente procesado almacenado a  $20 \text{ °C}$ . El asterisco (\*) indica diferencias significativas. ( $\text{LSD}_{\text{Hue}}=1,73$ ).

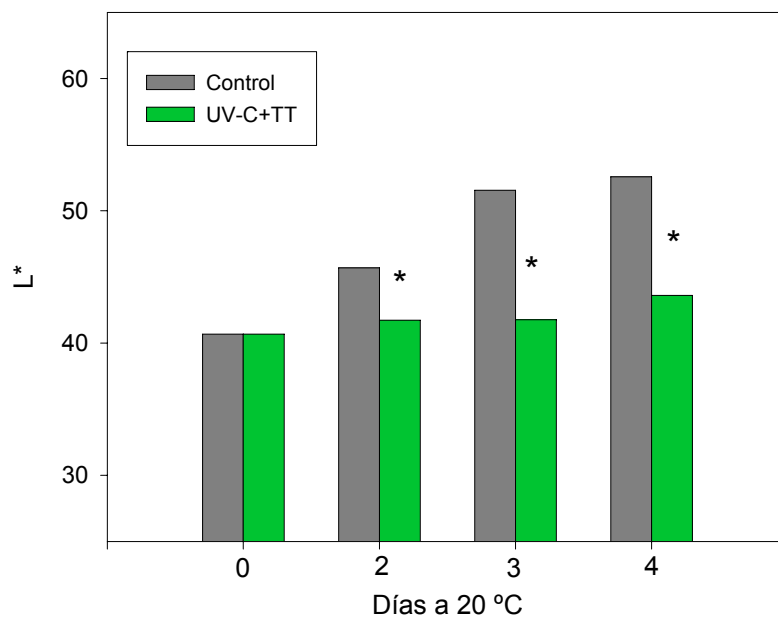


Figura III.3: Efecto del tratamiento combinado con radiación UV-C ( $8 \text{ kJ.m}^{-2}$ ) y aire caliente  $48 \text{ °C}/3 \text{ h}$ , sobre la luminosidad ( $L^*$ ) en brócoli mínimamente procesado almacenado a  $20 \text{ °C}$ . El asterisco (\*) indica diferencias significativas. ( $\text{LSD}_{L^*}=1,47$ ).

Los valores de luminosidad ( $L^*$ ) aumentaron significativamente durante el almacenamiento en las muestras controles, mientras que en las muestras tratadas sólo lo hicieron levemente. Estas diferencias de comportamiento son

significativas entre los brócoli tratados y controles después de 2, 3 y 4 días de almacenamiento (Figura III.3).

### III.1.3.5 Contenido de clorofila

El contenido de clorofilas disminuyó en las muestras controles y tratadas durante el almacenamiento (Figura III.4). Sin embargo la tasa de degradación de clorofila fue más lenta en las muestras tratadas con el tratamiento combinado que en las controles. Luego de 4 días de almacenamiento a 20 °C las muestras tratadas conservaron el 60 % del contenido de clorofila inicial mientras que las muestras controles sólo presentaron un 38 % del valor de clorofila inicial.

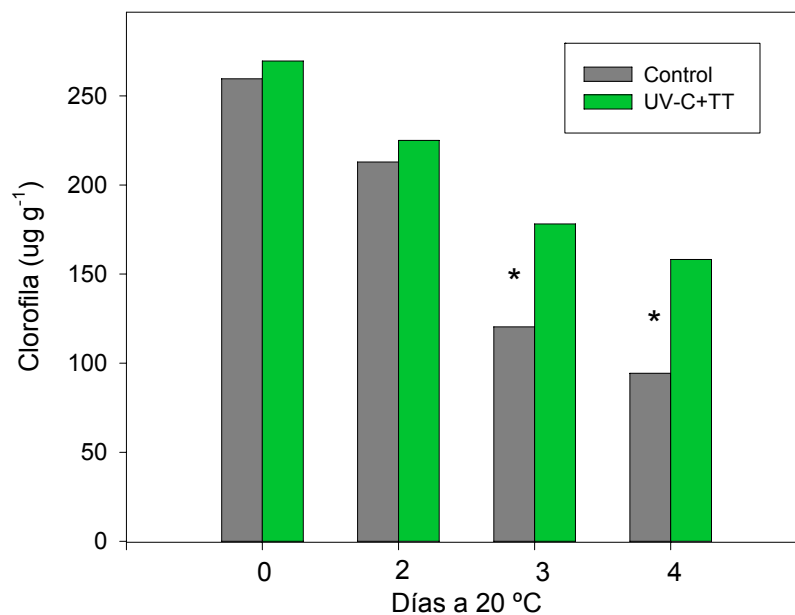


Figura III.4: Efecto del tratamiento combinado con radiación UV-C (8 kJ.m<sup>-2</sup>) y aire caliente 48 °C/3 h, sobre el contenido de clorofila en brócoli mínimamente procesado almacenado a 20 °C. El asterisco (\*) indica diferencias significativas. (LSD<sub>clorofila</sub>=23,47).

El principal síntoma de senescencia en brócoli es el amarilleamiento causado por el catabolismo de la clorofila (Tian y col, 1994). Funamoto y col, (2002) y Costa y col. (2005) encontraron que el tratamiento térmico puede retrasar este proceso y reducir la pérdida de color superficial. La aplicación de tratamientos térmicos postcosecha en frutas y hortalizas puede causar una temporaria y reversible inhibición de la maduración o senescencia, los tratamientos con

radiación UV-C también afectan el catabolismo de la clorofila y retrasan su degradación (Costa y col, 2006). Estos tratamientos, ya sea el tratamiento térmico o la radiación UV-C, aplicados separadamente reducen el amarilleamiento del brócoli, pero no lo inhiben completamente durante el almacenamiento (capítulo I y II). En este sentido el tratamiento combinado provoca casi un completo mantenimiento del color superficial (Figura III.2 y Figura III.3) indicando un efecto aditivo de ambos tratamientos. El tratamiento combinado también causa un retraso en la degradación de clorofila. Durante la senescencia postcosecha de brócoli, se observó un aumento en las actividades de ciertas enzimas involucradas en el catabolismo de clorofila tales como clorofilasa y Mg dequelatasa (Costa y col, 2005). El aumento en las actividades de estas enzimas puede ser retrasado por el tratamiento térmico (Funamoto y col, 2002; Costa y col, 2005) o la radiación UV-C (Costa y col, 2006).

### III.1.3.6 Contenido de proteína total

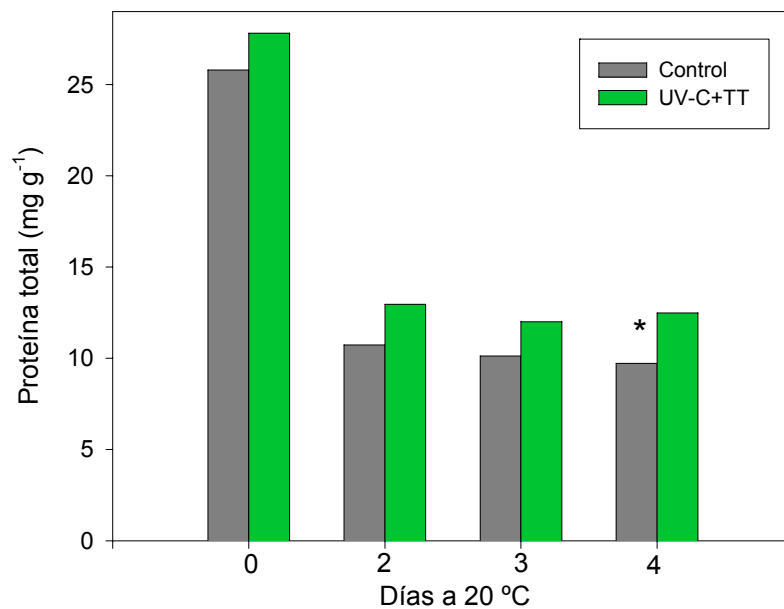


Figura III.5: Efecto del tratamiento combinado con radiación UV-C (8 kJ.m<sup>-2</sup>) y aire caliente 48 °C/3 h, sobre el contenido de proteína en brócoli mínimamente procesado almacenado a 20 °C. El asterisco (\*) indica diferencias significativas. (LSD<sub>proteína total</sub>=2,44).

Inmediatamente después del tratamiento combinado no hubo diferencias en el contenido de proteínas totales. El contenido de proteína total disminuyó marcadamente tanto en las muestras tratadas como en las controles después de 2 días de almacenamiento a 20 °C (Figura III.5). En los días 2 y 3 de almacenamiento no se encontraron diferencias significativas entre las muestras controles y tratadas pero en el día 4 las muestras tratadas retuvieron un 20 % más de proteínas totales que las muestras controles.

### III.1.3.7 Contenido de proteína soluble

El contenido de proteínas solubles disminuyó durante el período a 20 °C, tanto en las muestras control como tratadas. No se encontraron diferencias en el contenido de proteínas solubles entre los ramilletes tratados y los controles apenas terminado el tratamiento (Figura III.6) y tampoco hubo diferencias significativas a lo largo del almacenamiento a 20 °C.

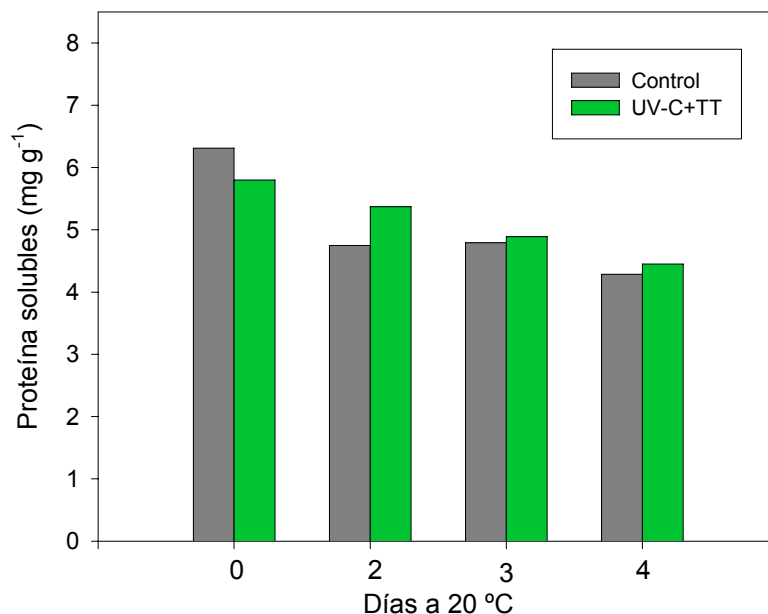


Figura III.6: Efecto del tratamiento combinado con radiación UV-C (8 kJ.m<sup>-2</sup>) y aire caliente 48 °C/3 h, sobre el contenido de proteína soluble en brócoli mínimamente procesado almacenado a 20 °C. El asterisco (\*) indica diferencias significativas. (LSD<sub>proteína soluble</sub>=1,04).

Diversos trabajos han demostrado la degradación de proteínas durante la senescencia postcosecha de brócoli (Pogson y Morris, 1997; Page y col, 2001), lo que conduce a una reducción en el contenido de las mismas. Como ya se

mencionó previamente, en estadios avanzados de la senescencia la pérdida de integridad y funcionalidad de las membranas puede conducir a la solubilización de proteínas ligadas a las mismas (Dangl y col, 2000), las cuales son posteriormente degradadas. Costa y col. (2005) encontraron que un tratamiento térmico causa un retraso en la proteólisis, sin embargo el tratamiento con radiación UV-C no afectó la degradación de proteínas en brócoli mínimamente procesado almacenado a 4 °C (capítulo 1). Entonces el mayor contenido de proteínas totales en las inflorescencias tratadas podría deberse al tratamiento térmico más que al efecto de la radiación UV-C.

### III.1.3.8 Actividad respiratoria

Inmediatamente después del tratamiento combinado la actividad respiratoria aumentó significativamente en las muestras tratadas. Luego la actividad respiratoria permaneció constante hasta el final del almacenamiento. Las muestras controles no presentaron cambios en la actividad respiratoria durante el almacenamiento hasta el día 4, donde la actividad respiratoria fue significativamente superior a la de las muestras tratadas (Figura III.7).

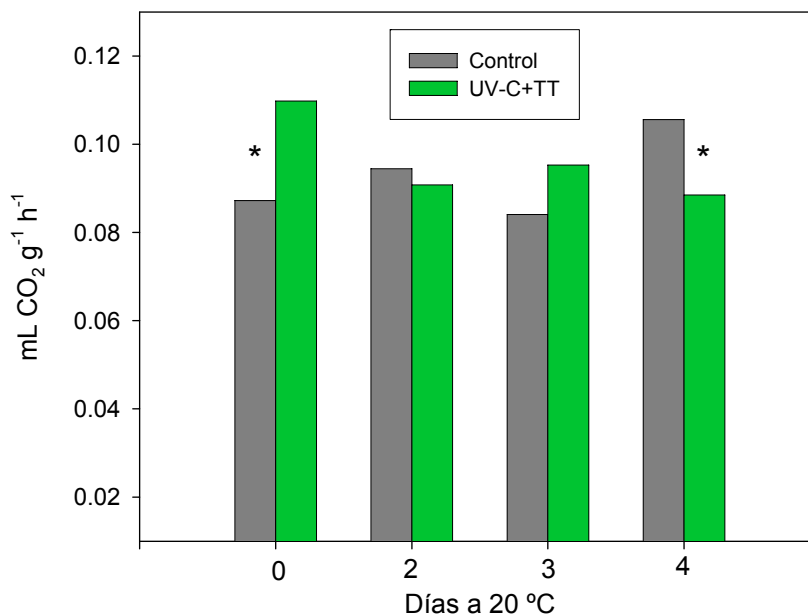


Figura III.7: Efecto del tratamiento combinado con radiación UV-C (8 kJ.m<sup>-2</sup>) y aire caliente 48 °C/3 h, sobre la velocidad de respiración en brócoli mínimamente procesado almacenado a 20 °C. El asterisco (\*) indica diferencias significativas. (LSD<sub>velocidad de respiración</sub>=0,02).

Las muestras tratadas térmicamente o con UV-C por separado mostraron un aumento de la producción de CO<sub>2</sub> inmediatamente después del tratamiento, aunque el mismo no fue significativo (Capítulos I y II). Probablemente, la combinación de ambos tratamientos causó un estrés momentáneo más severo que indujo la actividad respiratoria. Posteriormente, el tratamiento combinado probablemente previno el deterioro tisular manteniendo la actividad respiratoria en menores valores que los controles.

### III.1.3.9 Contenido de azúcares totales

Durante el almacenamiento a 20 °C, los azúcares disminuyeron tanto en las muestras controles como en las tratadas (Figura III.8). Hacia el final del almacenamiento, el descenso en éstas últimas fue menor y las muestras tratadas con la combinación UV-C y aire caliente presentaron un 35 % más de azúcares totales que los correspondientes controles.

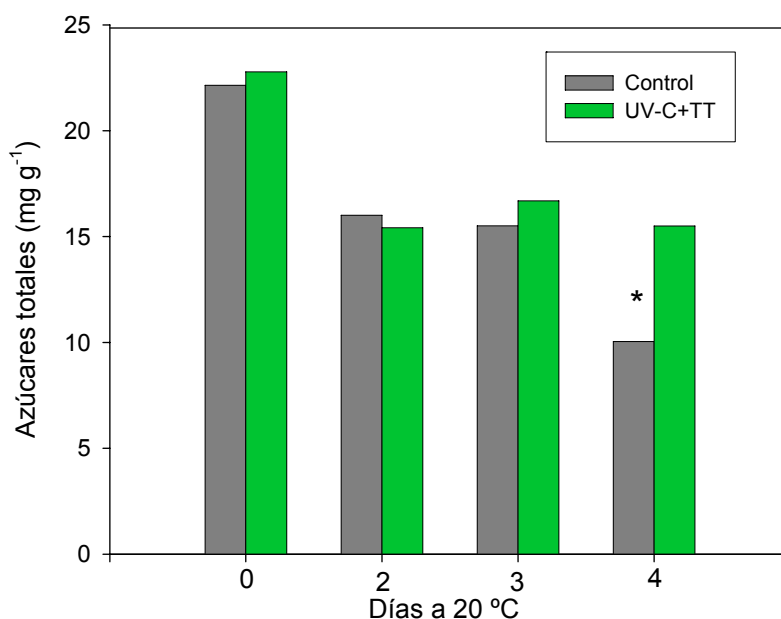


Figura III.8: Efecto del tratamiento combinado con radiación UV-C (8 kJ.m<sup>-2</sup>) y aire caliente 48 °C/3 h, sobre el contenido de azúcares totales en brócoli mínimamente procesado almacenado a 20 °C. El asterisco (\*) indica diferencias significativas. (LSD<sub>azúcares totales</sub>=1,05).

Este comportamiento podría deberse a la mayor tasa respiratoria de las muestras controles en el día 4 de almacenamiento, mientras que las muestras tratadas al respirar menos mantuvieron un mayor nivel de azúcares totales.

Durante la senescencia postcosecha de brócoli se produce un descenso en los niveles de azúcares dado que la cosecha interrumpe el suministro de azúcares a la inflorescencia, los cuales son necesarios para mantener la tasa respiratoria. En trabajos previos, tratamientos térmicos efectuados sobre cabeza entera de brócoli, indujeron un leve retraso en el consumo de azúcares (Costa y col, 2005). El tratamiento con radiación UV-C sobre brócoli mínimamente procesado no afectó la tasa de disminución de azúcares totales (capítulo 1). El procesamiento de las inflorescencias introduce un estrés adicional a los tejidos lo cual genera una tasa de respiración más intensa, como lo muestran los resultados para actividad respiratoria obtenidos, y por lo tanto provoca un mayor consumo de azúcares. El tratamiento térmico también redujo la pérdida de azúcares en cabezas de brócoli intactas (Costa y col, 2005), por lo tanto el efecto del tratamiento combinado sobre el contenido de azúcares totales en brócoli mínimamente procesado podría deberse mayormente al efecto del tratamiento térmico.

#### **III.1.4 CONCLUSIONES**

- De todas las combinaciones ensayadas, el tratamiento UV-C 8 kJ.m<sup>-2</sup> más aire caliente a 48 °C durante 3 horas provoca la mejor retención de calidad y color superficial por lo que fue seleccionado para la realización de los ensayos.
- El tratamiento combinado contribuyó a una mejor conservación de la calidad organoléptica de brócoli mínimamente procesado durante el almacenamiento a 20 °C. Se mantuvo el color verde de los tejidos por más tiempo y se detectó un retraso en la degradación de clorofila.
- El tratamiento combinado conservó el contenido de proteína y de azúcares totales.
- El tratamiento combinado de radiación UV-C 8 kJ.m<sup>-2</sup> con el tratamiento térmico con aire caliente de 48 °C durante 3 horas podría ser un método exitoso para prolongar la vida postcosecha de brócoli mínimamente procesado.



## **PARTE I**

**III.2 B) Efecto de la aplicación del tratamiento combinado sobre la capacidad antioxidante y actividad de enzimas relacionadas en muestras almacenadas a 20 °C.**

### III.2.1 INTRODUCCIÓN

#### Radicales libres

Un radical libre (RL) es cualquier especie química que posee uno o más electrones desapareados. Esta configuración es muy inestable y le confiere a las sustancias que la poseen la propiedad de ser altamente reactivas y de corta vida. Dado que la sustancia posee un electrón desapareado, puede entonces reaccionar con cualquier molécula, quitándole un electrón para estabilizarse y convirtiendo a esa molécula en un nuevo radical libre, generando de esta manera una reacción en cadena. Un RL genera otro RL y sólo cuando se encuentran dos RL o con compuestos que secuestran esos radicales la reacción en cadena se detiene. En algunos casos, una molécula de gran tamaño puede estabilizar un radical libre a través de la formación de numerosas estructuras resonantes.

#### Especies reactivas del oxígeno

Las especies reactivas del oxígeno (EROs) son formas parcialmente reducidas del oxígeno atmosférico ( $O_2$ ). Estas especies resultan de la excitación del  $O_2$  para formar oxígeno singulete ( $O_2^1$ ) o de la transferencia de uno, dos o tres electrones al  $O_2$  para formar el radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) o el radical hidroxilo ( $HO\cdot$ ). Las EROs son capaces de oxidar sin restricción a varios componentes celulares y conducir a la destrucción oxidativa de la célula (Mittler, 2002).

En las plantas, muchas reacciones pueden conducir a la producción de EROs en los diferentes compartimentos celulares. Algunas de estas reacciones están involucradas en el metabolismo normal, tal como la fotosíntesis y la respiración, por lo que las EROs son productos inevitables del metabolismo aeróbico. En muchos otros casos, las EROs son generadas a partir de reacciones en el marco de un metabolismo desbalanceado tales como diversas situaciones de estrés. A pesar de la alta reactividad y posibilidad de generar daño celular, también se ha observado que las EROs pueden actuar como moléculas señales para la activación de la expresión de genes en respuesta a patógenos, a varios tipos de estrés abióticos, como el daño mecánico o la luz,

como así también en la señalización de la muerte celular programada (Zimmermann y Zentgraf, 2005).

### Estrés oxidativo

En condiciones metabólicas normales, existe un balance entre los eventos oxidativos (producción de EROs) y los sistemas de defensa (antioxidantes y/o atrapadores de radicales libres) manteniendo la homeostasis celular. Cuando este balance no se mantiene, ya sea por una pérdida o disminución del sistema protector o por el aumento en la producción de EROs, o por ambos eventos simultáneamente, se dice que el tejido está en un estado de estrés oxidativo. Un estrés oxidativo permanente y continuo puede conducir a severas disfunciones metabólicas (Figura III.a).

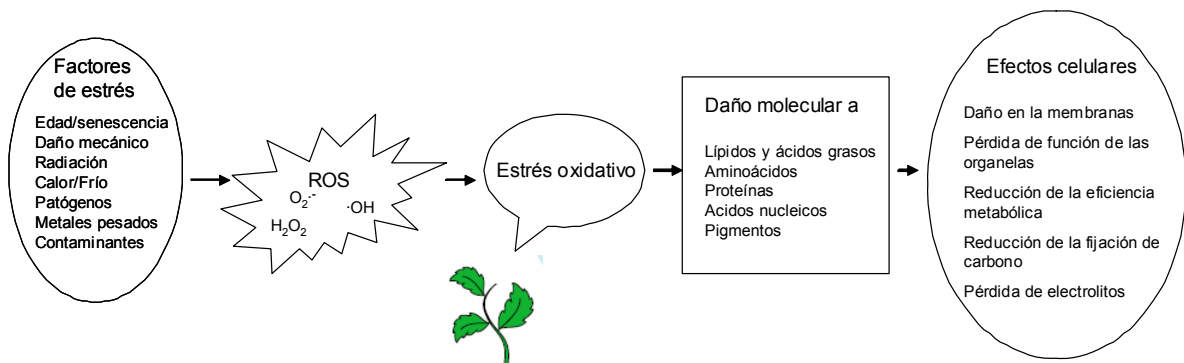


Figura III.a: Algunos de los factores de estrés que pueden producir EROs y sus consecuencias biológicas. Tomado de (Scandalios, 2002)

Debido a esto, los organismos han desarrollado diferentes sistemas para eliminar estos radicales libres que involucran un sistema de enzimas antioxidantes y un sistema antioxidante no enzimático que incluye la vitamina C, vitamina E, carotenoides, flavonoides, etc.(Zimmermann y Zentgraf, 2005).

### Antioxidantes no enzimáticos

Los antioxidantes no enzimáticos son aquellos compuestos que donan sus electrones a los radicales libres, neutralizándolos y evitando reacciones en cadena. Sin embargo, estos antioxidantes no se convierten en radicales libres

debido a la gran movilidad de sus otros electrones o simplemente son radicales libres no reactivos. Entre ellos encontramos: compuestos fenólicos, ácido ascórbico carotenoides, etc.

### Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos son aquellos productos biosintetizados en las plantas que poseen la característica biológica de ser productos secundarios de su metabolismo, y la característica química de contener al menos un grupo fenol (un anillo aromático unido a, al menos, un grupo funcional hidroxilo) en su estructura molecular. Son un grupo heterogéneo de productos con más de 10.000 compuestos (Taiz y Zeiger, 2006). Se sintetizan por muchas vías distintas, y por lo tanto también son un grupo heterogéneo desde el punto de vista metabólico, aunque dos vías básicas están involucradas: la vía del ácido siquímico y la vía del ácido malónico.

- La vía del ácido siquímico participa en la biosíntesis de la mayoría de los fenoles de las plantas superiores. Utiliza como sustratos la eritrosa-4-fosfato (de la vía de las pentosas fosfato) y el ácido fosfoenolpirúvico (proveniente de la glucólisis). Uno de los productos de esta vía es la fenilalanina, de la que se deriva la mayoría de los fenoles. La fenilalanina, parte del metabolismo primario de las plantas, entra al metabolismo secundario cuando la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL) cataliza la eliminación de un amonio convirtiéndola en ácido cinámico.
- La vía del ácido malónico es una importante fuente de fenoles en bacterias y hongos, y en las plantas superiores existe aunque no es tan utilizada como en aquéllos. Su sustrato es el acetil-CoA. Junto con la vía del ácido siquímico participa en la biosíntesis de los flavonoides, la lignina y otros fenoles.

### Acido ascórbico (ASA)

El ácido ascórbico es la más abundante molécula antioxidante en las plantas, particularmente en hojas. Es sintetizado en las mitocondrias y transportado a

todos los compartimientos celulares, inclusive al apoplasto, alcanzando concentraciones de más de 20 mM en cloroplastos. En plantas, su ruta de biosíntesis se iniciaría vía L-galactosa, y su precursor inmediato sería la L-galactono-1,4-lactona (Smirnov y Wheeler, 2000).

El contenido de ácido ascórbico varía considerablemente entre cultivares, madurez y condiciones de crecimiento, tales como fertilización del suelo, irrigación, intensidad de luz y temperatura (Davey y col, 2000).

El ácido ascórbico es hidrosoluble y termolábil y se oxida en el aire con facilidad. Para evitar esta pérdida se recomienda el consumo de frutas y verduras frescas. El contenido de ácido ascórbico es utilizado como índice de calidad en los vegetales, ya que comparándolos con otros compuestos benéficos, es el más sensible a la degradación por procesamiento y almacenamiento (Odrizola -Serrano y col, 2007).

La mayoría de las reacciones metabólicas del ácido ascórbico se deben a su fuerte potencial reductor. Su actividad antioxidante deriva del desplazamiento de ácido L-ascórbico a su forma oxidada L-dehidroascórbico (Figura: III.b).

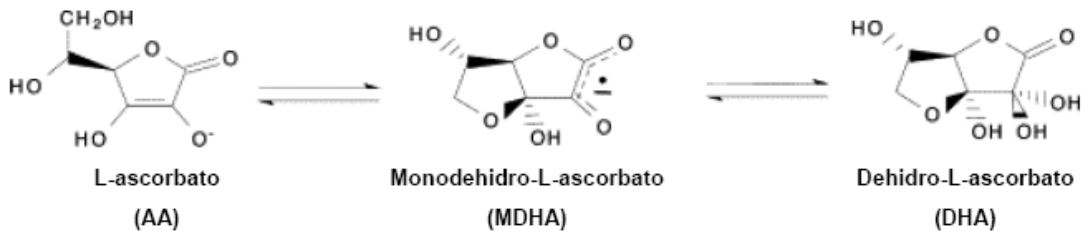


Figura III.b: Diferentes estados redox del ascorbato. Tomado de (Potters y col, 2002)

El ácido ascórbico dona electrones a las EROs a partir del ascorbato, formando primero monodehidroascorbato y luego dehidroascorbato. Las EROs son reducidas, mientras que las formas oxidadas del ascorbato son relativamente estables y no reactivas, por lo que no causan daño celular.

Además de su actividad antioxidante, el ácido ascórbico actúa como cofactor de un gran número de enzimas implicadas en diversas rutas metabólicas clave y participa en la regulación de diversos procesos celulares como la fotoprotección (ciclo de las xantófilas) y la regulación de la fotosíntesis, la expansión celular y el ciclo celular (Smirnov y Wheeler, 2000).

### Acido dehidroascórbico (ADA)

La forma oxidada del ácido ascórbico se conoce como ácido dehidroascórbico (ADA o DHA), (Figura III.B.a). La vitamina C es la suma del contenido de ácido ascórbico (ASA) más el contenido ácido dehidroascórbico (ADA).

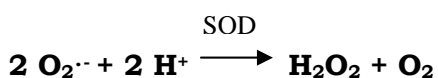
La concentración de ácido dehidroascórbico (ADA) en los alimentos es, generalmente, más baja que la del ácido ascórbico (ASA) y depende de las velocidades de oxidación del ascorbato y de la hidrólisis de ADA a ácido 2,3-dicetogulónico (Fennema, 2000). En la mayoría de especies vegetales el ADA presenta un contenido menor al 10 % de la vitamina C total, pero esta concentración tiende a incrementarse durante el almacenamiento (Wills y col, 1984).

### Enzimas antioxidantes

Dados los diferentes tipos de EROs y su ubicación en la célula, diferentes enzimas son requeridas para su eliminación. La enzima superóxido dismutasa (SOD) convierte al radical superóxido en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> el cual a su vez también debe ser eliminado. Dos enzimas son las encargadas de eliminar el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, la catalasa (CAT) y la ascorbato peroxidasa (APX), ambas remueven el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pero catalizan la reacción en forma diferente y se ubican en compartimentos celulares distintos. La catalasa se encuentra principalmente en peroxisomas y la APX se encuentra en cloroplastos, citosol y apoplasto, lo que indicaría que no se solaparían en sus funciones (Mach y Greenberg, 2004).

### Superóxido dismutasa SOD

Las enzimas superóxido dismutasas (SOD) son metaloenzimas que se encuentran ampliamente distribuidas en todos los organismos aeróbicos, ellas catalizan la dismutación de los radicales superóxido (O<sub>2</sub><sup>·-</sup>) a oxígeno molecular y peróxido de hidrógeno.



Las superóxido dismutasas pueden ser agrupadas en tres clases:

*SOD dependientes del Cu<sup>2+</sup> Zn<sup>2+</sup>*: Con Cu<sup>2+</sup> y Zn<sup>2+</sup> formando parte de su estructura, se localizan en el citosol, cloroplastos y mitocondrias.

*SOD dependientes del Mn<sup>2+</sup>*: Esta clase utiliza Mn como cofactor. Se encuentran en procariotes y mitocondrias de eucariotes.

*SOD dependientes del Fe<sup>3+</sup>*: Estas enzimas se encuentran en procariotes y cloroplastos de algunas plantas.

Dentro de la célula la SOD constituye la primera línea de defensa contra las EROs (Alscher, 2002) y cataliza la eliminación del radical O<sub>2</sub><sup>·-</sup> de los compartimentos donde es producido. Este paso es crucial ya que los fosfolípidos de membrana son impermeables al O<sub>2</sub><sup>·-</sup>, pero sí permiten el paso de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Zimmermann y Zentgraf, 2005).

Ascorbato peroxidasa APX

La acumulación de especies reactivas del oxígeno es parcialmente controlada por el ciclo del ascorbato-glutación o Halliwell-Asada, donde la actividad APX juega un rol importante (Asada, 1994). De este ciclo forman parte cuatro enzimas, siendo la más abundante la ascorbato peroxidasa (APX), que requiere ascorbato para reducir el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a H<sub>2</sub>O generando además monodehidroascorbato (MDHA). El MDHA puede ser reducido nuevamente a ascorbato por la monodeshidroascorbato reductasa (MR), que requiere NADH, o bien puede desproporcionarse a ascorbato y dehidroscórbico (DHA o ADA). A continuación, la deshidroascorbato reductasa (DR) regenera el ascorbato a partir de DHA utilizando glutatión reducido (GSH) como reductor. El ciclo se completa con la reducción del glutatión oxidado (GSSG) a GSH mediante la actividad glutatión reductasa (GR) utilizando NADPH (Figura III.c).

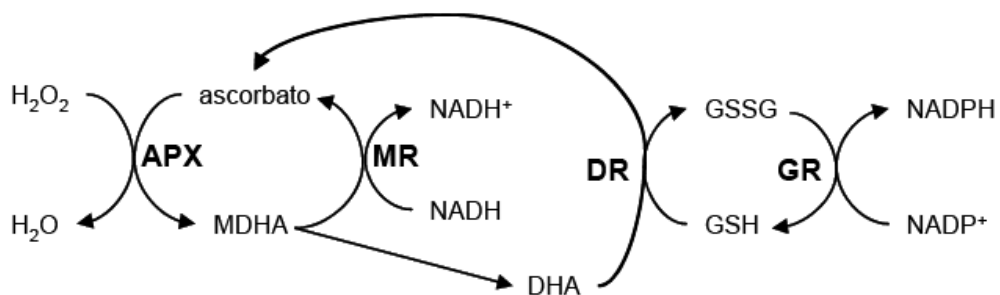


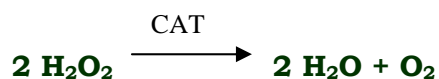
Figura III.c: Ciclo de ascorbato-glutación o Halliwell-Asada

La APX es la enzima más importante para eliminar el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> producida en el cloroplasto. En Arabidopsis ocho tipos de genes de APX han sido descritos, estos genes regulan diferentes respuestas a estrés y procesos de desarrollo.

Estudios previos revelan que hay un aumento de la expresión de genes de la APX citosólica frente a un estrés biótico o abiótico, la APX1 tiene elevados niveles de expresión en ausencia de estrés, pero ante éste, su expresión aumenta significativamente (Mittler, 2002), por otra parte la APX2 no se expresa en ausencia de estrés, pero su expresión es sustancialmente incrementada en respuesta a un estrés abiótico como el shock térmico (Panchuk y col, 2002). La APX tiene alta afinidad por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y es capaz de detoxificar bajas concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Zimmermann y Zentgraf, 2005).

### Catalasa CAT

La enzima CAT cataliza la conversión de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como aceptor y donador de moléculas de hidrógeno simultáneamente.



La proteína es un tetrámero formado por cuatro subunidades idénticas. Cada monómero contiene un grupo prostético hemo en el centro activo. En algunas especies también hay una molécula de NADP por subunidad cuya función es proteger a la enzima de la oxidación por su sustrato, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La CAT tiene alta tasa de reacción pero baja afinidad por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Zimmermann y Zentgraf, 2005).

Las plantas contienen diferentes isoformas de CAT con diferentes funciones. Todas las catalasas están localizadas en los peroxisomas, donde el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es principalmente generado por fotorespiración y oxidación de ácidos grasos. El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> también puede difundir a los peroxisomas desde otros sitios de síntesis de EROs.

Las catalasas pueden ser agrupadas en tres clases:

*Clase I:* esta clase de catalasas se caracteriza por tener una expresión altamente dependiente de la luz. Es muy abundante en células activamente fotosintéticas y por eso estaría involucrada en la eliminación del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generado durante la fotorespiración.



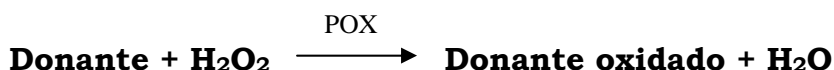
*Clase II:* estas catalasas se encuentran en plantas maduras, con una fuerte expresión en el tejido vascular del pecíolo y el mesófilo de las hojas. Su expresión es independiente de la luz y podrían jugar un rol en la lignificación o en la respuesta a estrés, aunque la función precisa es todavía desconocida.

*Clase III:* estas enzimas se expresan en semillas y plantines y a veces en estadios tardíos de la senescencia, su función es remover el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> producido durante la degradación de ácidos grasos en el glioxisoma (Zimmermann y Zentgraf, 2005).

### Peroxidasa POX

Estas enzimas son oxidoreductasas que catalizan la reacción en la que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> actúa como aceptor y otro compuesto (fenoles o aminas aromáticas) actúa como donador de átomos de hidrógeno.

POX tiene alta especificidad por el peróxido como sustrato, pero baja especificidad hacia el sustrato donador de hidrógeno



La peroxidasa puede ser inactivada por el calor, siendo una de las que necesita mayor temperatura y más tiempo para su inactivación. Además, posee la propiedad de la *regeneración enzimática*. Este fenómeno consiste en que al inactivarla por medio del calor recupera parcialmente su actividad después de un cierto tiempo. La inactivación de esta enzima por el calor es una característica que se utiliza como una forma de control cuando se aplican tratamientos térmicos en el procesado de ciertos alimentos para asegurar que luego de aplicado correctamente el tratamiento no se produzcan pérdidas de calidad asociados a la acción de esta enzima sobre sustratos presentes en el alimento.

Thongsook y Barret (2005) reportan que POX se puede hallar de dos formas, una soluble (libre) y una ligada a membranas. Se encuentra en vacuolas, tonoplasto, plasmalema y en la pared celular (interna y externamente) cumpliendo una amplia variedad de funciones.

Esta enzima es muy ubicua en plantas, y cataliza gran diversidad de reacciones. Cuando la planta se halla sometida a algún tipo de estrés tanto biótico como abiótico, la actividad de esta enzima se ve aumentada (Jang y col, 2004).

Desde el punto de vista de la calidad e alimentos vegetales, POX puede estar involucrada en una diversidad de procesos como el pardeamiento enzimático, utilizando compuestos fenólicos como sustrato (Chisari, 2007); lo cual puede estar asociado a la pérdida de color, aroma y valor nutricional de productos frescos y procesados (Thongsook y Barrett, 2005).

### **III.2.2 OBJETIVO**

Analizar el efecto de la influencia del tratamiento combinado sobre la capacidad antioxidante y la actividad de las enzimas relacionadas con este metabolismo, en brócoli mínimamente procesado almacenado a 20 °C.

### III.2.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### III.2.3.1 Efecto del tratamiento combinado sobre el contenido de compuestos antioxidantes

##### III.2.3.1.1 Contenido de compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos son elementos constituyentes de todas las plantas superiores. En general, cuando las plantas son expuestas a diferentes tipos de estrés biótico o abiótico tales como ataques de patógenos, estrés oxidativo, radiaciones de alta energía, ozono, bajas o altas temperaturas; la síntesis de metabolitos fenólicos con propiedades antioxidantes es inducida (Grace, 2005). En este trabajo, se detectó un mayor contenido de fenoles en las muestras tratadas con la combinación 8 kJ.m<sup>-2</sup>/48 °C 3h durante la mayor parte del almacenamiento a 20 °C (Figura III.10).

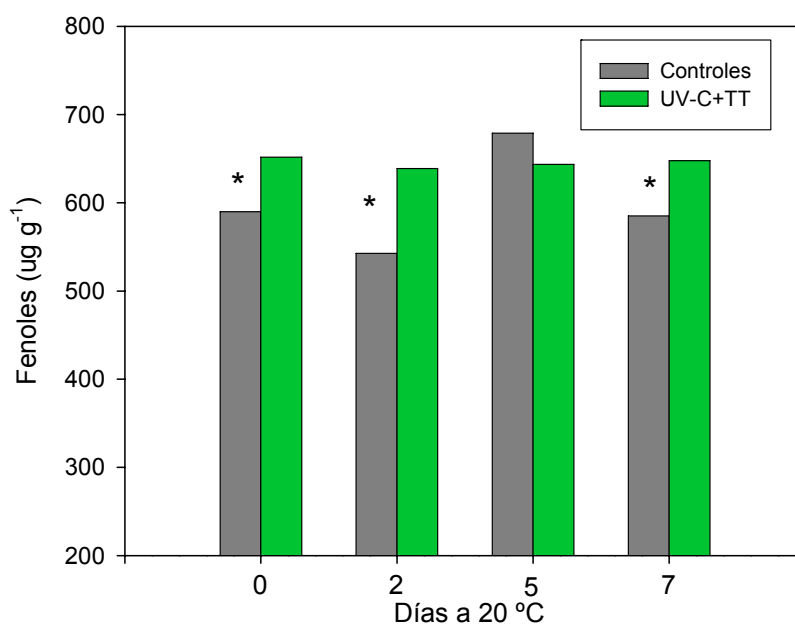


Figura III.10: Cambios en el contenido de compuestos fenólicos durante el almacenamiento a 20 °C para los ramilletes controles y los tratados con 8 kJ.m<sup>-2</sup>/48 °C 3h. Los resultados se expresan como µg fenoles/g de tejido. El asterisco (\*) indica diferencia significativa. LSD<sub>0,05</sub>=37,47

Comparando estos resultados con los mostrados en el capítulo I (Figura I.7) en el que se muestra el efecto de la radiación UV-C solamente y en el capítulo II

(Figura II.4) en donde se muestra que el tratamiento térmico causa un descenso momentáneo en el contenido de fenoles, se puede concluir que el aumento de fenoles en las muestras con tratamiento combinado se debe principalmente al efecto de la radiación UV-C. Un incremento en el contenido de fenoles totales también se observó en pimiento (Vicente y col, 2005) y brócoli (Costa y col, 2006) tratados con una dosis de UV-C de 7 y 10 kJ.m<sup>-2</sup> respectivamente. Asimismo, mangos cortados y mangos enteros expuestos a radiación UV-C también mostraron un aumento en la acumulación de compuestos fenólicos (González-Aguilar y col, 2007 (a) y 2007 (b)). Se encontró además una fuerte correlación entre el aumento del contenido de compuestos fenólicos y la activación de la enzima PAL en respuesta al tratamiento con radiación UV-C en frutos de mango cortado (González Aguilar y col, 2007 (a)) En todos los ejemplos citados, el contenido de fenoles totales fue mayor en los frutos tratados que en los controles, lo que sugiere que la radiación UV-C induce un incremento en la síntesis de estos compuestos. Dado que los fenoles también participan en la resistencia contra el ataque de patógenos, se puede concluir que el tratamiento combinado podría aumentar esta resistencia a través de la biosíntesis de compuestos fenólicos.

#### **III.2.3.1.2 Contenido de ácido ascórbico**

El contenido de ácido ascórbico en brócoli mínimamente procesado disminuyó durante el almacenamiento a 20 °C tanto en las muestras controles como en las tratadas (Figura III.11). Sin embargo, la disminución fue más importante en los brócolis controles respecto a aquellos que se sometieron al tratamiento combinado. Como consecuencia, hacia el final del almacenamiento las muestras tratadas poseían un 14 % más de ácido ascórbico que las muestras controles, observándose la misma tendencia para el ácido ascórbico total.

Trabajos previos mostraron que los tratamientos térmicos por si solos pueden retrasar la pérdida de ácido ascórbico durante la postcosecha de diferentes productos. En cabezas enteras de brócoli, el tratamiento térmico ocasionó una disminución mas lenta del contenido de ácido ascórbico durante el almacenamiento (Shigenaga y col, 2005). Asimismo, Vicente y col, (2006) observaron que frutillas tratadas térmicamente contenían niveles más altos de

ácido ascórbico que sus respectivos controles. Por otra parte, los tratamientos con UV-C también pueden causar un retraso similar en la degradación de este compuesto. Por ejemplo, en pimientos tratados con UV-C el contenido de ácido ascórbico disminuyó mas lentamente que en los respectivos controles sin tratar (Andrade Cuvi, 2008). Como se muestra en el capítulo I, en brócoli mínimamente procesado tratado sólo con radiación UV-C se observó una menor pérdida de ácido ascórbico que en las flores controles después de 21 días de almacenamiento a 4 °C.

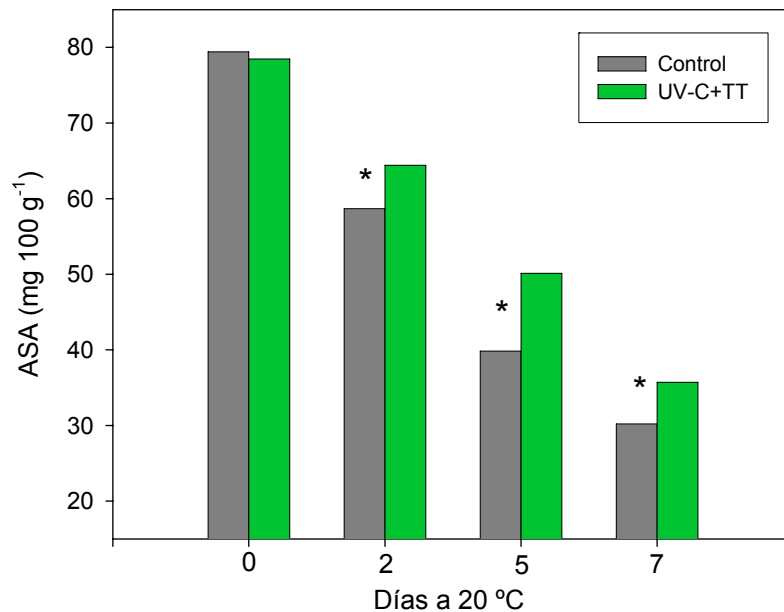


Figura III.11: Cambios en el contenido de ácido ascórbico durante el almacenamiento a 20° C de los ramilletes controles y los tratados con 8 kJ.m<sup>-2</sup>/48 °C 3h. Los resultados se expresan como mg ASA/ 100 g tejido. El asterisco (\*) indica diferencia significativa. LSD<sub>0,05</sub>=4

### III.2.3.1.3 Contenido de ácido dehidroascórbico

Las frutas y vegetales frescos son una rica fuente de vitamina C, la principal forma biológicamente activa es el ácido ascórbico, pero el ácido dehidroascórbico, producto de su oxidación, también es biológicamente activo (Wills y col, 1984).

El contenido de ácido dehidroascórbico de brócoli fresco cortado aumentó luego de dos días de almacenamiento tanto en las muestras controles como en las tratadas. Luego de este período, las muestras controles disminuyeron su contenido hacia el día 5, el que se mantuvo bajo hasta el fin del ensayo. Por el

contrario, las muestras tratadas mantuvieron altos sus niveles de ácido dehidroascórbico hasta el día 5 de almacenamiento, mostrando luego una disminución hacia el día 7 de almacenamiento. Como consecuencia los brócolis tratados presentaron en el día 5 de almacenamiento un 45 % más de ácido dehidroascórbico que los brócolis controles (Figura III.12).

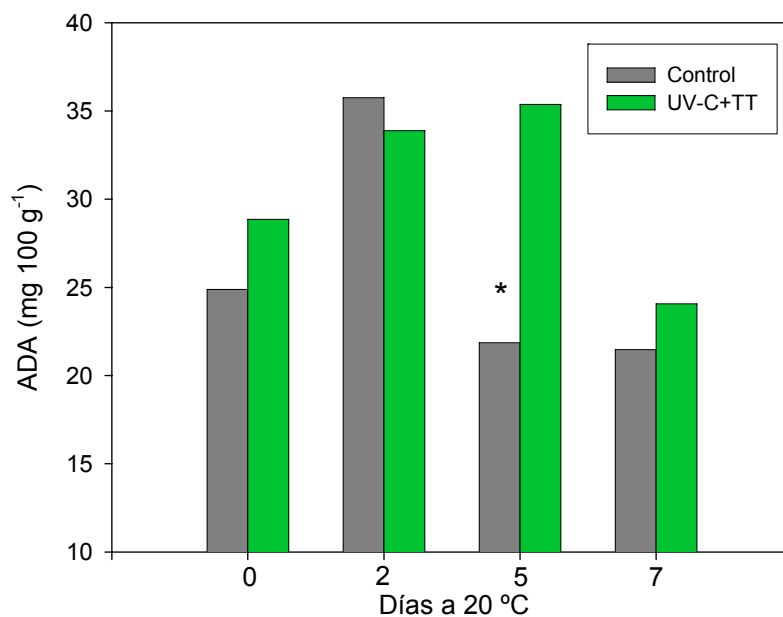


Figura III.12: Cambios en el contenido de ácido dehidroascórbico durante el almacenamiento a 20 °C para los ramilletes controles y los tratados con 8 kJ.m<sup>-2</sup>/48 °C 3h. Los resultados se expresan como mg ADA/ 100 g tejido. El asterisco (\*) indica diferencia significativa. LSD<sub>0,05</sub>=4,64

Como mencionamos previamente a concentración de ADA en los vegetales es, generalmente, más baja que la del ácido ascórbico y generalmente representa un contenido menor al 10 % de la vitamina C total, pero esta concentración tiende a incrementarse durante el almacenamiento (Wills y col, 1984). En este trabajo el contenido de ácido dehidroascórbico representó hasta un 35 % del ácido ascórbico total, aunque no se mantuvo en el tiempo. El tratamiento combinado contribuyó a mantener elevado el ADA por más tiempo y así conservar mejores características antioxidantes.

#### III.2.3.1.4 Actividad antioxidante

La actividad antioxidante fue superior en los brócolis tratados luego de la aplicación del tratamiento. Posteriormente la actividad antioxidante disminuyó

durante el almacenamiento tanto en las muestras controles como en las tratadas, aunque la actividad antioxidante en las muestras tratadas fue mayor a los respectivos controles para todos los días de almacenamiento (Figura III.13).

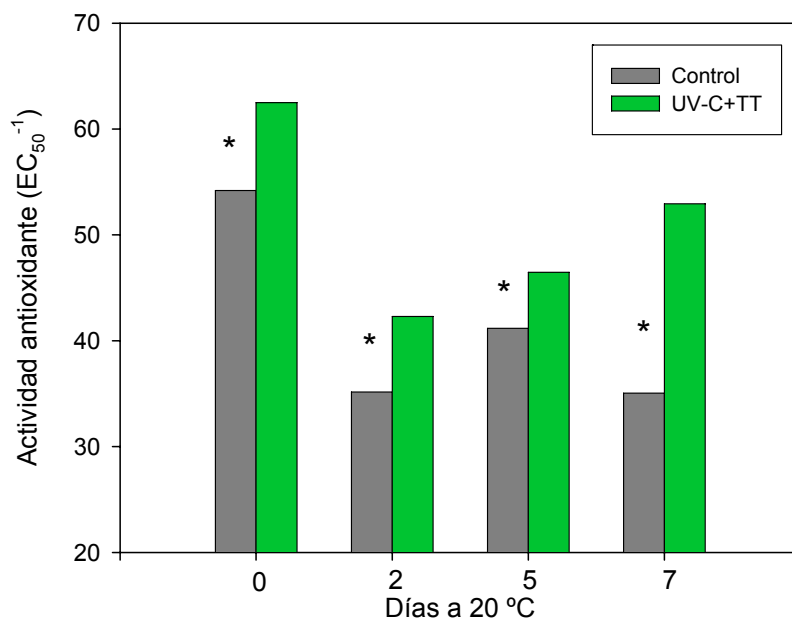


Figura III.13: Cambios en la actividad antioxidante durante el almacenamiento a 20 °C de los ramilletes controles y los tratados con 8 kJ.m<sup>-2</sup>/48 °C 3h. El poder antioxidante se define como la inversa de la cantidad de extracto que se necesita para disminuir la absorbancia inicial del DPPH en un 50%. El asterisco (\*) indica diferencia significativa. LSD<sub>0,05</sub>=3,32

Como mencionamos anteriormente el contenido de compuestos fenólicos y de ácido ascórbico fue superior en las nuestras tratadas con respecto a las controles lo que podría indicar la mayor actividad antioxidante en los brócolis tratados. Trabajos previos han descripto un aumento en la actividad antioxidante en respuesta a la radiación UV-C (Adrian y col, 2000; Costa y col, 2006). En mango cortado la radiación UV-C tuvo un efecto positivo sobre la actividad antioxidante (Gonzalez Aguilar y col, 2007 (a)). En frutillas tratadas térmicamente a 45 °C durante 3 horas la actividad antioxidante fue más alta que en las no tratadas (Vicente y col, 2006). El tratamiento combinado 8 kJ.m<sup>-2</sup>/48 °C 3 horas induciría el sistema de defensa antioxidante no enzimático, y contribuiría a una mejor calidad nutricional y también podría ayudar a combatir la producción de EROs generada durante la senescencia postcosecha de brócoli mínimamente procesado.



### III.2.3.2 Efecto del tratamiento combinado sobre la actividad fenilalanina amonio-liasa (PAL)

#### III.2.3.2.1 Actividad fenilalanina-amonioliasa (PAL)

La actividad PAL muestra relativamente pocas variaciones durante la senescencia postcosecha de las muestras control. Solo se detectó un incremento en su actividad hacia el final del almacenamiento. Las muestras tratadas presentaron una actividad PAL significativamente mayor a los controles inmediatamente luego del tratamiento. Dicha actividad presentó una variación similar a los controles pero se mantuvo más alta durante todo el almacenamiento (Figura III.14).

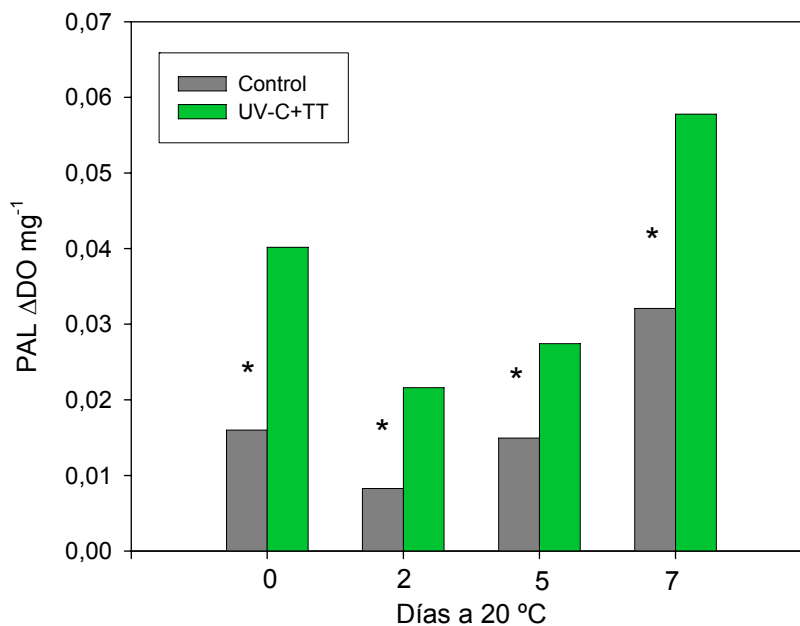


Figura III.14: Evolución de la actividad específica de PAL en función del tiempo de almacenamiento a 20 °C.  $UAE_{PAL}$ : DDO/hora/mg proteína. El asterisco (\*) indica diferencia significativa.  $LSD_{0,05}=0,012$

La enzima PAL es una enzima clave en la ruta de síntesis de todos los compuestos fenólicos, los cuales están involucrados tanto en la acción antioxidante como en la defensa frente a estrés biótico (ej. fitoalexinas, lignina) La radiación UV es un fuerte inductor de la actividad PAL. En diversos frutos tales como mangos, duraznos y manzanas (González Aguilar y col, 2007 (a);

Ghaouth y col, 2003; Stevens y col, 1990) se observó un aumento en la actividad PAL luego del tratamiento con UV-C.

El tratamiento térmico, por otro lado, puede provocar una disminución en esta actividad, tal como se observó en frutillas (Civello y col, 1998).

En este trabajo, el aumento de la actividad PAL luego del tratamiento combinado estaría indicando que el efecto activador de la radiación UV-C sería más importante que la probable inhibición provocada por el tratamiento térmico. Por lo tanto el tratamiento combinado induciría el sistema de defensa antioxidante y aumentaría la resistencia contra ataque de patógenos por inducir la actividad PAL y como consecuencia la biosíntesis de compuestos fenólicos.

### **III.2.3.3 Efecto del tratamiento combinado sobre la actividad de las enzimas antioxidantes**

#### **III.2.3.3.1 Actividad superóxido dismutasa (SOD)**

La actividad SOD se mantuvo prácticamente invariable en las muestras control durante todo el almacenamiento. En cambio, las muestras tratadas mostraron un importante incremento en la actividad SOD inmediatamente después del tratamiento (32 %). Esta mayor actividad se mantuvo hasta el día 5 de almacenamiento para descender hacia el día 7 volviendo a un nivel similar al medido en las muestras control (Figura III.15).

En otros sistemas se observó que una mayor acumulación de SOD se podía asociar con retraso en el deterioro o mayor resistencia al estrés. En plantines de trigo tolerantes a estrés térmico de alta temperatura se observó que la actividad de SOD fue significativamente mayor que en los plantines susceptibles (Almeselmani y col, 2006). Asimismo, Vicente y col, (2006), trabajando en frutillas, encontraron que el tratamiento térmico indujo mayor actividad SOD luego de 14 días a 0 °C más 2 días a 20 °C, lo que se correlacionó con una mayor vida postcosecha de los frutos tratados. En brócoli, particularmente, Toivonen y Sweeney (1998) observaron una correlación entre las enzimas antioxidantes y la diferencia entre la susceptibilidad al amarillamiento de dos cultivares de brócoli. Aquel cultivar

que se mantuvo verde más tiempo durante el almacenamiento postcosecha, presentó mayor actividad de SOD.

Estos datos, junto con los medidos en el presente trabajo indicarían que el incremento en la actividad de SOD podría contribuir a evitar o retrasar la acumulación de radicales superóxido durante el almacenamiento y así disminuir el daño en los tejidos en las muestras tratadas.

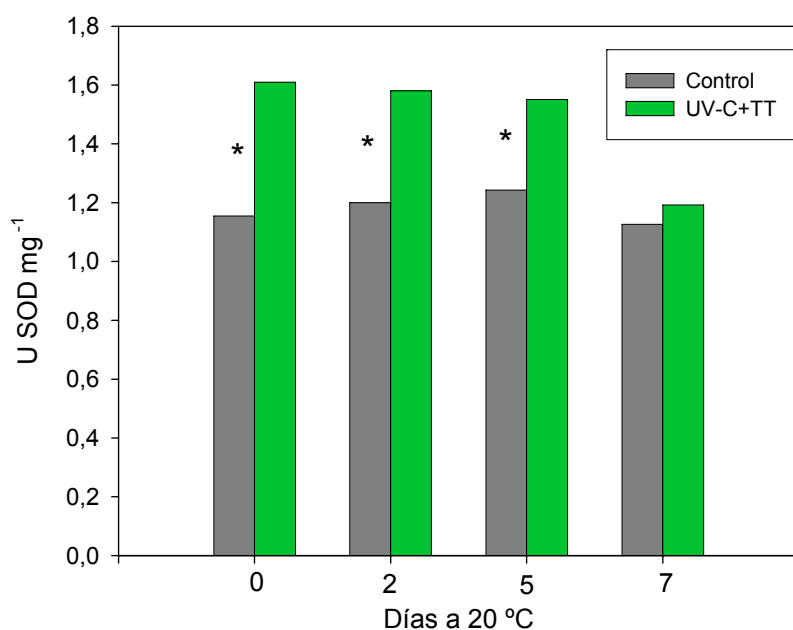


Figura III.15: Evolución de la actividad específica de SOD en función del tiempo de almacenamiento a 20 °C.  $UAE_{SOD}$ : La cantidad de enzima que, bajo las condiciones de ensayo, causa un 10 % de inhibición de la reacción observada en ausencia de enzima. El asterisco (\*) indica diferencia significativa.  $LSD_{0,05}=0,114$

### III.2.3.3.2 Actividad peroxidasa (POX)

Los brócolis controles presentaron un incremento en la actividad POX durante el almacenamiento hasta alcanzar el máximo en el día 5 para luego comenzar a disminuir hacia el día 7. En las muestras tratadas, se produjo una disminución marcada de la actividad POX inmediatamente después del tratamiento combinado. A partir del día 2 la actividad aumenta pero se mantiene menor que los controles. Hacia los días 5 y 7 las muestras tratadas tienen niveles de actividad similar a los controles (Figura III.16).

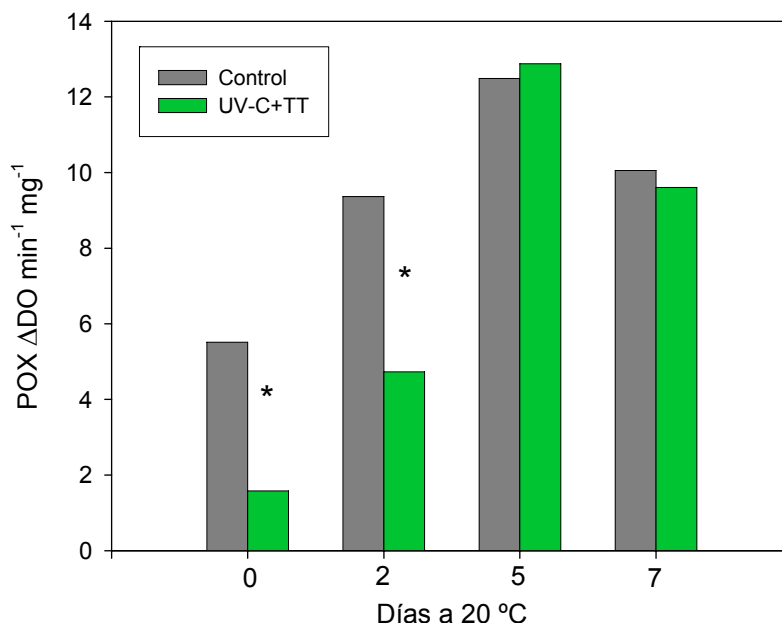


Figura III.16: Evolución de la actividad específica de POX en función del tiempo de almacenamiento a 20 °C.  $UAE_{POX}$ :  $\Delta$ DO/min/mg proteína. El asterisco (\*) indica diferencia significativa.  $LSD_{0,05}=2,22$

Otros trabajos han mostrado una menor actividad POX luego de la aplicación de tratamientos térmicos. En frutillas, Vicente y col (2006) observaron menor actividad de POX en frutos sometidas a un tratamiento térmico moderado. Asimismo, la reducción en la actividad POX por tratamientos térmicos ha sido descrita en lechuga (Loaiza Velarde y col, 1997).

Peroxidasa está relacionada con la eliminación de  $H_2O_2$  pero también podría estar involucrada en la degradación de clorofila (Funamoto y col, 2003; Yamauchi y Watada, 1991), además esta enzima participaría en el pardeamiento y el daño a los tejidos. La oxidación de un amplio rango de compuestos orgánicos sugiere que la enzima puede estar asociada a la pérdida de color, aroma y valor nutricional de productos frescos y procesados (Thongsook y Barrett, 2005).

Diversos estudios han mostrado que la actividad de la enzima POX incrementa marcadamente durante el amarillamiento de brócoli (Funamoto y col, 2003). En brócoli, los tratamientos térmicos retrasan el deverdizado en forma simultánea con una disminución de la actividad de enzimas asociadas a la degradación de clorofilas, entre ellas peroxidasa (Dong y col, 2004; Barrett y col, 2000; Costa y col, 2005). Por lo tanto en los brócolis controles la alta

actividad POX hallada podría ser una respuesta al mayor daño y el tratamiento combinado provocaría un retraso en la actividad de POX, lo que indicaría un retraso en el daño postcosecha en concordancia con la menor actividad CAT observada en las muestras tratadas.

### III.2.3.3.3 Actividad catalasa (CAT)

Inmediatamente después del tratamiento combinado no se observa diferencia significativa entre las muestras controles y tratadas en la actividad específica de la enzima CAT. Luego, durante los días 2 y 5 de almacenamiento la actividad aumentó significativamente en las muestras controles para disminuir al día 7. Por el contrario, la actividad específica de CAT en las muestras tratadas se mantiene sin cambios hasta el día 7 de almacenamiento, donde recién en ese momento se produce un aumento en su actividad (Figura III.17).

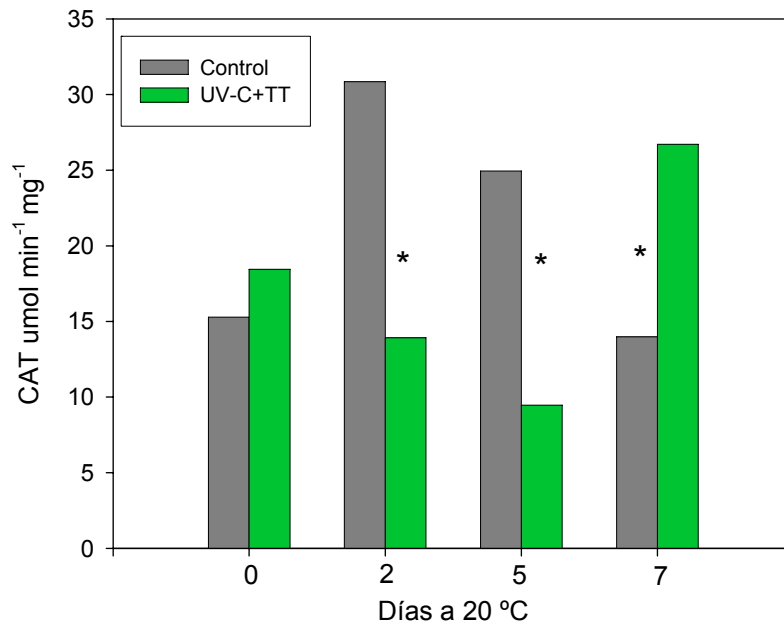


Figura III.17: Evolución de la actividad específica de CAT en función del tiempo de almacenamiento a 20 °C. UAE<sub>CAT</sub>: μmol/min/mg proteína. El asterisco (\*) indica diferencia significativa. LSD<sub>0,05</sub>=6,51

El Km de esta enzima es relativamente alto, dado que su Vmax es muy alta, por lo que estaría más activa cuando se encuentra en presencia de altas

concentraciones de  $H_2O_2$ , lo que podría indicar que en las muestras controles habría una elevada producción de  $H_2O_2$  que produce un incremento en la síntesis de catalasa (reflejada por su mayor actividad) necesaria para eliminar el  $H_2O_2$  que se estaría produciendo. En cambio en las muestras tratadas este aumento significativo en la actividad CAT recién se observa en el día 7 lo que podría indicar un retraso en la acumulación de peróxido de hidrógeno en las muestras tratadas, que se relaciona con un menor daño en los tejidos debido a un retraso general de la senescencia.

#### III.2.3.3.4 Actividad ascorbato peroxidasa (APX)

La actividad APX se mantuvo prácticamente invariable durante el almacenamiento de las muestras control, sólo se detectó un ligero aumento en los días 5 y 7. En las muestras tratadas, inmediatamente luego del tratamiento, no se observaron diferencias con la actividad de APX de los ramilletes controles. No obstante, los ramilletes tratados presentaron mayor actividad APX luego de 5 y de 7 días de almacenamiento, lo que se correlaciona con un mayor contenido de ácido dehidroascórbico en las muestras sometidas al tratamiento combinado (Figura III.18).

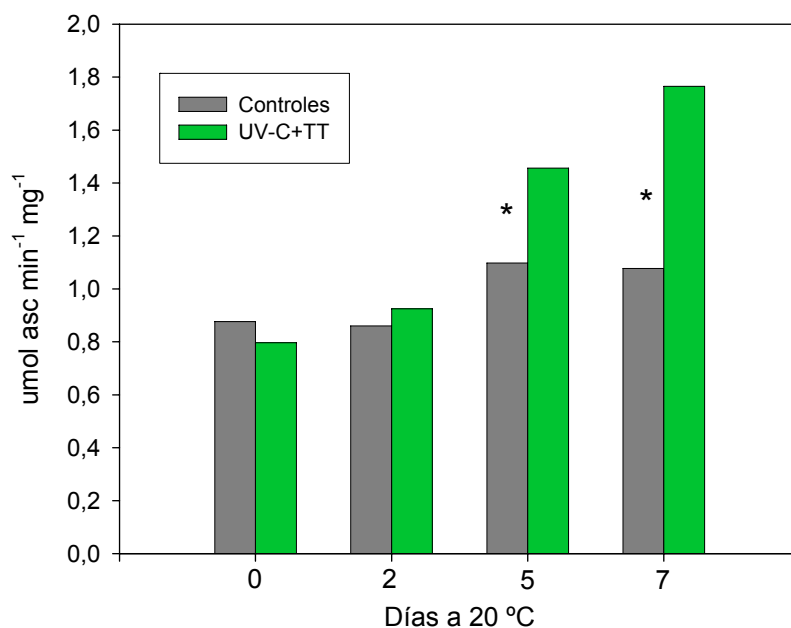


Figura III.18: Evolución de la actividad específica de APX de las muestras controles y tratadas durante el almacenamiento a 20 °C.  $UAE_{APX}$ :  $\mu\text{mol}$  de ascorbato/min/mg proteína. El asterisco (\*) indica diferencia significativa.  $LSD_{0,05}=0,25$

Como se describió previamente, una mayor actividad APX podría tener influencia en la protección contra EROs generadas en condiciones de estrés. En este sentido, trabajos realizados en trigo describieron una mayor actividad APX en aquellas variedades tolerantes al estrés térmico (Almeselmani y col, 2006). La inducción de APX en respuesta este tipo de estrés se ha descrito en diversas especies. Sato y col. (2001) demostraron que la actividad APX se incrementa en plantas de arroz sometidas a condiciones de estrés por altas temperaturas. En tratamientos postcosecha, por ejemplo, se detectó un incremento de esta actividad en frutillas (Vicente y col, 2006) y brócoli (Shigenaga y col, 2005).

Por otro lado, incrementos de la actividad APX también fueron detectados luego del tratamiento con UV-C en pimientos (Andrade Cuvi, 2008) y tomates durante el almacenamiento postcosecha (Barka, 2001).

En resumen, el tratamiento combinado mantiene más altos los niveles de antioxidantes no enzimáticos, hay un aumento en el contenido de compuestos fenólicos que se correlaciona con un aumento en la actividad PAL, y hay una menor pérdida en el contenido de ascórbico, lo que se relaciona también con una superior actividad antioxidante en las muestras tratadas. El tratamiento combinado influye sobre la actividad de las enzimas antioxidantes. Se produce un aumento en la actividad SOD, en tanto que la actividad de CAT y APX son dependientes de la concentración del peróxido de hidrógeno dismutado por la SOD. En las muestras tratadas es probable que se acumule menos  $H_2O_2$  y por eso la actividad CAT y APX sea menor inicialmente y que estas recién aumenten hacia el final del almacenamiento. El tratamiento combinado disminuye la actividad de POX a tiempo cero, lo que contribuiría a un menor daño en los tejidos lo que se relaciona con una menor actividad de CAT y APX. Hacia el final del tratamiento el aumento en la actividad APX genera un incremento en el ADA de las muestras tratadas.

#### **III.2.4 CONCLUSIONES**

-El tratamiento combinado  $8 \text{ kJ.m}^{-2}/48 \text{ }^{\circ}\text{C}$  3 h induciría el sistema de defensa antioxidante no enzimático, y contribuiría a una mejor calidad nutricional. También podría ayudar a combatir la producción de EROs generada durante la senescencia postcosecha de brócoli mínimamente procesado.

-El tratamiento combinado  $8 \text{ kJ.m}^{-2}/48 \text{ }^{\circ}\text{C}$  3 h, al inducir la actividad de la enzima PAL podría inducir a la resistencia contra el ataque de patógenos en brócoli mínimamente procesado.

-El tratamiento combinado produjo un incremento en la actividad de SOD y una disminución en la actividad de POX que podría contribuir a disminuir el daño en los tejidos en las muestras tratadas, esto provocaría un aumento tardío de la actividad de las enzimas CAT y APX durante la senescencia.



## **PARTE II**

**III.3 Aplicación del tratamiento combinado con radiación UV-C y aire caliente. Efecto sobre la calidad y senescencia de muestras almacenadas a 0 °C.**

### **III.3.1 OBJETIVO**

En la sección anterior se demostró que la combinación de tratamientos era efectiva para retrasar la senescencia y mantener la calidad de brócoli mínimamente procesado a 20 °C. De acuerdo a lo mencionado previamente (objetivos capítulos I y II) se torna necesario evaluar si este efecto benéfico se mantiene durante el almacenamiento refrigerado. En este capítulo se describe el efecto de la combinación de radiación UV-C y tratamiento térmico con aire caliente sobre parámetros de calidad y senescencia en brócoli mínimamente procesado almacenado a 0 °C.

### **III.3.2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

#### **III.3.2.1 Apariencia general**

La apariencia general de las muestras tratadas con el tratamiento combinado fue mejor la de los respectivos controles. No se observaron síntomas de deshidratación, ni presencia de hongos y bacterias. Se observó que las muestras tratadas mantenían el color verde hasta el día 21 de almacenamiento, en tanto que los controles ya se encontraban en un mal estado general y amarillos hacia el final del almacenamiento.

#### **III.3.2.2 Pérdida de peso**

Las muestras controles y tratadas presentaron un aumento en la pérdida de peso durante el almacenamiento refrigerado, alcanzando un máximo de 4 % después de 21 días de almacenamiento. El tratamiento redujo ligeramente la pérdida de peso pero las diferencias entre muestras no fueron significativas (Tabla III.2).

#### **III.3.2.3 Pérdida de electrolitos**

La pérdida de electrolitos fue significativamente menor en las muestras tratadas luego de 14 y 21 días de almacenamiento a 0 °C (Tabla III.2). Este parámetro puede ser utilizado como una medida del daño que sufren los tejidos. Los resultados obtenidos indican un daño importante en las muestras controles mientras que las tratadas mantendrían sus tejidos en mejores condiciones. Se ha demostrado que los tratamientos térmicos de alta temperatura por si solos provocan modificaciones en la composición de las membranas plasmáticas. Lurie y col. (1991) encontraron que los tratamientos térmicos incrementaron la estabilidad de membranas al modificar su composición lipídica. Por otra parte en brócoli tratado solo con radiación UV-C también se observó menor pérdida de electrolitos (capítulo 1). Los resultados

hallados indican una menor disrupción de tejidos y daño de membranas en los ramilletes a los que se les aplicó el tratamiento combinado.

**Tabla III.2:** Pérdida de peso, pérdida de electrolitos y producción de CO<sub>2</sub> en muestras control (C) y tratadas con UV-C + TT (T) (8 kJ.m<sup>-2</sup>/48 °C 3 h) en brócoli mínimamente procesado almacenado 21 días a 0 °C.

		Días a 0 °C			
		0	7	14	21
<b>Pérdida de peso (%)</b> LSD =0,39	<b>C</b>	0,00	1,17	2,54	4,03
	<b>T</b>	0,00	1,56	2,66	3,76
<b>Pérdida de electrolitos (%)</b> LSD =6,10	<b>C</b>	13,47	7,06	14,63	17,93
	<b>T</b>	11,82	6,42	*5,88	*8,49
<b>Producción de CO<sub>2</sub> (mL g<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>)</b> LSD = 0,011	<b>C</b>	0,110	0,107	0,099	*0,110
	<b>T</b>	*0,143	0,105	0,090	0,091

(\*) Indica diferencia significativa entre (C) y (T)

#### III.3.2.4 Actividad respiratoria

La velocidad de respiración de las muestras tratadas presentó diferencias inmediatamente después de aplicado el tratamiento (tabla III.2). La producción de CO<sub>2</sub> aumentó aproximadamente 1,5 veces después del tratamiento combinado y luego disminuyó. Las muestras controles no presentaron cambios en la producción de CO<sub>2</sub> durante el almacenamiento. Hacia el final del almacenamiento, las muestras tratadas presentaron una producción de CO<sub>2</sub> significativamente menor que los controles.

#### III.3.2.5 Color superficial

El valor del ángulo Hue disminuyó en las muestras controles durante el almacenamiento refrigerado, alcanzando, hacia el día 21, un valor un 8 % menor respecto al inicial.

En las muestras tratadas, no se detectó variación respecto al valor inicial, por lo que estas muestras presentaron un Hue significativamente mayor que los controles (Figura III.19).

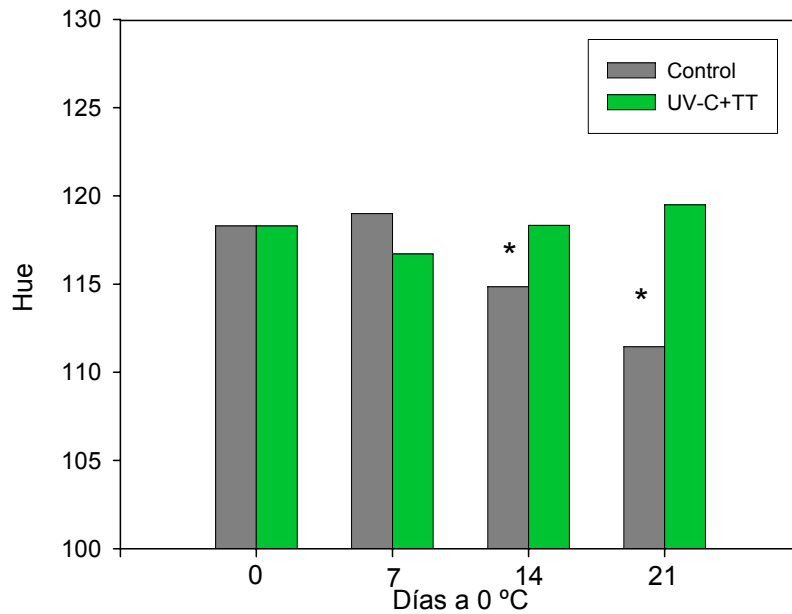


Figura III.19: Efecto del tratamiento combinado con radiación UV-C ( $8 \text{ kJ.m}^{-2}$ ) y aire caliente  $48 \text{ °C}/3 \text{ h}$ , sobre el valor del ángulo Hue en brócoli mínimamente procesado almacenado durante 21 días a  $0 \text{ °C}$ . El asterisco (\*) indica diferencias significativas. ( $\text{LSD}_{\text{Hue}}=2,27$ )

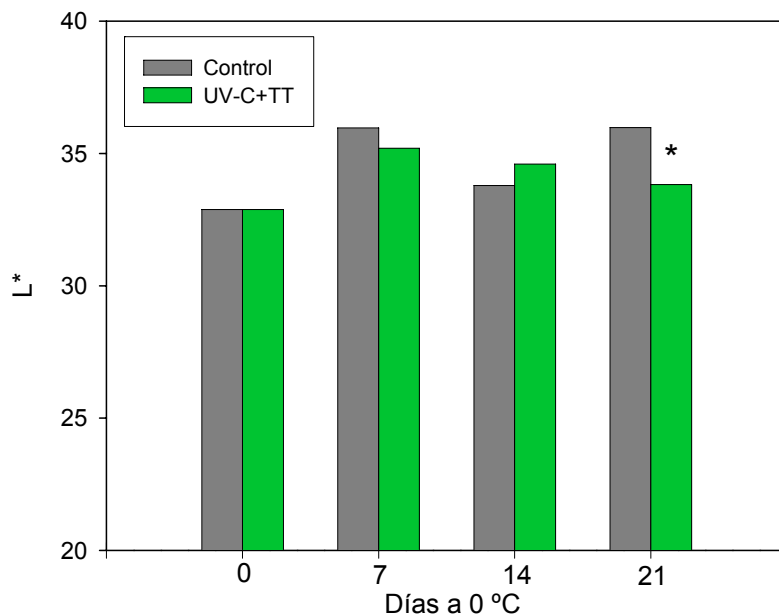


Figura III.20: Efecto del tratamiento combinado con radiación UV-C ( $8 \text{ kJ.m}^{-2}$ ) y aire caliente  $48 \text{ °C}/3 \text{ h}$ , sobre la luminosidad ( $L^*$ ) en brócoli mínimamente procesado almacenado durante 21 días a  $0 \text{ °C}$ . El asterisco (\*) indica diferencias significativas. ( $\text{LSD}_{L^*}=1,7$ )

En cuanto a la luminosidad ( $L^*$ ), luego de 21 días a  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ , los valores de  $L^*$  aumentaron en ambos casos, pero en las muestras donde se aplicó el tratamiento combinado este aumento fue menor (Figura III.20).

Por lo tanto, el menor aumento de luminosidad acompañado de un menor descenso del ángulo Hue sugiere que el tratamiento combinado con radiación UV-C ( $8\text{ kJ}\cdot\text{m}^{-2}$ ) y aire caliente  $48\text{ }^{\circ}\text{C}/3\text{ h}$  produce un retraso en el amarilleamiento de las inflorescencias almacenadas a  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### III.3.2.6 Contenido de clorofilas

El contenido de clorofilas disminuyó durante el almacenamiento en ambos casos, pero la velocidad de degradación fue menor en las muestras tratadas que en los controles. Luego de 21 días de almacenamiento a  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  las inflorescencias tratadas presentaron un nivel de clorofilas aproximadamente 30 % superior a los respectivos controles (Figura III.21).

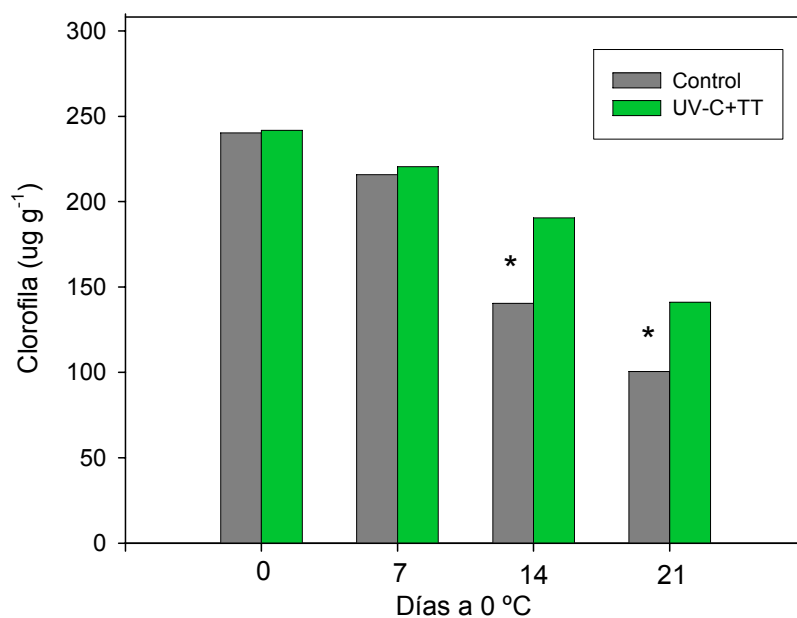


Figura III.21: Efecto del tratamiento combinado con radiación UV-C ( $8\text{ kJ}\cdot\text{m}^{-2}$ ) y aire caliente  $48\text{ }^{\circ}\text{C}/3\text{ h}$ , sobre el contenido de clorofila en brócoli mínimamente procesado almacenado durante 21 días a  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ . El asterisco (\*) indica diferencias significativas. ( $\text{LSD}_{\text{clorofila}}=30$ ).

El mayor contenido de clorofilas concuerda con el mayor ángulo Hue y menor valor de L\* observado en las muestras tratadas almacenadas a 0 °C, lo que confirmaría el retraso en el amarilleamiento de las inflorescencias.

### III.3.2.7 Contenido de compuestos fenólicos

En el caso del contenido de compuestos fenólicos, se encontró un aumento en el nivel de estos compuestos inmediatamente después del tratamiento de manera similar a lo observado a 20 °C. Las muestras tratadas mantuvieron mayores niveles que los controles durante el almacenamiento a 0 °C, por lo que al final de éste, las muestras tratadas alcanzaron un nivel 19 % más alto que los controles (Figura III.22).

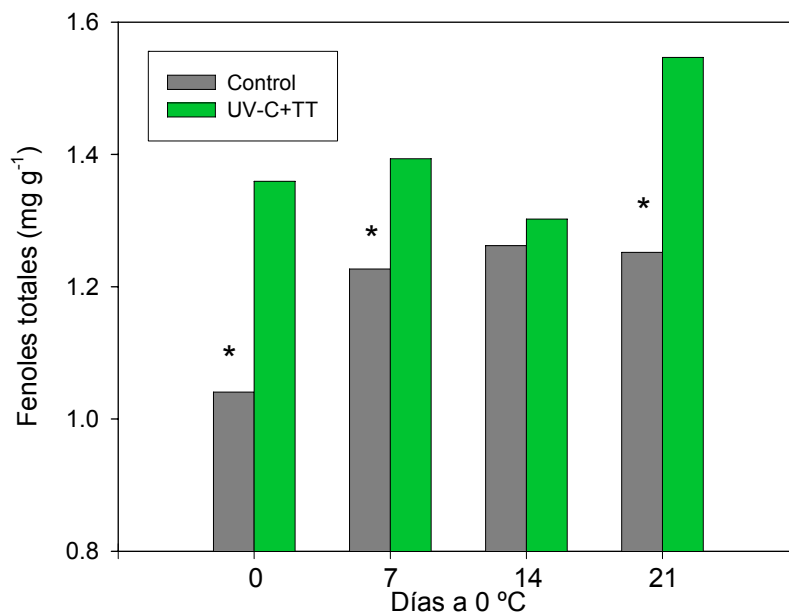


Figura III.22: Efecto del tratamiento combinado con radiación UV-C (8 kJ.m<sup>-2</sup>) y aire caliente 48 °C/3 h, sobre el contenido de fenoles totales en brócoli mínimamente procesado almacenado durante 21 días a 0 °C. El asterisco (\*) indica diferencias significativas. (LSD<sub>fenoles totales</sub>=0,10)

Tal como se mencionó en el capítulo I se conoce que los compuestos fenilpropanoides son sintetizados en respuesta a los tratamientos UV-C, básicamente a través de una inducción de la actividad PAL, lo cual posiblemente forma parte del mecanismo de protección de las plantas frente a un exceso de radiación (Bieza y col, 2001). Como se mencionó en el capítulo III

primera parte B, el aumento de la actividad PAL luego del tratamiento combinado estaría indicando que el efecto activador de la radiación UV-C sería más importante que la inhibición provocada por el tratamiento térmico. Por lo tanto el tratamiento combinado induciría la actividad PAL y como consecuencia la biosíntesis de compuestos fenólicos.

### III.3.2.8 Actividad antioxidante

En general, las muestras control mostraron menor actividad antioxidante que los brócolis tratados durante el almacenamiento a 0 °C (Figura III.23). Las muestras que fueron tratadas con el tratamiento combinado presentaron un 22 % más de actividad antioxidante que los brócolis controles luego de 21 días. La actividad antioxidante muestra una tendencia similar al contenido de fenoles, lo que podría indicar que el primero estaría fuertemente relacionado a los niveles de éste tipo de compuestos.

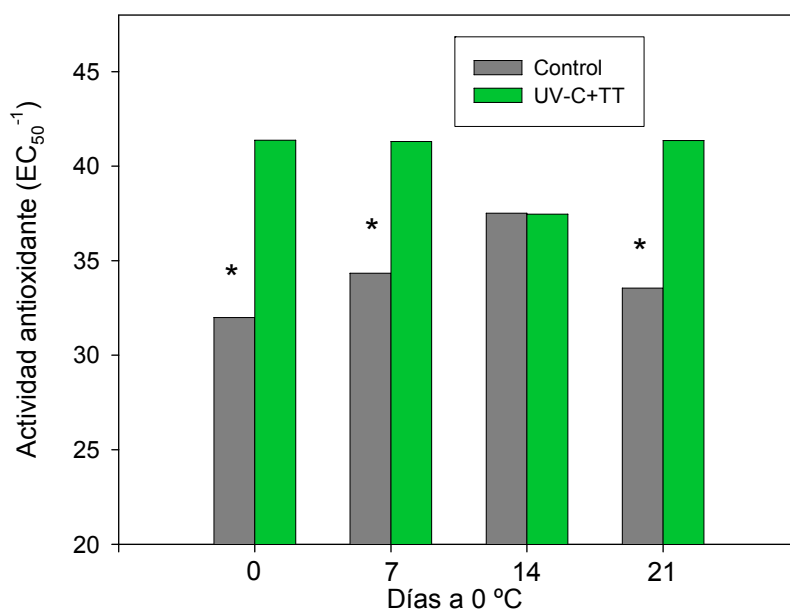


Figura III.23: Efecto del tratamiento combinado con radiación UV-C (8 kJ.m<sup>-2</sup>) y aire caliente 48 °C/3 h, sobre la actividad antioxidante en brócoli mínimamente procesado almacenado durante 21 días a 0 °C. El asterisco (\*) indica diferencias significativas. (LSD<sub>DPPH</sub>=2,64)



### III.3.2.9 Contenido de proteínas solubles y totales

El contenido de proteínas solubles aumentó luego de 14 días de almacenamiento a 0 °C tanto en las muestras control como en las tratadas, indicando una probable desorganización de membranas celulares. Hacia el final del almacenamiento se observó un descenso en este valor en ambas muestras (Figura III.24).

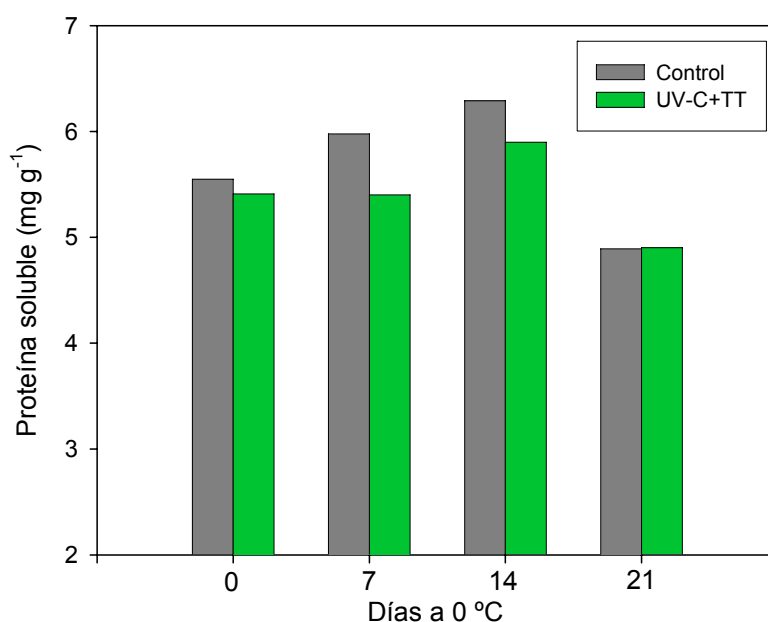


Figura III.24: Efecto del tratamiento combinado con radiación UV-C (8 kJ.m<sup>-2</sup>) y aire caliente 48 °C/3 h, sobre el contenido de proteína soluble en brócoli mínimamente procesado almacenado durante 21 días a 0 °C. El asterisco (\*) indica diferencias significativas. (LSD<sub>proteína soluble</sub>=1,27).

Por otro lado, el contenido de proteínas totales se relaciona con el avance de la senescencia ya que durante la misma se produce una importante degradación, lo cual se considera un síntoma del proceso. El contenido de proteínas totales disminuyó tanto en las muestras controles como en las muestras tratadas (Figura III.25). Sin embargo, en las muestras tratadas el contenido de proteína total fue superior a la de las controles durante el almacenamiento a 0 °C. Tal como se describió en la primera parte de éste capítulo, el tratamiento térmico tendría un efecto mayor que la radiación UV-C en cuanto a la inhibición de la degradación de proteínas.

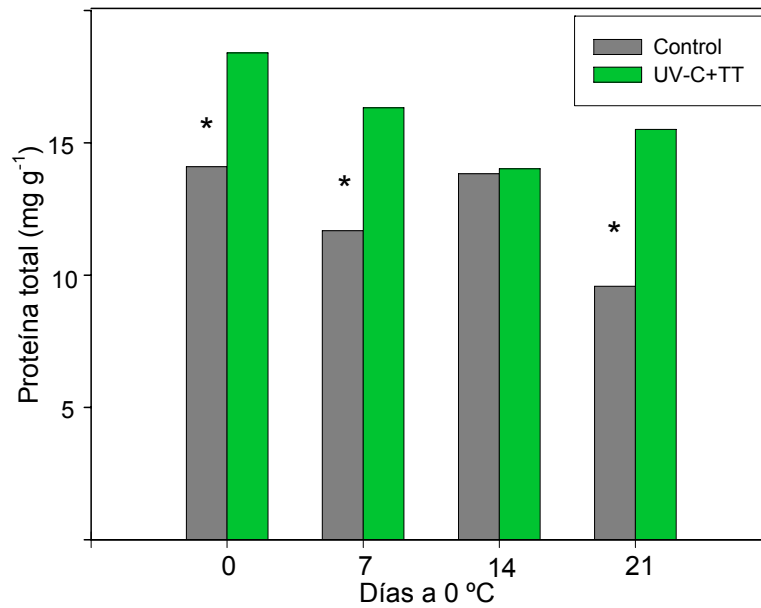


Figura III.25: Efecto del tratamiento combinado con radiación UV-C ( $8 \text{ kJ.m}^{-2}$ ) y aire caliente  $48 \text{ }^{\circ}\text{C}/3 \text{ h}$ , sobre el contenido de proteína total en brócoli mínimamente procesado almacenado durante 21 días a  $0 \text{ }^{\circ}\text{C}$ . El asterisco (\*) indica diferencias significativas. ( $\text{LSD}_{\text{proteína total}}=0,64$ )

### III.3.2.10 Contenido de azúcares totales

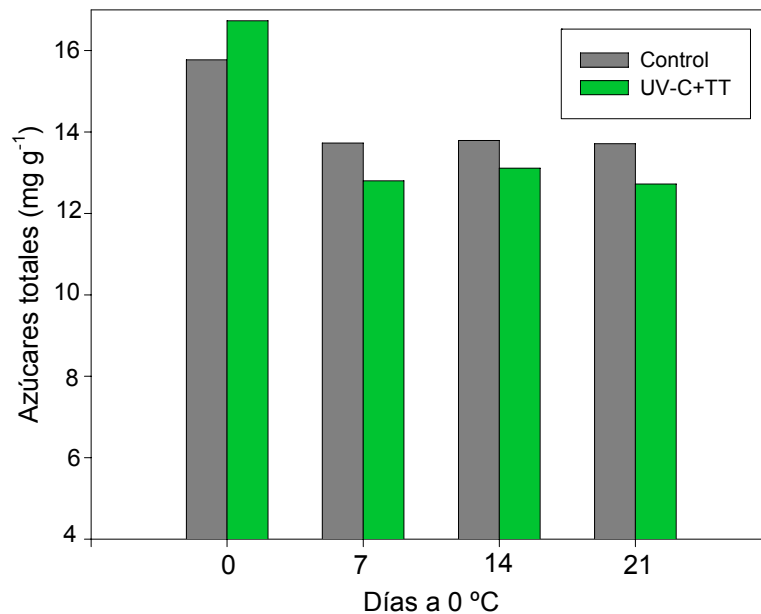


Figura III.26: Efecto del tratamiento combinado con radiación UV-C ( $8 \text{ kJ.m}^{-2}$ ) y aire caliente  $48 \text{ }^{\circ}\text{C}/3 \text{ h}$ , sobre el contenido de azúcares totales en brócoli mínimamente procesado almacenado durante 21 días a  $0 \text{ }^{\circ}\text{C}$ . El asterisco (\*) indica diferencias significativas. ( $\text{LSD}_{\text{azúcares totales}}=1,19$ ).

Apenas finalizado el tratamiento, el contenido de azúcares totales fue levemente superior en los ramilletes tratados pero no se detectaron diferencias significativas entre éstos y los controles (Figura III.26). Después de 7 días de almacenamiento el contenido de azúcares totales disminuyó y se mantuvo sin cambios hasta el día 21 de almacenamiento a 0 °C, tanto para las muestras tratadas como para las muestras controles, no encontrándose diferencias significativas entre éstas.

### **III.3.3 CONCLUSIONES**

- Los ramilletes almacenados a 0 °C que fueron sometidos al tratamiento combinado presentaron un retraso en el amarillamiento, evidenciado por un mayor valor de ángulo Hue y menor valor de L\* y mayor contenido de clorofilas que las muestras controles.
- Las muestras tratadas presentaron menor pérdida de electrolitos que los respectivos controles durante el almacenamiento a 0 °C, lo que podría indicar el menor daño en los tejidos.
- Los resultados obtenidos en este trabajo indican que el tratamiento combinado UV-C (8kJ.m<sup>-2</sup>) más el tratamiento térmico con aire caliente (48 °C, 3 horas) mejora la calidad postcosecha de brócoli mínimamente procesado almacenado a 0 °C.

## **CONCLUSIONES GENERALES**

## CONCLUSIONES GENERALES

El brócoli es una hortaliza que presenta una senescencia postcosecha acelerada, que se agrava en el caso que el material sufra un procesamiento mínimo. La senescencia y otros desórdenes que ocurren durante la postcosecha conducen a importantes pérdidas que en general han tratado de ser controladas mediante el uso de agroquímicos. Sin embargo, actualmente la utilización de estos compuestos está siendo cuestionado debido a los riesgos para la salud humana, la contaminación del medio ambiente y el desarrollo de resistencia de los patógenos. Una tecnología alternativa, utilizada desde hace tiempo para controlar las pérdidas postcosecha ha sido el almacenamiento refrigerado. Esta tecnología por si sola no es suficiente para evitar el deterioro, por lo que se han estudiado nuevas tecnologías amigables para el medio ambiente y la salud humana como complemento de la refrigeración. Estas tecnologías son la radiación ultravioleta C (UV-C) y los tratamientos térmicos de alta temperatura

Precisamente, durante la realización del presente trabajo de tesis doctoral se analiza el efecto de tratamientos con radiación UV-C ( $8 \text{ kJ.m}^{-2}$ ) y aire caliente ( $48 \text{ }^\circ\text{C}$ , 3 horas) sobre la calidad y vida postcosecha de brócoli mínimamente procesado, almacenado en refrigeración o a  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ .

La aplicación de radiación UV-C en una dosis de  $8 \text{ kJ.m}^{-2}$  en brócoli mínimamente procesado permite retrasar la pérdida de color y degradación de clorofilas durante el almacenamiento refrigerado. Asimismo, el tratamiento conduce a una menor pérdida de electrolitos y velocidad de producción de  $\text{CO}_2$ , sugiriendo un retraso en el daño tisular que acompaña a la senescencia. Este retraso de la senescencia permite mantener el producto con mejor calidad durante este período como pudo observarse a través de la apariencia general. Sin embargo, este no fue el único efecto benéfico del tratamiento observado. La dosis de radiación UV-C aplicada permite aumentar los niveles de antioxidantes y disminuir el desarrollo de microorganismos lo que conlleva a mejorar el producto desde el punto de vista nutricional y sanitario.

Al igual que el tratamiento con UV-C, la aplicación de un tratamiento térmico con aire caliente a  $48 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 3 horas, en brócoli mínimamente procesado, también permite retrasar el amarilleamiento de las inflorescencias. Este

tratamiento causa asimismo un retraso en la degradación de clorofilas y en otros síntomas de senescencia tales como la pérdida de proteínas y azúcares. Finalmente, el tratamiento permite mantener por más tiempo la integridad de membranas, indicada por una menor pérdida de electrolitos. A diferencia del tratamiento con UV-C, el tratamiento térmico disminuye el contenido de fenoles y la capacidad antioxidante al inicio y a los 14 días, pero recuperándose hacia el final del almacenamiento.

Dado que la aplicación de ambos tratamientos provocó un retardo en la pérdida de calidad respecto a los controles, se decidió probar si la aplicación conjunta de ambos tratamientos producía mejores resultados que la aplicación de cada uno de ellos por separado. Para ello se decidió aplicar el tratamiento combinado de radiación UV-C y térmico. Se ensayaron diversas combinaciones de dosis de UV-C y temperaturas de tratamiento, seleccionándose la combinación UV-C de  $8 \text{ kJ.m}^{-2}$  más aire caliente a  $48 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 3 horas ya que ésta provocó la mejor retención de calidad y color superficial. Este tratamiento combinado contribuye a una mejor conservación de la calidad organoléptica de brócoli mínimamente procesado durante el almacenamiento a  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ . Esta combinación mantiene el color verde de los tejidos por más tiempo y retrasa la degradación de clorofila. Asimismo, el tratamiento combinado conserva el contenido de proteínas y no afecta la reducción del contenido de azúcares totales.

Los resultados mostraron que el tratamiento combinado afectaría también al sistema antioxidante. El mismo induciría el sistema de defensa antioxidante no enzimático, y contribuiría a una mejor calidad nutricional ya que mantiene más altos los niveles de compuestos fenólicos, que se correlaciona con un aumento en la actividad PAL. Este hecho, agregado a una menor pérdida en el contenido de ascórbico correlacionaría también con una superior capacidad antioxidante en las muestras tratadas. El tratamiento también podría ayudar a combatir la producción de EROs generada durante la senescencia postcosecha de brócoli mínimamente procesado a través de una inducción en la actividad SOD. En las muestras tratadas es probable que se acumule menos  $\text{H}_2\text{O}_2$  y por eso las actividades CAT y APX fueran menores inicialmente y que recién aumenten hacia el final del almacenamiento.

El efecto benéfico del tratamiento combinado se observó también en los ensayos en los que las muestras eran almacenadas a 0 °C, detectándose un retraso en el amarillamiento, evidenciado por un mayor valor de ángulo Hue y menor valor de L\* y mayor contenido de clorofilas. Las muestras tratadas presentaron menor pérdida de electrolitos que los respectivos controles durante al almacenamiento a 0 °C, lo que indicaría menor daño en los tejidos. La apariencia general de las muestras tratadas fue mejor que las controles como se indico en el punto III.3.2.1 sin embargo esta no fue mejor que la obtenida con el tratamiento sólo con UV-C.

Los resultados presentados en esta Tesis doctoral muestran que la aplicación de tratamientos con radiación UV-C; térmicos de alta temperatura y sus combinaciones; complementando o no a la refrigeración podrían ser una estrategia no química beneficiosa para mantener la calidad y extender la vida postcosecha de brócoli mínimamente procesado.



## **BIBLIOGRAFÍA**

**BIBLIOGRAFÍA**

Able A, Wong L S, Prasad A y O`Hare T J. 2005. The physiology of senescence in detached pak choy leaves (*Brassica rapa* var. *chinensis*) during storage at different temperatures. *Postharvest Biology and Technology* 35, 271-278.

Adams D O y Yang S F. 1979. Ethylene biosynthesis: identification of I-aminocyclopropane-1-carboxylic acid as an intermediate in the conversion of methionine to ethylene. *Proc Natl Acad Sci USA* 70, 170-174.

Adrian M, Jeandet P, Douillet Breuill A C, Tesson L y Bessis R. 2000. Stilbene content of mature *Vitis vinifera* berries in response to UV-C elicitation. *J. Agric. Food Chem.* 48, 6103-6105.

Agar I T, Massantini R, Hess-Pierce B y Kader A A. 1999. Postharvest CO<sub>2</sub> and Ethylene Production and Quality Maintenance of Fresh-Cut Kiwifruit Slices *J. Food Sci.* 64, 433-440.

Aharoni N, Philosoph-Hadas S y Barkai-Golan R. 1985. Modified atmospheres to delay senescence and decay of broccoli. In *Controlled Atmospheres for Storage and Transport of Perishable Agricultural Commodities* (S.M. Blankenship, Ed.), pp. 169-177. *Horticulture Report*, Vol. 126, Raleigh, NC.

Allende A y Artés F. 2003. UV-C radiation as a novel technique for keeping quality of fresh processed 'Lollo Rosso' lettuce. *Food Research International*. 36, 739-746.

Allende A y Artés F. 2003. Combined ultraviolet -C and modified atmosphere packaging treatments for reducing microbial growth of fresh processed lettuce. *Lebensm. Wiss. Technol.* 36, 779-786.

Almeselmani M, Deshmukh P S, Sairam R K, Kushwaha S R y Singh T P. 2006. Protective role of antioxidant enzymes under high temperature stress. *Plant Science* 171, 382-388.

Alscher R G, Erturk N y Heath L S. 2002. Role of superoxide dismutase (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *J. Exp. Bot.* 53 (372), 1331-1341.

Andrade Cuví M J. 2008. “Relación entre la capacidad antioxidante y el desarrollo del daño por frío en pimientos. Efecto de la radiación UV-C.” Tesis de Magíster en Tecnología e Higiene de Alimentos. Universidad Nacional de La Plata Facultad de Ciencias Exactas.

Antunes M D C y Sfakiotakis E M. 2000. Effect of high temperature stress on ethylene biosynthesis, respiration and ripening of ‘Hayward’ kiwifruit. *Postharvest Biology and Technology* 20, 251–259.

Armstrong J, Hu B y Brown S. 1995. Single-temperature forced hot-air quarantine treatment to control fruit flies (Diptera: Tephritidae) in papaya. *J. Econ. Entomol.* 88, 678-682.

Asada K. 1994. Production and action of active oxygen species in photosynthetic. Tissues. In: Foyer C, Mullineaux PM (eds), Causes of photooxidative stress and amelioration of defense systems in plants, pp 77-100 CRC Press, Boca Ratón, London.

Barka E A.2001. Protective enzymes against reactive oxygen species during ripening of tomato (*Lycopersicon esculentum*) fruits in response to low amounts of UV-C. *Aust. J. Plant Physiol.* 28, 785–791.

Barrett D M, García E L, Russell G F, Ramirez E y Shirazi A. 2000. Blanch time and cultivar effects on quality of frozen and stored corn and brócoli. *Journal of food science.* 65 (3).

Beirão-da-Costa S, Steiner A, Correia L, Empis J y Moldão-Martins M. 2006. Effects of maturity stage and mild heat treatments on quality of minimally processed kiwifruit. *Journal of Food Engineering,* 76, 616-625.

Bieza K y Lois R. 2001. An Arabidopsis mutant tolerant to lethal ultraviolet-B levels shows constitutively elevated accumulation of flavonoids and other phenolics. *Plant Physiol* 126, 1105-1115.

- Boveris A D, Galatro A, Sambrotta L, Ricco R, Gurni A A y Puntarulo S. 2001. Antioxidant capacity of a 3-deoxyanthocyanidin from soybean. *Phytochemistry* 58, 1097–1105.
- Bradford M M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- Brand Williams W, Cuvelier M E y Berset C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm. Wiss. Technol.* 28, 25-30.
- Bridge M A y Klarman W L. 1973. Soybean phytoalexin hydroxyphaseollin induced by ultraviolet irradiation. *Phytopathology* 63, 606-609.
- Brown J E, Lu T Y, Stevens C, Khan VA, Lu J Y, Wilson C L, Collins D J, Wilson M A, Igwegbe EC K, Chalutz E y Droby S. 2001. The effect of low dose ultraviolet light-C seed treatment on induce resistance in cabbage to black rot (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) *Crop protection* 20, 873-883.
- Buchanan-Wollaston V. 1997. Review. The molecular biology of leaf senescence. *Journal of Experimental Botany*. 48 (307), 81-199.
- Buchanan-Wollaston V, Earl S, Harrison E, Mathas E, Navabdour S, Page T y Pink D. 2003. The molecular analysis of leaf senescence - a genomics approach. *Plant Biotechnology Journal* 1, 3-22.
- Cantwell M y Suslow T. 1997. Recommendations for Maintaining Postharvest Quality Department of Plant Sciences, University of California, Davis.
- Cantwell M I, Kang J y Hong G. 2003. Heat treatments control sprouting and rooting of garlic cloves. *Postharvest Biology and Technology*, 30, 57-65.
- Chisari M, Barbagallo N R y Spagna G. 2007. Characterization of Polyphenol Oxidase and Peroxidase and Influence on Browning of Cold Stored Strawberry Fruit, *J. Agric. Food Chem.*, 55, 3469-3476.

---

Civello P M, Martínez G A, Chaves A R y Añon M C. 1997. Heat treatments delay ripening and postharvest decay of strawberry fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 4589-4594.

Civello P M, Vicente A R y Martínez G A. 2007. UV-C technology to control postharvest diseases of fruits and vegetables. *Transworld Research Network*

Costa H, Gallego S M y Tomaro ML. 2002. Effect of UV-B radiation on antioxidant defense system in sunflower cotyledons. *Plant Science* 162, 939-945.

Costa M L, Civello P M, Chaves A R y Martínez G A. 2004. Effect of ethephon and 6-benzylaminopurine on chlorophyll degrading enzymes and a peroxidase-linked chlorophyll bleaching during post-harvest senescence of broccoli (*Brassica oleracea* L.) at 20 °C.

Costa M L, Civello P M, Chaves A R y Martínez G A. 2005. Effect of hot air treatments on senescence and quality parameters of harvested broccoli (*brassica oleracea* L. var *italica*) heads. *J Sci. Food Agric.* 85, 1154-1160.

Costa L, Vicente A R, Civello P M, Chaves A R y Martínez G A. 2006. UV-C treatment delays postharvest senescence in broccoli florets. *Postharv. Biol. Technology* 39(2), 204-210.

Dal Bó E, Alippi A y Ronco L. 1995. Principales enfermedades de las crucíferas. *Boletín Hortícola*, Año 3, N° 8, 10-13.

Dangl J L, Dietrich R A y Thomas H. 2000. Senescence and Programmed Cell Death. *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*, Buchanan B, Gruissem B, Jones R, Eds. Rockville, Maryland. 1044-1100.

Das S, Tyagi A K y Kaur H. 2000. Cancer modulation by glucosinolates: A review. *Current Science*, 79, NO. 12, 25.

Davey M W, Van Montagu M, Inzé D, Sanmartin M, Kanellis A, Smirnoff N, I JJ Benzie, Strain J J, Favell D y Fletcher J. 2000. Review. Plant L-ascorbic acid: chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing. *J Sci Food Agric*, 80, 825-860.

Dhallelwin G, Schirra M, Manueddu E, Piga A y Ben-Yehoshua S. 1999. Scoparone and scopoletin accumulation and ultraviolet-C induced resistance to postharvest decay in oranges as influenced by harvest date. *J. Am. Soc. Hortic. Sci*, 124, 702-707.

Dhallelwin G, Schirra M, Pala M y Ben-Yehoshua S. 2000. Ultraviolet C irradiation at 0.5 kJ. M<sup>-2</sup> reduces decay without causing damage or affecting postharvest quality of star ruby grapefruit (*C. paradisi* Macf.). *J. Agric. Food Chem*, 48, 4571-4575.

Díaz-Cinco M E, Acedo-Félix E, y García-Galaz A. 2005. Capítulo 10. Principales microorganismos patógenos y de deterioro. Nuevas tecnologías de conservación de productos vegetales frescos cortados. Editores: González-Aguilar G, Gardea A, Cuamea-Navarro F.

Dong H, Jiang Y, Wang Y, Liu R y Guan H. 2004. Effects of hot water immersion on storage quality of fresh broccoli heads. *Food Technol. Biotechnol.* 42 (2), 135-139.

Downs C G, Somerfield S D y Davey M C. 1997. Cytokinin treatment delays senescence but not sucrose loss in harvested broccoli. *Postharvest Biol. Technol.* 11, 93-100.

Du Z y Bramlage W J. 1995. Peroxidative activity of apple peel in relation to development of poststorage disorders. *HortScience* 30, 205-209.

Erkan M, Wang C Y y Krizek D T. 2001. UV-C irradiation reduces microbial populations and deterioration in *Cucurbita pepo* fruit tissue. *Environ. Exp. Bot.* 45, 1-9.

Fallik E, Klein, J D, Grinberg S, Lomaniec E, Lurie S y Lalazar A. 1993. Effect of postharvest heat treatment of tomatoes on fruit ripening and decay caused by *Botrytis cinerea*. *Plant Dis.* 77, 985-988.

Fallik E, Grinberg, S, Gambourg M, Klein J D y Lurie S. 1996. Prestorage heat treatment reduces pathogenicity of *Penicillium expansum* in apple fruit. *Plant Pathol.* 45, 92-97.

Feller U y Fischer A. 1994. Nitrogen metabolism in senescing leaves. *Crit. Rev. Plant Sci.* 13, 241-273.

Feller U. 2004. Capítulo 7. Proteolysis. *Plant Cell Death Processes*. Editado por Larry Noodén.

Fennema. 2000. Química de los Alimentos, 2da. Edición, Zaragoza España

Finger F, Endres L, Mosquim P y Puiatti M. 1999. Physiological changes during postharvest senescence of broccoli. *Pesq Agropec Bras* 34, 1565-1569.

Flurkey W H, y Jen J J. 1978. Peroxidase and polyphenoloxidase activities in developing peaches. *Journal of Food Science* 43, 1826-1828 1831.

Forney C F. 1995. Hot water dips extend the shelf life of fresh broccoli. *Hortscience*, 30 (5), 1054-1057.

Funamoto Y, Yamauchi N, Shigenaga T y Shigyo M. 2002. Effects of heat treatment on chlorophyll degrading enzymes in stored broccoli (*Brassica oleracea* L.). *Postharvest Biology and Technology*, 24, 163-170.

Gan S y Amasino R M. 1997. Making sense of senescence. *Plant Physiol.* 113, 313 – 319.

Gan S y Amasino R M. 1995. Inhibition of leaf senescence by autoregulated production of cytokinin. *Science* 270, 1966-7.

Ghaouth A E, Wilson C L y Callahan A M. 2003. Induction of Chitinase, 1,3-Glucanase, and Phenylalanine Ammonia Lyase in Peach Fruit by UV-C Treatment. *Phytopathology*, 93 3, 349.

Giannopolitis C N y Ries S K. 1977. Superoxide dismutase I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiol.* 59, 309–314.

González-Aguilar G A, Wang C Y y Buta J G. 2004. UV-C irradiation reduces breakdown and chilling injury of peaches during cold storage. *J Sci Food Agric*, 84 415-422.

González-Aguilar G A, Villegas-Ochoa M A, Martínez-Tellez M A, Gardea A A y Ayala-Zavala J F. 2007 (a). Improving antioxidant capacity of fresh-cut mangoes treated with UV-C. *Journal of Food Science*, 72(3).

González-Aguilar G A, Zavaleta-Gatica R y Tiznado-Hernández M E. 2007 (b). Improving postharvest quality of mango 'Haden' by UV-C treatment. *Postharvest Biology and Technology* 45, 108–116.

Grace S C. 2005. Capítulo 6. Phenolics as antioxidants. Antioxidants and reactive oxygen species in plants. Editado por Smirnoff N. Blackwell Publishing.

Hamilton A J, Lycett G W y Grierson D. 1990. Antisense gene that inhibits synthesis of the hormone ethylene in transgenic plants. *Nature* 346, 284-7.

Hensel L L, Grbic V, Baumgarten D A y Bleecker A B. 1993. Developmental and age-related processes that influence the longevity and senescence of photosynthetic tissues in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 5, 553 – 564.

Hong G, Peiser G y Cantwell M I. 2000. Use of controlled atmospheres and heat treatment to maintain quality of intact and minimally processed green onions. *Postharvest Biol. Technol.* 20, 53–61.



---

Izumi H y Watada A. 1995. Calcium treatments to maintain quality of zucchini squash slices. *J. Food Science* 60, 789-793.

Jacob-Wilk D, Holland D, Goldschmidt E E, Riov J y Eyal Y. 1999. Chlorophyll breakdown by chlorophyllase: isolation and functional expression of the *Chlase1* gene from ethylene-treated *Citrus* fruit and its regulation during development. *Plant J.* 20, 653-661.

Jang I C, Park S Y, Kim K Y, Kwon S Y, Kim J G y Kwak S S. 2004. Differential expression of 10 sweetpotato peroxidase genes in response to bacterial pathogen, *Pectobacterium chrysanthemi*, *Plant Physiology and Biochemistry* 42 451-455.

John I, Drake R, Farrell A, Cooper W, Lee P, Horton P y Grierson D. 1995. Delayed leaf senescence in ethylene deficient ACC-oxidase antisense tomato plants-molecular and physiological analysis. *The Plant Journal* 7(3), 483-90.

Jones M L. 2004. Capítulo 4. Changes in Gene Expression during Senescence. *Plant Cell Death Processes*. Editado por Larry Noodén.

Jones R B, Faragher J D y Winkler S. 2006. A review of the influence of postharvest treatments on quality and glucosinolate content in broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) heads. *Postharvest Biol. Technol.* 41, 1-8.

Kampfenkel K, Montagu M V e Inzé D. 1995. Extraction and determination of ascorbate and dehydroascorbate from plant tissue. *Analytical Biochemistry.* 225, 165-167.

Keck A S y Finley J W. 2004. Cruciferous Vegetables: Cancer Protective Mechanisms of Glucosinolate Hydrolysis Products and Selenium DOI: 10.1177/1534735403261831. *Integrative cancer therapies* 3(1).

Kim D M, Smith N L y Lee C Y. 1993. Quality of minimally processed apple slices from selected cultivars. *J Food Science* 58, 1115-1175.

- 
- King G A, y Morris S C. 1994. Early compositional changes during postharvest senescence of broccoli. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 119, 1000-1005.
- Klein J D y Lurie S, 1991. Postharvest heat treatment and fruit quality. *Postharv.News Info.* 2, 15-19.
- Klein J D y Lurie S. 1992. Prestorage heating of apple fruit for enhanced postharvest quality: interaction of time and temperature. *HortScience* 27, 326-328.
- Klein J D, Conway W S, Whitaker B D y Sams C E. 1997. *Botrytis cinerea* decay in apples is inhibited by postharvest heat and calcium treatments. *J. Am. Soc. Hort. Sci.*122, 91-94.
- Koukounaras A, Diamantidis G y Sfakiotakis E. 2008. The effect of heat treatment on quality retention of fresh-cut peach. *Postharvest Biology and Technology*, 48, 30-36.
- Lamikanra O, Richard O A y Parker A. 2002. Ultraviolet induced stress response in fresh cut cantaloupe. *Phytochemistry*, 60, 27-32.
- Lamikanra O y Richard O A. 2002. Effect of storage on some volatile aroma compounds in fresh-cut cantaloupe melón. *J.Agr.Food.Chem* 50(14), 4043-4047.
- Lanahan M B, Yen H-C, Giovannoni J J y Klee H J. 1994. The *Never Ripe* mutation blocks ethylene perception in tomato. *The Plant Cell* 6, 521-30.
- Langcake R y Pryce R J. 1977. The production of resveratrol and viniferins by grapevines in response to ultraviolet irradiation. *Phytochemistry*, 18, 1025-1027.
- Lichtenthaler H K. 1987. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods Enzymol.* 148, 350-382.

Loaiza-Velarde J G, Tomás-Barberá F A y Saltveit M E. 1997. Effect of intensity and duration of heat-shock treatments on wound-induced phenolic metabolism in iceberg lettuce. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 122, 873-877.

López-Rubira V, Conesa A, Allende A y Artés F. 2005. Shelf life and overall quality of minimally processed pomegranate arils modified atmosphere packaged and treated with UV-C. *Postharvest Biol. Technol.* 37, 174-185.

Lowry O H, Rosebrought N J, Farr A L y Randall R. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265-275.

Lu S. 2007. Effect of packaging on shelf-life of minimally processed Bok Choy (*Brassica chinensis* L.). *Lebensmittel- Wissenschaft und Technologie*, 40, 460-464.

Luckey T D. 1980. *Hormesis with Ionizing Radiation*. CRC Press, Boca Raton, FL.

Lurie S y Klein J D. 1990. Heat treatment of ripening apples: differential effects on physiology and biochemistry. *Physiol.Plant.* 78, 181-186.

Lurie S y Klein J D. 1991. Acquisition of low temperature tolerance in tomatoes by exposure to high temperature stress. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 116,1007-1012.

Lurie S, Handros A, Fallek E y Shapira R. 1996. Reversible inhibition of tomato fruit gene expression at high temperature. *Plant Physiol.* 110, 1207-1214.

Lurie S. 1998. Review:Postharvest heat treatments. *Postharvest Biology and Technology* 14, 257-269.

Mach J M y Greenberg J T .2004. Capítulo 13. Free Radicals and Oxidative Stress. *Plant Cell Death Processes*. Editado por Larry Noodén.

- Maeda Y, Kurata H, Adachi M y Shimokawa K. 1998. Chlorophyll catabolism in ethylene-treated *Citrus unshiu* fruits. *J Jap. Soc. Hort. Sci.* 67, 497-502.
- Maharaj R, Arul J y Nadeau P. 1999. Effect of photochemical treatment in the preservation of fresh tomato (*Lycopersicon esculentum* cv. Capello) by delaying senescence. *Postharv Biol Technol* 15, 13-23.
- Makhlouf J, Castaigne F, Azul J, Willemot C y Gosselin A. 1989. Long-term storage of broccoli under controlled atmosphere. *HortScience*, 24, 322-328.
- Martín-Belloso O y Rojas-Graü M A. 2005. Capítulo 5. Factores que afectan la calidad. Nuevas tecnologías de conservación de productos vegetales frescos cortados. Editores: González-Aguilar G, Gardea A, Cuamea-Navarro F.
- Martínez G y Civello P. 2008. Effect of heat treatments on gene expression and enzyme activities associated to cell wall degradation in strawberry fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 49, 38-45.
- Masih L, Roginsky H, Premier R, Tomkins B y Ajlouni S. 2002. Soluble protein content in minimally processed vegetables during storage. *Food Research International* 35, 697-702.
- Matile P, Hörtensteiner S y Thomas H. 1999. Chlorophyll degradation. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol.* 50, 67-95.
- Mercier J, Roussel D, Charles M T y Arul J. 2000. Systemic and local responses associated with UV- and pathogen-induced resistance to *Botrytis cinerea* in stored carrot. *Phytopathology* 90, 981-986.
- Mir N y Beaudry R M. 2004, Modified Atmosphere Packaging In: The commercial storage of fruits, vegetables, and florist and nursery stocks. Agriculture Handbook Number 66. USDA, ARS. In: <http://usna.usda.gov/hb66/contents.html>.

Mirdehghan S H, Rahemic M, Martínez-Romero D, Guillén F, Valverde J M, Zapata P J, Serrano M y Valero D. 2007. Reduction of pomegranate chilling injury during storage after heat treatment: Role of polyamines. *Postharvest Biology and Technology* 44, 19–25.

Mittler R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* Vol.7.9.

Nakano Y y Asada K. 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and Cell Physiology* 22, 867–880.

Nelson N. 1944. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J Biol Chem* 153, 375–380.

Nigro F, Ippolito A y Lima G. 1998. Use of UV-C to reduce storage rot of table grape. *Postharvest Biol. Technol.* 13, 171–181.

Nishikawa F, Kato M, Hyodo H, Ikoma Y, Sugiura M y Yano M. 2003. Ascorbate metabolism in harvested broccoli. *J Exp Bot* 54, 2439–2448.

Odriozola-Serrano I, Hernández-Jover T y Martín-Belloso O. 2007. Comparative evaluation of UV-HPLC methods and reducing agents to determine vitamin C in fruits Analytical, Nutritional and Clinical Methods. *Food Chemistry* 105 1151–1158.

Page T, Griffiths G y Buchanan-Wollaston V. 2001. Molecular and biochemical characterization of postharvest senescence in broccoli. *Plant Physiol.* 125, 718–727.

Pan J, Vicente A, Martínez G, Chaves A y Civello M. 2004. Combined use of UV-C irradiation and heat treatment to improve postharvest life of strawberry fruit. *J. Sci. Food Agric.* 84, 1831–1838.

- Panchuk I I, Volkov R A y Schöffl F. 2002. Heat stress- and heat shock transcription factor- dependent expression and activity of ascorbate peroxidase in arabidopsis. *Plant Physiology* 129, 838–853.
- Paradis C, Castaigne F, Desprosierst T y Willemot C. 1995. Evolution des teneurs en vitamine C, B-carotène et chlorophylle du brocoli découpé et entier au cours d'un entreposage à l'air .*Sciences des aliments* 15, 113-123.
- Park K Y, Drory A y Woodson W R. 1992. Molecular cloning of an 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase from senescing carnation flower petals. *Plant Molecular Biology* 18, 377-86.
- Perkins-Veazie P, Collins JK y Howard L. 2008. Blueberry fruit response to postharvest application of ultraviolet radiation. *Postharvest Biology and Technology* 47, 280–285.
- Pogson B J, Downs C G y Davies K M. 1995. Differential expression of two 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase genes in broccoli after harvest. *Plant Physiology* 108, 651-7.
- Pogson B J y Morris S C. 1997. Consequences of cool storage of broccoli on physiological and biochemical changes and subsequent senescence at 20 °C. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 122, 553–558.
- Pontier D, Del Pozo O y Lam E. 2004. Capítulo 3. Cell Death in Plant Disease: Mechanisms and Molecular Markers. *Plant Cell Death Processes*. Editado por Larry Noodén.
- Porat R, Pavoncello D, Peretz J, Ben-Yehoshua S y Lurie S. 2000. Effects of various heat treatments on the induction of cold tolerance and on the postharvest qualities of 'Star Ruby' grapefruit. *Postharvest Biology and Technology* 18, 159–165.

Potters G, De Gara L, Asard H y Horemans N .2002. Ascorbate and glutathione: guardians of the cell cycle, partners in crime? *Plant Physiol. Biochem.* 40 537–548.

Rodríguez-Félix A, Rivera-Domínguez M y González-Aguilar G. 2005. Capítulo 21. Uso de atmósferas controladas y modificadas. Nuevas tecnologías de conservación de productos vegetales frescos cortados. Editores: González-Aguilar G, Gardea A, Cuamea-Navarro F.

Roura S I, Pereyra L y Del Valle C. E. 2008. Phenylalanine ammonia lyase activity in fresh cut lettuce subjected to the combined action of heat mild shocks and chemical additives. *LWT - Food Science and Technology*, 41(5) 919-924.

Saltveit M E. 1997. Physical and physiological changes in minimally processed fruit and vegetables *Phytochemistry of fruit and vegetables* Editorial Oxford University press: London 205-220.

Saltveit M E. 2000. Wound induced changes in phenolic metabolism and tissue browning are altered by heat shock. *Postharvest Biol. Technol.* 21, 61–69.

Saltveit M E. 2005. Influence of heat shocks on the kinetics of chilling-induced ion leakage from tomato pericarp discs. *Postharvest Biology and Technology*, 36, 87-92.

Sánchez-Mata M C, Camara M y Díez-Marqués C. 2003. Extending shelf-life and nutritive value of green beans (*Phaseolus vulgaris* L.), by controlled atmosphere storage: macronutrients. *Food Chemistry* 80 ,309–315.

Sato Y, Murakami T, Funatsuki H, Matsuba S, Saruyama H y Tanida M. 2001. Heat shock-mediated APX gene expression and protection against chilling injury in rice seedlings. *J. Exp. Bot.* 52, 145–151.

Scandalios J G. 2002. The rise of ROS. *Trends in Biochemical Sciences.* 27, 9.

---

Shama G y Alderson P. 2005. UV hormesis in fruits: a concept ripe for commercialisation. *Trends Food Sci. Technol.* 16, 128–136.

Shigenaga T, Yamauchi N, Funamoto Y, Shigyo M. 2005. Effects of heat treatment on an ascorbate-glutathione cycle in stored broccoli (*Brassica oleracea L*) florets. *Postharvest Biology and Technology* 38, 152-159.

Siomos A S, Gerasopoulos D y Tsouvaltzis P. 2005. Prestorage hot water treatments inhibit postharvest anthocyanin synthesis and retain overall quality of white asparagus spears. *Postharvest Biology and Technology* 38, 160–168.

Smirnoff N y Wheeler GL. 2000. Ascórbic acid in plants: Biosynthesis and function. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* 35 (4) 291-314.

Soberón J R, Quiroga E N, Sampietro A R y Vattuone M A. 2005. Reguladores vegetales. [www.fai.unne.edu.ar/biologia/plantas/reguladores](http://www.fai.unne.edu.ar/biologia/plantas/reguladores)

Southgate D A. 1976. Selected methods in determination of food carbohydrates. Applied Science Publishers Ltd. Essex, UK. Pág. 99-144.

Stevens C, Lu J Y, Khan V A, Wilson C L, Kabwe M K y Haung H. 1990. A preliminary study of possible mechanisms of ultraviolet induced resistance to postharvest rots. *Phytopathology* 80, 1019.

Stevens C, Wilson C L, Lu J Y, Khan V A, Chalutze E, Droby S, Kabwe M K, Haung Z, Adeyeye O, Pusey L P, Wisniewski'y M E y West M. 1996. Plant hormesis induced by ultraviolet light-C for controlling postharvest diseases of tree fruits. *Crop Protection* 15 (2) 129-134.

Stevens C, Khan VA, Lu J Y, Wilson C L, Pusey P L, Kabwe M K, Chalutz E y Droby S. 1998. The germicidal and hormetic effects of UVC light on reducing brown rot disease and yeast microflora of peaches. *Crop Protection*. 17, 75–84.



Stevens C, Khan V A, Lu J Y, Wilson C L, Chalutz E y Droby S. 1999. Induced resistance of sweet potato to *Fusarium* root rot by UV-C hormesis. *Crop Protection* 18, 463–470.

Stevens C, Liu J, Khan V A, Lu J Y, Kabwe M K, Wilson C L, Igwegbe E C K, Chalutz E y Droby S. 2004. The effects of low-dose ultraviolet light-C treatment on polygalacturonase activity, delay ripening and *Rhizopus* soft rot development of tomatoes. *Crop Protection* 23, 551–554.

Stoppani M I y Francescangeli N. 2000. El brócoli y su potencial: hortaliza top del tercer milenio. INTA EEA San Pedro.

Suzuki Y, Asoda T, Matsumoto Y, Terai H, Kato M. 2005. Suppression of the expression of genes encoding ethylene biosynthetic enzymes in harvested broccoli with high temperature treatment. *Postharvest Biology and Technology* 36 (2005) 265–271.

Taiz L y Zeiger E. 2006. Capítulo 13. Secondary metabolites and plant defense. *Plant Physiology*, Fourth Edition. Editorial Sinauer.

Terai H, Kanou M, Mizuno M y Tsuchida H. 1999. Inhibition of yellowing and ethylene production in broccoli florets following high temperature treatment with hot air. *Food Preserv. Sci.* 25, 221–227.

Thompson J E, Froese C D, Madey E, Smith M D y Hong Y. 1998. Lipid metabolism during plant senescence. *Prog. Lipid Res.* 37, 119 – 141.

Thongsook T y Barrett D M. 2005. Purification and partial characterization of broccoli (*Brassica oleracea* Var. *Italica*) peroxidases. *J. Agric. Food Chem.* 53, 3206-3214.

Tian M S, Downs C G, Lill R E y King G A. 1994. A role for ethylene in the yellowing of broccoli. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 119, 276–281.

Tian M S, Woolf A B, Bowen J H y Ferguson I B. 1996. Changes in color and chlorophyll fluorescence of broccoli florets following hot water treatment. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 121, 310– 313.

Tian M S, Talebul I, Stevenson D G e Irving DE. 1997. Color, ethylene production, respiration, and compositional changes in broccoli dipped in hot water. *J Am Soc Hort Sci* 122, 112–116.

Toivonen P M A y Sweeney M. 1998. Differences in chlorophyll loss at 13 °C for two broccoli (*Brassica oleracea* L.) cultivars associated with antioxidant enzyme activities. *J. Agric. Food Chem.* 46, 20-24.

Tsouvaltzis P, Siomos A S y Gerasopoulos D. 2006. Effect of hot water treatment on leaf extension growth, fresh weight loss and color of stored minimally processed leeks. *Postharvest Biol. Technol.* 39, 56–60.

Varoquaux P, Lecendre I, Varoquaux F y Souty M.1990. Change in firmness of kiwi fruit after slicing. *Science aliment.* 10, 127-139.

Varoquaux P y Wiley R C. 1994. Capítulo 6. Minimally processed refrigerated fruits & vegetables, Robert C Wiley (Ed), Chapman & Hall Inc, London, Great Britain, pp- 226.

Vecchio C. 1995. Manejo del Cultivo de Brócoli. *Boletín Hortícola*, Año 3, N° 8: 14-16.

Vicente A R, Martínez G A, Chaves A R y Civello P M.2002.Quality of heat-treated strawberry fruit during refrigerated storage. *Postharvest Biology and Technology* 25, 59–71.

Vicente A R, Costa M L, Martínez G A, Chaves A R y Civello P M. 2005 (a). Effect of heat treatments on cell wall degradation and softening in strawberry fruit. *Postharvest Biology and Technology* 38, 213–222.

Vicente A R, Pineda C, Lemoine L, Civello P M, Martínez G A y Chaves A R. 2005 (b). UV-C treatments reduce decay, keep quality and alleviate chilling injury in pepper. *Postharv Biol Technol* 35, 69–78.

Vicente A R, Martínez G A, Chaves A R y Civello P M. 2006. Effect of heat treatment on strawberry fruit damage and oxidative metabolism during storage. *Postharvest Biology and Technology*, 40, 116-122.

Vicentini F y Matile P. 1993. Gerontosomes, a multi-functional type of peroxisome in senescent leaves. *Journal of Plant Physiology* 142, 50-6.

Vierling E. 1991. The roles of heat shock proteins in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42, 579–620.

Viña S Z, López Osornio M M y Chaves A R. 2007. Quality changes in fresh-cut celery as affected by heat treatment and storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87 (7), 1400-1407.

Viña S Z y Chaves A R. 2007. Effect of heat treatment and refrigerated storage on antioxidant properties of pre-cut celery (*Apium graveolens* L.). *Int. J. Food Sci. Technol.*, doi:10.1111/j.1365-2621.2007.01380.x, in press.

Wanner L, Keller F y Matile P. 1991. Metabolism of radiolabelled galactolipids in senescent barley leaves. *Plant Science* 78, 199-296.

Watada A E, Able K y Yamauchi N. 1990. Physiological activities of partially processed fruits and vegetables. *Food Technology* 44(5),116-122.

Watada A E, Ko N P y Minott D A. 1996. Factors affecting quality of fresh-cut horticultural products. *Postharvest Biology and Technology* 9, 115-125.

Wills R B H, Wimalasiri P y Greenfield H. 1984. Dehydroascorbic acid levels in fresh fruit and vegetables in relation to total vitamin C activity. *J. Agric. Food Chem.* 32, pp. 836–838.

Yamauchi A F y Watada A E. 1991. Regulated chlorophyll degradation in spinach leaves during storage. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 116, 58–62.

Yamauchi N, Harada K y Watada A E. 1997. *In vitro* chlorophyll degradation in stored broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *Italica* Plen.) florets. *Postharv Biol Technol* 12, 239–245.

Zavaleta-Mancera H A, Thomas B J, Thomas H y Scott I M. 1999. Regreening of senescent *Nicotiana* leaves. II. Redifferentiation of plastids. *J. Exp. Bot.* 50, 1683 – 1689.

Zeiger E y Taiz L. 2004. Capítulo 16. Growth and development. *Plant Physiology*, segunda edición. Editorial Sinauer, pp 661.

Zhuang H, Hildebrand D F y Barth M M. 1997. Temperature influenced lipid peroxidation and deterioration in broccoli buds during postharvest storage. *Postharvest Biol Technol* 10, 49-58.

Zimmermann P y Zentgraf U. 2005. The correlation between oxidative stress and leaf senescence during plant development. *Cellular & molecular biology letters*. V 10, 515-534.

#### Páginas de Internet

[www.abcagro.com/hortalizas/brocoli2.asp](http://www.abcagro.com/hortalizas/brocoli2.asp)

[www.angelfire.com/ia2/ingenieriaagricola/brocoli.htm](http://www.angelfire.com/ia2/ingenieriaagricola/brocoli.htm), anónimo, 2004

[www.es.wikipedia.org/wiki/Brassica\\_oleracea\\_italica](http://www.es.wikipedia.org/wiki/Brassica_oleracea_italica)

[www.infoagro.com](http://www.infoagro.com)

[www.infoagro.com/hortalizas/broculi.htm](http://www.infoagro.com/hortalizas/broculi.htm)

[www.inta.gov.ar/sanpedro/info/doc/hor/nf\\_011.htm](http://www.inta.gov.ar/sanpedro/info/doc/hor/nf_011.htm)

[www.inta.gov.ar/actual/ant/2007/may08bis.htm](http://www.inta.gov.ar/actual/ant/2007/may08bis.htm)

[www.itescam.edu.mx/principal/sylabus/fpdb/recursos/r2205.DOC](http://www.itescam.edu.mx/principal/sylabus/fpdb/recursos/r2205.DOC)

[www.postharvest.ucdavis.edu/Produce/ProduceFacts/Espanol/Brocoli/html](http://www.postharvest.ucdavis.edu/Produce/ProduceFacts/Espanol/Brocoli/html)

[www.puc.cl/sw\\_educ/hort0498/HTML/p024.html](http://www.puc.cl/sw_educ/hort0498/HTML/p024.html)