



Universidad
Politécnica
de Cartagena



**PROGRAMA DE DOCTORADO EN TÉCNICAS AVANZADAS EN INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO
AGRARIO Y ALIMENTARIO**

TESIS DOCTORAL

**ALTERNATIVAS DE CONSERVACIÓN Y PROCESAMIENTO DE BRÓCOLI PARA LA
PRESERVACIÓN DE COMPONENTES BIOACTIVOS**

Presentada por Erika Paulsen Gómez para optar al
grado de Doctora
por la Universidad Politécnica de Cartagena

Dirigida por:
Dra. Patricia Lema Larrieu

Codirigida por:
Dr. Diego A. Moreno Fernández

Cartagena, 2023

PREFACIO

La presente Tesis Doctoral, titulada: **“Alternativas de conservación y procesamiento de brócoli para la preservación de componentes bioactivos”**, se ha elaborado de acuerdo con la normativa de la UPCT para la presentación de Tesis Doctorales. De acuerdo con esta premisa, esta Tesis Doctoral se compone de las siguientes partes:

- Resumen/Abstract en el que se presenta brevemente la relevancia del trabajo de investigación, los resultados y las conclusiones obtenidas.
- Una introducción en la que se describen antecedentes relevantes y se encuadra la presente Tesis Doctoral.
- Una revisión bibliográfica donde se describe el estado del arte en el área específica donde la presente Tesis Doctoral realiza aporte de conocimiento.
- Los objetivos planteados en la investigación.
- Los materiales y métodos, donde se recoge la metodología y recursos empleados para el desarrollo de los diferentes trabajos experimentales.
- La estrategia de trabajo donde se explica cómo se seleccionaron los factores y niveles evaluados.
- Resultados y discusión (Capítulos del 6 al 8) donde se describen y discuten los resultados obtenidos en cada trabajo experimental, y se presentan conclusiones parciales.
- Las conclusiones finales obtenidas del trabajo realizado.

La presente Tesis Doctoral ha sido realizada gracias a la financiación de los siguientes proyectos de investigación:

- Proyecto Grupos I+D de la Comisión Sectorial de Investigación Científica (UdelaR, Uruguay): “Mejoramiento de procesos en la industria alimentaria: aspectos básicos y tecnológicos”.
- Beca en el marco del Programa EMHE, en su modalidad “doctorado nacional sándwich”, de la Agencia Nacional de Investigación e Innovación. Código de beca: POS_EMHE_2018_1_1007740.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a mi tutora Patricia Lema. Gracias Patricia por tu apoyo y confianza. Por estar siempre pendiente de nosotras, y no me refiero solo impulsando nuestro crecimiento profesional, sino de nuestras necesidades como personas. Gracias por enseñarnos tanto y por formar el grupo de trabajo que somos, del que todas nos sentimos orgullosas y felices de pertenecer.

En segundo lugar, quiero agradecer a mi cotutor, Diego A. Moreno. Desde el primer momento, Diego no hizo más que abrirme puertas para mi crecimiento profesional, e indirectamente para mi crecimiento personal. Gracias Diego por esta oportunidad, por confiar en mi trabajo, por estar siempre disponible, por compartir tu tiempo y conocimiento, y por hacer del CEBAS mi casa. Me siento sumamente afortunada de haber transitado este camino contigo.

Quiero agradecer a la Dra. Cristina García Viguera (CEBAS-CSIC), de quien también he recibido apoyo. Gracias Cristina por confiar en mi trabajo y por el tiempo compartido, del cual me llevo grandes aprendizajes a nivel profesional y personal.

Gracias a todo el equipo del CEBAS por haberme hecho una más desde el primer día. Los días de trabajo allí fueron días felices. Un inmenso gracias a Ángel, Paco y sus familias, que son amigos queridos que me dejó este camino. Gracias a todos por ser mi familia murciana.

Gracias al Dr. Pablo Fernández Escámez, mi tutor académico por la UPCT, quien estuvo siempre disponible y brindando su apoyo todos estos años. Gracias también al Dr. Domingo Martínez Romero (Universidad Miguel Hernández) y Dra. Paula M. Periago (UPCT), profesores que me han abierto las puertas de sus laboratorios y confiado en mi trabajo.

Gracias a Celi, por su buena compañía durante las estancias, y enseñarme las bellezas y tradiciones de mi querida Murcia.

Gracias a mi grupo de investigación TAPA por su apoyo intelectual, emocional y por su amistad. Hacen que cada día de trabajo sea un disfrute.

Gracias a todos los compañeros del IIQ por hacer ameno cada día de trabajo. Un agradecimiento especial a aquellos que formaron parte del panel sensorial y a Victoria, por su cooperación y buena voluntad. Han sido de gran ayuda en la realización de estos estudios.

Gracias a la Dra. Analía Rodríguez (Facultad de Química) por el préstamo del colorímetro.

Agradecer a la Comisión Sectorial de Investigación Científica (UdelaR, Uruguay) que financió el proyecto dentro del cual se enmarcaron varios de los estudios de esta Tesis, y a la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) por otorgarme la beca de doctorado que fue clave para mi formación y para el desarrollo de esta Tesis.

Para terminar, estaré eternamente agradecida a todas las personas que hicieron posible este logro a través de su amistad, amor e inmenso apoyo. Gracias por acompañarme siempre, en cada camino que quiera (o que toque) andar.

RESUMEN

En los últimos años la incidencia de enfermedades no transmisibles, como la obesidad, han adquirido grado de pandemia global, así como otras patologías relacionadas como la diabetes tipo 2 o la enfermedad cardiovascular, que también están en aumento en muchos países. Una de las principales causas es la alimentación no equilibrada y pobre en frutas y hortalizas, que se une a un estilo de vida acelerado y sedentario, en el que el tiempo dedicado a la preparación de alimentos es escaso. En este contexto, resulta de interés el desarrollo de productos hortofrutícolas listos para el consumo, que permitan incorporar mayor cantidad de hortalizas a la dieta cotidiana. Las investigaciones del impacto que las tecnologías de procesado y conservación tienen sobre las propiedades nutricionales y bioactivas de los alimentos son cada vez más necesarias.

El brócoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) es una hortaliza versátil y altamente valorada por su importante contenido de fitoquímicos promotores de la salud, como glucosinolatos y ácidos hidróxicinámicos. Sin embargo, el brócoli tiene una vida útil corta, de pocos días, y el contenido de fitoquímicos disminuye drásticamente durante el almacenamiento si no se aplican condiciones adecuadas para su conservación.

El envasado en atmósfera modificada (Modified Atmosphere Packaging - MAP) es una tecnología de conservación ampliamente utilizada en productos hortofrutícolas frescos. La misma consiste en envasar dichos productos en materiales plásticos que actúan como barrera a la difusión de gases, modificando el ambiente gaseoso que rodea al alimento, favoreciendo la extensión de su vida útil. Si bien existen estudios donde se ha evaluado el efecto del MAP en el contenido de compuestos bioactivos del brócoli, los resultados son contradictorios y las condiciones de conservación ensayadas son poco representativas de lo que ocurre en la cadena de suministro. Por otra parte, existe una urgente necesidad por encontrar nuevos envases que garanticen la seguridad y calidad de frutas y hortalizas, pero que, de manera concomitante, reduzcan el impacto medio ambiental.

El objetivo de esta Tesis Doctoral fue estudiar el impacto de diferentes films de envasado y temperaturas de almacenamiento sobre la evolución de parámetros de

calidad (físicoquímicos y organolépticos), compuestos bioactivos (glucosinolatos y ácidos hidroxicinámicos) y vida útil del brócoli mínimamente procesado durante el almacenamiento postcosecha.

Dado que los métodos de cocción tienen un impacto significativo en el perfil y contenido de fitoquímicos, el trabajo se completó con una evaluación de los efectos de metodologías de cocción en la conservación de glucosinolatos y ácidos hidroxicinámicos de floretes de brócoli.

Los resultados pusieron de manifiesto que el MAP y la temperatura de almacenamiento son factores determinantes en la conservación de propiedades del brócoli fresco. Si el producto se mantiene a temperaturas de almacenamiento bajas (entre 2 y 4 °C), modificaciones leves de la atmósfera son suficientes para extender su vida útil y mantener la calidad externa y bioactiva del brócoli. En general, la modificación de la atmósfera tuvo un efecto más significativo cuando las temperaturas de almacenamiento fueron superiores a las recomendadas (>4 °C), concluyendo que el MAP ayuda a mitigar los efectos negativos sobre la calidad provocados por temperaturas de almacenamiento inadecuadas. El envasado en films microperforados permitió extender la vida útil de floretes de brócoli y conservar sus componentes bioactivos en un rango amplio de temperaturas de almacenamiento (2 -12 °C), evitando la generación de anaerobiosis. La selección del nivel de perforación del film resultó un factor relevante para la conservación de compuestos bioactivos y otros parámetros de calidad. El envasado usando bioplásticos (a base de celulosa y de ácido láctico y tereftalato adipato de polibutileno) resultó una alternativa viable para la conservación y comercialización de brócoli, siendo las principales limitantes la pérdida de masa y firmeza del producto.

La utilización de bolsas para microondas resultó un método de cocción eficaz para conservar el potencial saludable del brócoli, ya que mantuvo el contenido total de glucosinolatos y la capacidad antioxidante (DPPH) en comparación con el cocinado sin bolsa (para tiempos de cocción de 5 minutos). La volatilización podría ser el fenómeno predominante en la pérdida de glucosinolatos durante la cocción en microondas.

Palabras clave: *Brassica oleracea* var. *italica*; envasado; atmósfera modificada; bioplásticos; almacenamiento; glucosinolatos; ácidos hidroxicinámicos.

ABSTRACT

In recent years, the incidence of non-communicable diseases, such as obesity, has reached the level of a global pandemic, as well as other related conditions such as type 2 diabetes or cardiovascular disease, which are also on the rise in many countries. One of the main causes is an unbalanced and poor diet lacking in fruits and vegetables, combined with a fast-paced and sedentary lifestyle, where there is little time dedicated to food preparation. In this context, the development of ready-to-eat horticultural products becomes of interest, as they allow for the incorporation of more servings of vegetables into the daily diet. Research on the impact that processing and preservation technologies have on the nutritional and bioactive properties of foods is increasingly necessary.

Broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) is a versatile vegetable highly valued for its significant content of health-promoting phytochemicals, such as glucosinolates and hydroxycinnamic acids. However, broccoli has a short shelf life, lasting only a few days, and the phytochemical content decreases drastically during storage if appropriate measures for preservation are not taken.

Modified Atmosphere Packaging (MAP) is a widely used preservation technology for fresh horticultural products. It involves packaging these products in plastic materials that act as barriers to gas diffusion, thereby modifying the gaseous environment surrounding the food and extending its shelf life. While there are studies evaluating the effect of MAP on the content of bioactive compounds in broccoli, the results are contradictory, and the conservation conditions tested are not fully representative of what occurs in the supply chain. Furthermore, there is an urgent need to find new packaging solutions that ensure the safety and quality of fruits and vegetables while concurrently reducing environmental impact.

The objective of this Doctoral Thesis was to study the impact of different packaging films and storage temperatures on the evolution of quality parameters (physicochemical and organoleptic), bioactive compounds (glucosinolates and hydroxycinnamic acids), and the shelf life of minimally processed broccoli during postharvest storage.

Since cooking methods have a significant impact on the profile and content of phytochemicals, the study was completed with an evaluation of the effects of cooking methodologies on the preservation of glucosinolates and hydroxycinnamic acids in broccoli florets.

The results showed that MAP and storage temperature are crucial factors in preserving the properties of fresh broccoli. If the product is kept at low storage temperatures (between 2 and 4 °C), slight modifications of the atmosphere are sufficient to extend the shelf life and maintain the external and bioactive quality of the broccoli. In general, the modification of atmosphere had a more significant effect when storage temperatures were higher than the recommended ones (>4 °C), concluding that MAP helps to mitigate the negative effects on quality caused by inadequate storage temperatures. The packaging using microperforated films allowed extending the shelf life of and preserving its bioactive components over a broad range of storage temperatures (2 –12 °C), avoiding the generation of anaerobiosis conditions. The selection of the perforation numbers of the film was a relevant factor for the conservation of bioactive compounds and other quality parameters. The packaging using bioplastics (based on cellulose and lactic acid and poly (butylene-adipate-co-terephthalate)) proved to be a viable alternative for the preservation and commercialization of broccoli, the main limitations being the loss of mass and firmness of the product.

The use of microwave bags was an effective cooking method to preserve the health potential of broccoli, as it maintained the total content of glucosinolates, and the antioxidant capacity (DPPH) compared to cooking without bag (for cooking times of 5 minutes). Volatilization could be the predominant phenomenon in the loss of glucosinolates during microwave cooking.

Keywords: *Brassica oleracea* var. *italica*; packaging; modified atmosphere; bioplastics; storage; glucosinolates; hydroxycinnamic acids.

Neologismos y abreviaturas

MAP	envasado en atmósfera modificada
PE	polietileno
PP	polipropileno
BOPP	polipropileno biorientado
LDPE	polietileno de baja densidad
LLDPE	polietileno lineal de baja densidad
OPP	polipropileno orientado
PBAT	tereftalato adipato de polibutileno
PLA	ácido poliláctico
PVC	cloruro de polivinilo
PET	tereftalato de polietileno
OTR	tasa de transferencia al oxígeno
CTR	tasa de transferencia al dióxido de carbono
GSL	glucosinolato (singular o plural)
HCA	ácido hidroxicinámico (singular o plural)
UV	radiación ultravioleta
GIB	glucoiberina
GRA	glucorafanina
HGB	4-hidroxi-glucobrasicina
GB	glucobrasicina
GST	gluconasturtina
MGB	4-metoxi-glucobrasicina
NGB	neoglucobrasicina
SFN	sulforafano
ML	pérdida de masa
WL	pérdida de peso
MW	microondas

ÍNDICE DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. BRÓCOLI	2
1.1.1. <i>Características generales.....</i>	2
1.1.2. <i>Tendencias de producción y consumo.....</i>	3
1.1.3. <i>Indicadores de calidad.....</i>	4
1.1.4. <i>Principales fitoquímicos bioactivos de las crucíferas y efectos conocidos en la salud.....</i>	8
1.2. FISIOLÓGIA POSTCOSECHA.....	17
1.3. ENVASADO EN ATMÓSFERA MODIFICADA.....	21
1.4. FRUTAS Y HORTALIZAS MÍNIMAMENTE PROCESADAS	26
1.4.1. <i>Aspectos generales.....</i>	26
1.4.2. <i>Estado actual y tendencias.....</i>	28
1.4.3. <i>Problemas y necesidades de la industria de alimentos mínimamente procesados.....</i>	29
1.5. ENVASADO DE ALIMENTOS	31
1.5.1. <i>Aspectos generales y materiales para el envasado de alimentos.....</i>	31
1.5.2. <i>Envases multifunción: Aptitud para el cocinado en microondas.....</i>	42
1.6. COCINADO DE ALIMENTOS VEGETALES Y EFECTOS EN LA CALIDAD	44
1.6.1. <i>Aspectos generales.....</i>	44
1.6.2. <i>Uso del horno microondas para el cocinado de hortalizas.....</i>	44
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA Y JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO.....	47
2.1. ENVASADO EN ATMÓSFERA MODIFICADA DE BRÓCOLI Y OTRAS CRUCÍFERAS.....	48
2.2. COCINADO DE BRÓCOLI Y RETENCIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS.....	60
OBJETIVOS.....	62
MATERIALES Y MÉTODOS.....	64
4.1. ENSAYOS DE ENVASADO	65
4.2. MEDIDAS DE TEMPERATURA Y HUMEDAD DENTRO DE LOS ENVASES.....	68
4.3. COMPOSICIÓN GASEOSA DEL ESPACIO CABEZA	68
4.4. PÉRDIDA DE MASA (ML)	68
4.5. TASA RESPIRATORIA	69
4.6. COLOR.....	69
4.7. TEXTURA	70
4.7.1. <i>Dureza del tallo.....</i>	70
4.7.2. <i>Compacidad de la cabeza o del florete.....</i>	70
4.8. EVALUACIÓN SENSORIAL	71
4.9. CALIDAD MICROBIOLÓGICA.....	72
4.10. CONTENIDO DE GLUCOSINOLATOS (GSL) Y ÁCIDOS HIDROXICINÁMICOS (HCA).....	72

4.10.1.	<i>Obtención de extractos.....</i>	72
4.10.2.	<i>Identificación de GSL y HCA.....</i>	73
4.10.3.	<i>Cuantificación de GSL y HCA</i>	73
4.11.	CAPACIDAD ANTIOXIDANTE.....	74
4.11.1.	<i>Obtención de extractos.....</i>	74
4.11.2.	<i>Método ABTS.....</i>	74
4.11.3.	<i>Método DPPH.....</i>	75
4.11.4.	<i>Método ORAC.....</i>	75
4.12.	CONTENIDO DE CLOROFILAS Y CAROTENOIDES	75
4.13.	MINERALES	76
4.14.	ACTIVIDAD MIROSINASA POR HPLC-UV	76
4.14.1.	<i>Selección de la técnica.....</i>	76
4.14.2.	<i>Extracción de mirosinasa endógena</i>	77
4.14.3.	<i>Determinación de actividad mirosinasa</i>	77
4.15.	ENSAYOS DE COCCIÓN	78
4.15.1.	<i>Brócoli procesado domésticamente</i>	78
4.15.2.	<i>Brócoli procesado industrialmente</i>	78
4.16.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS.....	78
4.16.1.	<i>Estudios de envasado.....</i>	78
4.16.2.	<i>Estudios de cocción.....</i>	79
ESTRATEGIA	80	
5.1.	ENSAYOS DE ENVASADO	81
5.1.1.	<i>Selección de temperaturas de almacenamiento</i>	81
5.1.2.	<i>Selección del material de envasado.....</i>	81
5.2.	ENSAYOS DE COCCIÓN.....	84
TEMA 1.	86	
ENVASADO EN ATMÓSFERA MODIFICADA.....	86	
6.1.	EFFECTO DE LA TEMPERATURA DE ALMACENAMIENTO SOBRE LA CALIDAD EXTERNA Y CONTENIDO DE COMPUESTOS BIOACTIVOS DE FLORETES DE BRÓCOLI ENVASADOS EN FILM DE POLIPROPILENO.....	87
6.1.1.	<i>Diseño experimental</i>	87
6.1.2.	<i>Resultados y discusión.....</i>	88
6.1.3.	<i>Conclusiones parciales</i>	109
6.2.	IMPACTO DEL NIVEL DE MICROPERFORACIÓN DEL FILM Y DE LA TEMPERATURA DE ALMACENAMIENTO EN EL CONTENIDO DE FITOQUÍMICOS Y CALIDAD EXTERNA DE FLORETES DE BRÓCOLI	111
6.2.1.	<i>Diseño experimental</i>	111
6.2.2.	<i>Resultados y discusión.....</i>	112
6.2.3.	<i>Conclusiones parciales</i>	127
6.3.	EVALUACIÓN DE FILMS MICROPERFORADOS PARA LA PRESERVACIÓN DE FITOQUÍMICOS Y CALIDAD EXTERNA DE FLORETES DE BRÓCOLI DURANTE EL ALMACENAMIENTO A	

TEMPERATURAS POR ENCIMA DE LAS RECOMENDADAS	129
6.3.1. <i>Diseño experimental</i>	129
6.3.2. <i>Resultados y discusión</i>	130
6.3.3. <i>Conclusiones parciales</i>	151
TEMA 2.	153
USO DE BIOPLÁSTICOS PARA EL ENVASADO DE BRÓCOLI.....	153
7. 1. USO DE UN FILM COMPOSTABLE DE PLA/PBAT COMO ALTERNATIVA ECOLÓGICA PARA EL ENVASADO INDIVIDUAL DE CABEZAS DE BRÓCOLI.....	154
7.1.1. <i>Diseño experimental</i>	154
7.1.2. <i>Resultados y discusión</i>	155
7.1.3. <i>Conclusiones parciales</i>	169
7.1.4. <i>Material suplementario</i>	170
7.2. FILM A BASE DE CELULOSA PARA EL ENVASADO EN ATMÓSFERA MODIFICADA: EFECTO SOBRE EL CONTENIDO DE FITOQUÍMICOS Y CALIDAD EXTERNA DE FLORETES DE BRÓCOLI	171
7.2.1. <i>Diseño experimental</i>	171
7.2.2. <i>Resultados y discusión</i>	172
7.2.3. <i>Conclusiones parciales</i>	184
7.3. FILM DE CELULOSA PERFORADO PARA EL ENVASADO DE FLORETES DE BRÓCOLI: EFECTO DEL INCREMENTO DE LA TEMPERATURA DE ALMACENAMIENTO SOBRE EL CONTENIDO DE FITOQUÍMICOS Y VIDA ÚTIL	185
7.3.1. <i>Diseño experimental</i>	185
7.3.2. <i>Resultados y discusión</i>	186
7.3.3. <i>Conclusiones parciales</i>	211
7.3.4. <i>Material suplementario</i>	213
TEMA 3.	215
COCCIÓN EN HORNO MICROONDAS.....	215
8.1. EFECTO DE LA COCCIÓN EN MICROONDAS CONVENCIONAL VS. EN BOLSAS MICROONDABLES EN EL CONTENIDO DE FITOQUÍMICOS DEL BRÓCOLI.....	216
8.1.1. <i>Caso de estudio: brócoli procesado domésticamente</i>	216
8.1.2. <i>Caso de estudio: brócoli procesado industrialmente</i>	224
8.1.3. <i>Conclusiones parciales</i>	231
8.1.4. <i>Material suplementario</i>	232
CONCLUSIONES FINALES	235
PRODUCCIÓN CIENTÍFICA.....	238
REFERENCIAS	243

CAPÍTULO 1.

Introducción

1.1. Brócoli

1.1.1. Características generales

El brócoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica* Plenck) es una hortaliza que pertenece a la familia de las crucíferas (*Cruciferae*) o brasicáceas (*Brassicaceae*), donde también se encuentran hortalizas como la rúcula, coliflores, col rizada o 'kale', rábanos, nabos, berros, mostazas y coles de Bruselas (Ilahy et al., 2020). Originalmente, el brócoli era un cultivo de estación fría que crecía preferentemente durante el otoño e invierno en áreas templadas. Las condiciones óptimas de crecimiento son temperaturas de 15-16°C y humedades relativas entre 70 y 80%. El desarrollo de la inflorescencia requiere de temperaturas nocturnas bajas o vernalización (inferiores a 10°C). En la actualidad, las variedades cultivadas de brócoli se están mejorando para adaptarse a un amplio rango de condiciones ambientales extremas, debido a la situación actual del medioambiente consecuencia del calentamiento global, y sobre todo para conseguir la producción de esta hortaliza durante la mayor parte del año (Siomos et al., 2022). La planta adulta puede alcanzar entre 60 y 90 cm de altura, 60 cm de diámetro y un peso de 700 g (Li et al., 2022). Sus hojas constituyen la mayor parte de la planta madura (47%), seguida de los tallos (21%), raíces (17%) e inflorescencias (15%) (Liu et al., 2022) (**Figura 1. 1**).

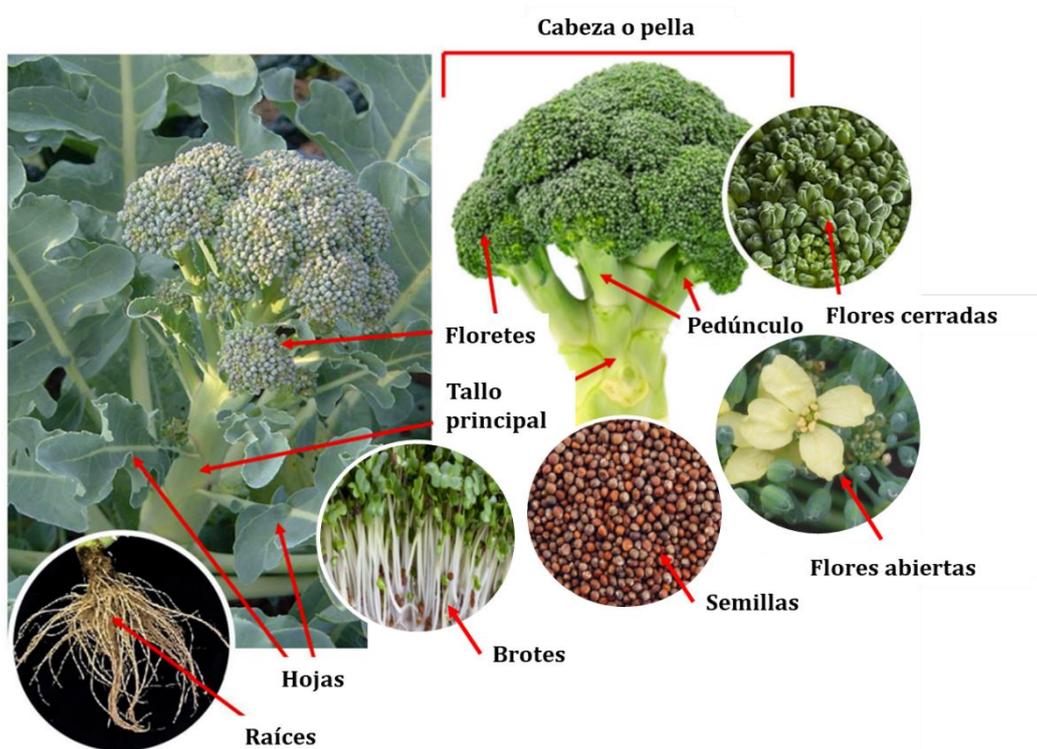


Figura 1. 1. Anatomía del brócoli *Brassica oleracea* var. *Italica* Plenck (extraído y modificado de Ilahy et al. (2020)).

La parte comestible de la planta son las inflorescencias inmaduras y los tallos cortos y tiernos próximos a éstas. Las hojas y tallos grandes son partes de la planta que aún no se aprovechan en la industria y representan una oportunidad para su valorización como fuente de ingredientes (Paulsen et al., 2021).

El brócoli es una hortaliza versátil, que se puede consumir fresca o elaborada, siendo sometida a diferentes procesos a nivel doméstico o industrial, en los que se incluye el escaldado, cocinado al vapor, salteado, horneado y hervido tradicional entre otros (Zhong et al., 2015).

1.1.2. Tendencias de producción y consumo

El brócoli es un cultivo muy importante a nivel mundial, cuya demanda está en constante aumento. Es originario de la región del Mediterráneo Oriental y Asia Menor y se introdujo en Estados Unidos e Inglaterra en el siglo XVII y en China a fines del siglo XX (Moreno & García-Vigueras, 2008; Ramirez et al., 2020). En la

actualidad el cultivo se extiende por diversas naciones, siendo China el mayor productor a nivel mundial, seguido por India, España, México, Italia, Francia y Estados Unidos. En las últimas décadas, la demanda de brócoli ha crecido significativamente. En el año 1999, la producción mundial de brócoli y coliflor fue de 15 millones de toneladas y ascendió a aproximadamente 27 millones de toneladas en el año 2019 (FAOSTAT, 2021; Li et al., 2022). La demanda creciente de esta hortaliza está vinculada a la versatilidad de su consumo y sobre todo a su alto valor nutritivo. La FAO ha clasificado al brócoli como una de las hortalizas de mayor valor nutricional, debido a su alto contenido de compuestos promotores de la salud (como glucosinolatos y compuestos fenólicos) y a su alto aporte de vitaminas, minerales y fibras (FAO, 2021).

Caso de España

En la última década, el consumo de brócoli en España se ha multiplicado por diez. Ha pasado de 200 gramos a 2 kilogramos per cápita al año, y se proyecta que aumente a 5 kilogramos per cápita al año en los próximos 5 años (Brócoli, 2022).

Actualmente, España cuenta con alrededor de 50.000 hectáreas dedicadas al cultivo del brócoli, en las que se producen casi 400.000 t anuales (Global Trade Magazine, n.d.). El 80% de su producción procede de la Región de Murcia. Del total producido, el 10% es destinado al mercado nacional y el 90% a la exportación, siendo España el mayor exportador de brócoli a nivel mundial (WITS, 2018). Anualmente más de 300.000 toneladas se destinan a la exportación en fresco, siendo los principales clientes Reino Unido, Francia, Países Bajos y los países escandinavos. Fuera de Europa también hay un importante mercado en Emiratos Árabes, Rusia, Rumanía y Bulgaria (Brócoli, 2022).

1.1.3. Indicadores de calidad

La calidad del brócoli es un concepto complejo que tiene en cuenta varias características como su apariencia, propiedades organolépticas y su valor nutricional. La importancia relativa de cada uno de estos parámetros depende del destino del vegetal y de los interesados. Por ejemplo, para los transportistas la calidad está vinculada principalmente al aspecto y a la resistencia a manipulaciones,

para la industria a la aptitud tecnológica, composición química y características microbiológicas y para el consumidor principalmente a características organolépticas y nutricionales. A continuación, se describen algunos de los principales indicadores de calidad del brócoli.

1.1.3.1. Parámetros físicos

La forma y tamaño de la cabeza o pella de brócoli debe ser más bien esférica, con un peso entre 250 y 600 gramos y un diámetro de entre 10 – 18 cm (dependiendo de la variedad y calibre). Las cabezas o pellas deben ser compactas, firmes y con floretes cerrados. La alta tasa de transpiración de este vegetal hace que el marchitamiento sea uno de los fenómenos más comunes que limitan su vida útil (Malekzadeh et al., 2023). Se reporta que pérdidas de peso por encima al 6% resultan en un producto blando que no puede ser comercializado (Yildiz & Wiley, 2017). Racimos hinchados, no compactos, blandos, marchitos y con floretes abiertos son signos de senescencia e indican el fin de la vida útil (Siddiq & Uebersax, 2018).

El color es una de las principales características externas directamente vinculada a la calidad de este vegetal. Las inflorescencias deben ser de color verde oscuro o verde con tonos azules. El amarilleo de las inflorescencias es uno de los desórdenes fisiológicos más comunes del brócoli, que se desarrolla por almacenamientos prolongados, altas temperaturas, o por la exposición al etileno (Shakeel et al., 2019). Los brócolis verde-amarillo son pobres en sabor, fibrosos, presentan pérdidas significativas en sus propiedades nutritivas e indican el fin de la vida útil (**Figura 1. 2**).



Figura 1. 2. Escala de amarilleo de brócoli desde 1 – color verde oscuro, recién cosechado, hasta 5 – color amarillo, no es comestible. En los estados 4 y 5 los productos no deben ser comercializados ni consumidos. Extraído de Horticulture Innovation Australia (n.d.).

El tallo hueco y manchas necróticas son otros de los desórdenes fisiológicos que se pueden presentar en el brócoli y que limitan su comercialización. Estos desórdenes se desarrollan durante el crecimiento de la planta en condiciones inadecuadas (Acosta-Motos et al., 2018).

Dentro de las patologías, el brócoli puede presentar descomposición bacteriana e infección por hongos. Son varias las bacterias que pueden causar la denominada “pudrición blanda” (*Erwinia*, *Pseudomonas*) afectando la vida útil del brócoli. Estas pudriciones bacterianas generalmente están asociadas a lesiones físicas en el vegetal. Aunque son menos comunes que las pudriciones bacterianas, la pudrición por hongos (*Botrytis cinérea*, *Alternaria* spp., *Fusarium*) también pueden afectar las cabezas de brócoli (generalmente en condiciones de crecimiento húmedas) y limitar su comercialización (Acosta-Motos et al., 2018) (**Figura 1. 3**).



Figura 1. 3. Cabeza de brócoli infectada por *Fusarium* spp. y *Alternaria* spp. (fuente propia).

1.1.3.2. Parámetros nutricionales

Una de las principales características del brócoli, que hacen que sea una hortaliza altamente valorada, es su alto contenido de nutrientes (vitaminas, minerales, folatos, etc.), necesarios para que el organismo pueda desarrollar sus funciones biológicas y metabólicas. En la **Tabla 1. 1** se resumen las principales características nutricionales del brócoli.

El brócoli aporta gran contenido de fibra dietética y aporta buen contenido de proteínas si se lo compara con otras frutas y hortalizas. Además, es una buena fuente de minerales como Na, K, Ca, Mg, Cl, P, S (macroelementos esenciales) y Fe, Zn, Mn, y Cu (microelementos esenciales) (Moreno et al., 2006). El brócoli destaca por ser una hortaliza con un elevado contenido de vitaminas (C, B1, B2, B5, B6, E, K, etc.), donde la vitamina C es la más estudiada por las grandes cantidades que tiene este alimento. Las necesidades dietéticas normales de vitamina C en adultos humanos se refieren a una ingesta mínima de 60 mg/día, por lo que el brócoli resulta una fuente excelente de vitamina C, en el que se han descrito contenidos de 40 a 150 mg/100 g (peso fresco), dependiendo de la variedad (García Benzal et al., 2022). El brócoli también es rico en ácidos grasos insaturados (linolénico, linoleico) y saturados (palmítico) (López-Pérez et al., 2009)

Tabla 1. 1. Composición nutricional de una porción comestible de brócoli (100 g, peso fresco) (USDA, 2018).

Análisis proximal	Contenido (g)	Minerales	Contenido (mg)
Agua	89	Na	33
Proteínas totales	3.2	K	316
Carbohidratos (por diferencia)	6.6	Ca	47
<i>Azúcares totales</i>	1.4	Mg	21
<i>Sacarosa</i>	0.01	Cl	319
<i>Glucosa</i>	0.58	P	66
<i>Fructosa</i>	0.82	S	152
<i>Fibra dietética total</i>	2.6	Fe	0.73
Lípidos totales	0.4	Zn	0.41
Vitamina C (ácido ascórbico total)	0.1	Cu	0.049
		Mn	0.21

Además del excelente perfil nutricional de esta hortaliza, el brócoli presenta un importante contenido de compuestos bioactivos (metabolitos secundarios), también denominados fitoquímicos o fitonutrientes. Estos compuestos bioactivos son aquellos que proporcionan beneficios para la salud más allá de la nutrición básica. Los fitoquímicos bioactivos no son esenciales para la salud humana, pero pueden ejercer un impacto positivo y significativo en el curso de diversas enfermedades y ser indispensables para la salud a largo plazo (Guijarro-Real et al.,

2022a). En la siguiente sección se describen los principales compuestos bioactivos que se encuentran en el brócoli y sus beneficios para la salud humana.

1.1.4. Principales fitoquímicos bioactivos de las crucíferas y efectos conocidos en la salud

Desde principios de la década de 1990, existe vasta evidencia epidemiológica y datos experimentales que vinculan el consumo regular de vegetales de la familia de las crucíferas con la mejora o reducción del riesgo a contraer enfermedades no transmisibles como cáncer, enfermedades cardiovasculares, diabetes, obesidad y enfermedades neurodegenerativas (García-Ibañez et al., 2022). Este efecto preventivo y beneficioso para la salud se atribuye al contenido de compuestos bioactivos que poseen estos vegetales. Los compuestos bioactivos se pueden clasificar según sus características químicas en sustancias fenólicas, terpénicas y azufradas. Las crucíferas se caracterizan por contener sustancias bioactivas de las tres familias, y por ello presentan particular potencial nutracéutico (Baenas, et al., 2016).

1.1.4.1. Glucosinolatos

Los glucosinolatos (GSL) son compuestos nitrógeno-azufrados cuya presencia en el brócoli es muy importante. Son metabolitos secundarios, estables, generados para protección y defensa de la planta y son responsables de sus propiedades organolépticas como sabor y aroma característico. Los GSL son fitoquímicos bioactivos que se encuentran presentes casi exclusivamente en las crucíferas (Di Gioia et al., 2020). En las últimas décadas, los GSL y sus productos de hidrólisis (los isotiocianatos e indoles) han captado especial interés en la comunidad científica, debido a sus diferentes actividades biológicas y beneficiosas para diferentes estados fisiopatológicos crónicos, en los que se incluyen efectos antiinflamatorios y moduladores del metabolismo energético, así como activando diferentes mecanismos de defensa a nivel celular para reducir la promoción y desarrollo de diferentes tipos de cáncer (Ruiz-Alcaraz et al., 2022).

Los GSL son compuestos que comparten una estructura química común de β -D-tioglucofuranosido, una oxima sulfonada y una cadena lateral variable derivada de un

aminoácido (metionina, fenilalanina, triptófano, valina, alanina, leucina, isoleucina) (**Figura 1. 4**) (Baenas et al., 2016; Clarke, 2010; Quirante-Moya et al., 2020a).

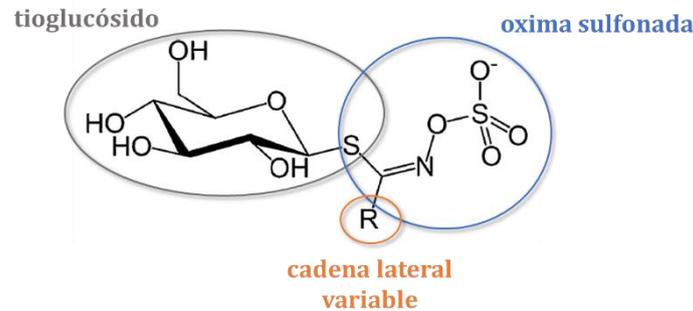


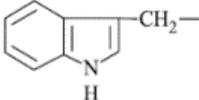
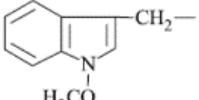
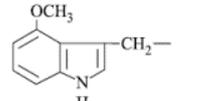
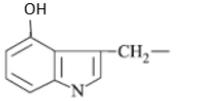
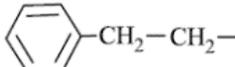
Figura 1. 4. Estructura básica de los glucosinolatos.

Según la bibliografía, hay identificados más de ciento veinte glucosinolatos de origen vegetal que se diferencian por las cadenas laterales (R), que se modifican por diversos mecanismos moleculares después de la síntesis del glucosinolato de origen (Clarke, 2010; Ramirez et al., 2020b). Según el aminoácido precursor, los GSL se pueden clasificar en tres grandes grupos:

- Alifáticos: derivados de la metionina, alanina, valina, leucina o isoleucina
- Indólicos: derivados del L-triptófano, y
- Aromáticos: derivados de la L-fenilalanina y la L-tirosina

De los más de cien tipos de glucosinolatos identificados, aproximadamente 50 de ellos se encuentran con regularidad en las hortalizas del género *Brassica* de consumo habitual. Por lo general, una única planta contiene de 3 a 4 GSL predominantes, aunque se han encontrado hasta 15 GSL diferentes (Verkerk et al., 2009). En la **Tabla 1. 2** se muestran algunos de los GSL más comunes hallados en brócoli y que fueron identificados en esta Tesis Doctoral. Es importante mencionar que el perfil, contenido y distribución de GSL en la planta de brócoli depende de factores intrínsecos, como la genética del vegetal y el órgano estudiado, y de factores extrínsecos como las condiciones ambientales, las prácticas agronómicas, la manipulación en cosecha y el posterior transporte, almacenamiento y procesado.

Tabla 1. 2. Estructura química de la cadena lateral, nombre químico, nombre común y abreviación de glucosinolatos comunes encontrados en brócoli (*Brassica oleracea* var. *Italica*) (Deng et al., 2015).

Estructura de la cadena lateral	Nombre químico	Nombre común	Abreviatura
Alifáticos			
CH ₃ -SO-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -	3-metilsulfinilpropil-gsl	Glucoliberina	GIB
CH ₃ -SO-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -	4-metilsulfinilbutil-gsl	Glucorafanina	GRA
CH ₃ -S-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -	4-metiltiobutil-gsl	Glucoerucina	GER
CH ₂ =CH-CH ₂ -	2-propenil-gsl	Sinigrina	SIN
Indólicos			
	3-indolilmetil-gsl	Glucobrasicina	GB
	1-metoxi-3-indolilmetil-gsl	Neoglucobrasicina	NGB
	4-metoxi-3-indolilmetil-gsl	4-Metoxiglucobrasicina	MGB
	4-hidroxi-3-indolilmetil-gsl	4-Hidroxi-glucobrasicina	4-HGB
Aromáticos			
	2-feniletil-gsl	Gluconasturtina	GST

En cuanto a la biosíntesis, los GSL provienen del metabolismo de los α -aminoácidos, a través de una serie de reacciones en las que el grupo carboxilo se pierde y el carbono α se transforma en el carbono central del GSL (**Figura 1. 5**). La biosíntesis de estos compuestos puede dividirse en tres fases (Sønderby et al., 2010):

1) Elongación de la cadena lateral de los aminoácidos

Los aminoácidos (AA) alifáticos o aromáticos son desaminados y la molécula resultante (2-oxo ácidos) condensa con un Acetil-CoA para formar un derivado del 2-malato, que se isomeriza a 3-malato. A continuación, ocurre la oxidación y descarboxilación donde se pierde el carboxilo del AA inicial, y da lugar a una

molécula de 2-oxo ácido elongada, que puede entrar nuevamente al ciclo de elongación, o mediante transaminación, formar un AA elongado.

2) Síntesis del GSL a partir del aminoácido modificado

La biosíntesis de la estructura básica de los GSL a partir de los AA modificados involucra intermediarios comunes para todos los GSL, que incluyen sustancias como N-hidroxi-aminoácidos, componentes óxido de nitrilo, aldoxinas, desulfoglucosinolatos (entre otras), y a las Citocromo P450 como catalizadoras de la conversión de AA a aldoximas.

3) Modificaciones de la cadena lateral del GSL

Luego de la formación de los glucosinolatos parentales, se desarrolla un amplio rango de modificaciones del grupo R (oxidaciones, esterificaciones, hidroxilaciones, metoxilaciones, alquenilaciones, benzoilaciones, etc.) que dan lugar a los distintos GSL. La actividad biológica de los GSL está determinada en gran medida por la estructura de la cadena lateral, lo que hace que las modificaciones secundarias sean interesantes desde el punto de vista de su aplicación, pero según Sønnerby et al. (2010) las bases moleculares de estas transformaciones secundarias aún son poco conocidas.

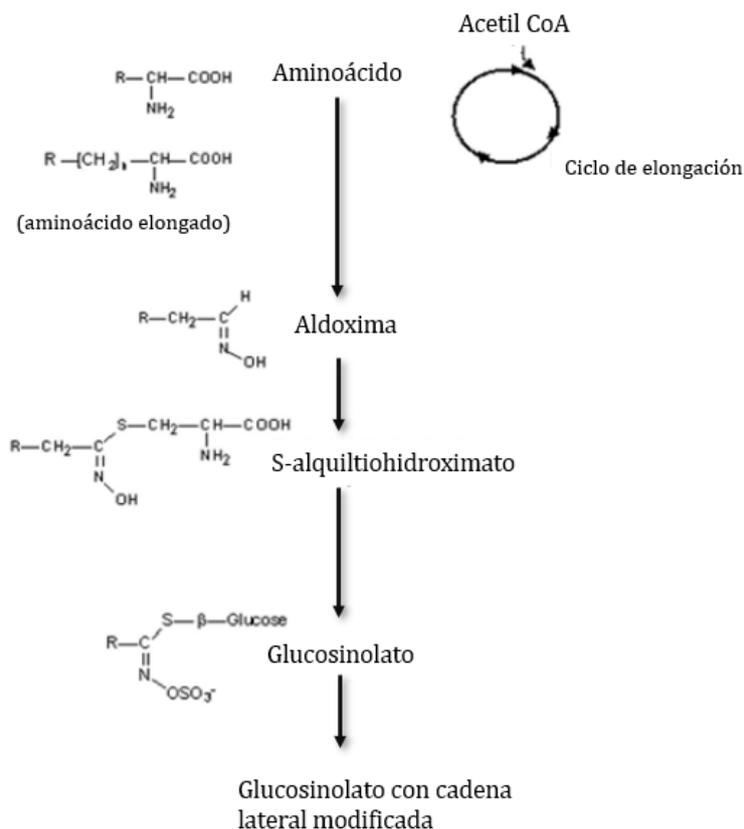


Figura 1. 5. Modelo bioquímico de la síntesis de glucosinolatos. Extraído y modificado de Verkerk et al. (2009).

La acción biológica de los GSL y su efecto beneficioso sobre diversas enfermedades se han atribuido principalmente a los productos de su hidrólisis, los isotiocyanatos (García-Ibañez et al., 2022; Quirante-Moya et al., 2020). Generalmente, los GSL son moléculas estables química y térmicamente, por lo que su hidrólisis es principalmente enzimática. Los GSL y la enzima que cataliza su hidrólisis, la mirosinasa, se encuentran dentro de la célula, pero en compartimentos diferentes. Cuando se origina una ruptura de la célula, ya sea por procesos de estrés o lesiones en los tejidos, la molécula de GSL entra en contacto con la enzima produciéndose la hidrólisis inmediatamente (**Figura 1. 6**). Este mecanismo también se desencadena durante la masticación y en la digestión, ya que en la microbiota intestinal hay enzimas con actividad hidrolítica, similar a la mirosinasa vegetal, que pueden escindir la glucosa y dar lugar a la formación de un compuesto intermedio inestable, aglicona tihidroximato-*O*-sulfonato, que sufre un reordenamiento espontáneo para dar lugar a la forma bioactiva, los isotiocyanatos (ITC) u otros productos de hidrólisis

con menor actividad (p. ej., tiocianatos, nitrilos, epitionitrilos, oxazolidina-2-tionas) (García et al., 2022). En la **Tabla 1. 3** se muestran algunos de los ITC, y sus GSL precursores, más comunes y estudiados del brócoli.

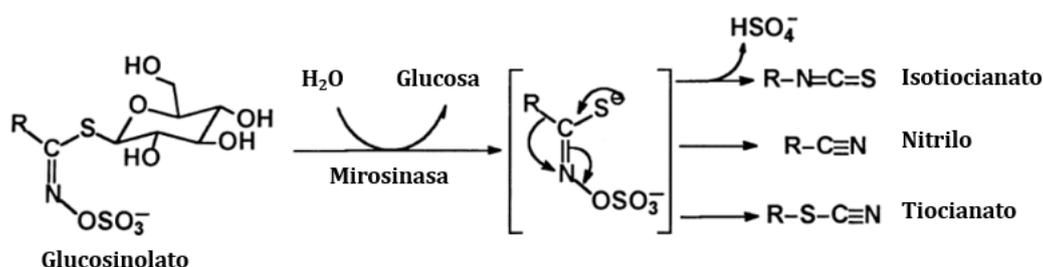


Figura 1. 6. Hidrólisis de glucosinolato catalizada por la enzima mirosinasa. Extraído y modificado de Baenas et al. (2016).

Tabla 1. 3. Productos de hidrólisis de los glucosinolos más representativos del brócoli (Castro-Torres et al., 2020).

Glucosinolato	Isotiocianato asociado
Glucioiberina	Iberina (IB)
Glucorafanina	Sulforafano (SFN)
Glucouerucina	Erucina (ERC)
Glucobrasicina (y Metoxi-, hidrox-, y Neo-glucobrasicina)	Indol-3-carbinol (I3C), y su dímero 3,3-Di-Indolmetano (3,3DIM)
Gluconasturtina	Fenetil-iso-tiocianato

Como se ha hecho mención, existe amplia evidencia epidemiológica y empírica que vincula el consumo de alimentos o ingredientes ricos en GSL/ITC con efectos positivos sobre varios tipos de cáncer (colon, mama, ovarios, pulmón, cuello, etc.) y enfermedades crónicas de alta prevalencia como diabetes y obesidad, enfermedad cardiovascular y deterioro cognitivo, entre otras (Quirante-Moya et al., 2020; Villaño et al., 2019).

De los compuestos de hidrólisis más estudiados, el principal ha sido el sulforafano, producto de la hidrólisis de la glucorafanina que suele ser uno de los GSL más abundantes en el brócoli (Houghton, 2019; Ruiz-Alcaraz et al., 2022). El sulforafano puede interferir en varias rutas de señalización celular: inhibición de enzimas que activan la carcinogénesis, inducción de enzimas detoxificadoras de carcinógenos, aumento de la apoptosis, paralización de la progresión del ciclo celular y otros

mecanismos que aún no están del todo dilucidados, pero que se unen a las evidencias previas de la capacidad del sulforafano para actuar en las diferentes etapas del desarrollo del cáncer, desde la iniciación y la progresión, hasta la apoptosis (Núñez-Sánchez et al., 2022).

Existen varios estudios, tanto *in vitro* como *in vivo*, donde se demuestra la acción de GSL e ITC en el metabolismo lipídico, porque pueden unirse a los ácidos biliares y reducir la absorción de grasa de la dieta. Además, en tratamientos con alimentos ricos en glucorafanina y sulforafano, se ha constatado un efecto sobre los perfiles lipídicos de pacientes con diabetes tipo II o no-insulino-dependiente. Se ha demostrado que el indol-3-carbinol (I3C) disminuye la expresión génica y la actividad de enzimas lipogénicas claves en el tejido adiposo. Además, el I3C mejoró significativamente los niveles de glucosa e insulina en pacientes con diabetes tipo II (Bahadoran et al., 2012). El 3,3'-Diindolilmetano (DIM) ha mostrado actividad antitumoral en varios tipos de cáncer, incluidos colon, páncreas, próstata y gástrico (Ye et al., 2016). Estudios recientes han reportado que tratamientos con 3,3'-DIM presentan potencial para mejorar la eficacia quimioterapéutica en el cáncer de hígado (Jiang et al., 2019).

Por otra parte, se ha demostrado que tanto GSL como ITC son potenciales agentes antiinflamatorios naturales. Estos compuestos reducen la producción de citoquinas proinflamatorias claves en el establecimiento y mantenimiento de procesos inflamatorios sistémicos a largo plazo, que provocan numerosas patologías crónicas como artritis reumatoide, diabetes tipo II, asma, enfermedad cardiovascular y deterioro cognitivo, entre otras (García-Ibañez et al., 2022; Medina et al., 2015).

1.1.4.2. Compuestos fenólicos

Además de los GSL, los compuestos fenólicos son el otro grupo de compuestos bioactivos presentes en cantidades importantes en las crucíferas y que contribuyen significativamente a sus cualidades nutraceuticas (Baenas, et al., 2016). Son metabolitos secundarios cuya estructura química va desde estructuras simples, de bajo peso molecular, con un solo anillo aromático, hasta taninos grandes y complejos y derivados de polifenoles. Se pueden clasificar según el número y disposición de

sus átomos de carbono en flavonoides (flavonoles, flavonas, antocianidinas, isoflavonas, entre otros) y no flavonoides (ácidos fenólicos, ácidos hidroxicinámicos, estilbenos, entre otros). Se encuentran comúnmente conjugados con azúcares y ácidos orgánicos (Cartea et al., 2010). Derivan de la fenilalanina a través de la ruta de los fenilpropanoides o del acetato-malonato, y la biosíntesis es catalizada principalmente por la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL) (Villaño et al., 2019).

Los (poli)fenoles son uno de los grupos más importantes de fitoquímicos con capacidad antioxidante de los alimentos vegetales. Su efecto protector frente al daño oxidativo, que a su vez se relaciona con el desarrollo de varios tipos de enfermedades crónicas, está ampliamente estudiado. Muchos de los efectos beneficiosos de las crucíferas en la salud se han atribuido al alto contenido de compuestos fenólicos que poseen estas hortalizas (Baenas et al., 2018).

Los compuestos fenólicos más comunes en las crucíferas como el brócoli son los flavonoides (principalmente los flavonoles quercetina, kaempferol e isorhamnetina) y derivados de ácidos hidroxicinámicos (principalmente del ácido clorogénico y sinápico) (Cartea et al., 2010). Los flavonoides (**Figura 1. 7**), cumplen funciones importantes y variadas en las plantas como protección frente a radiación UV, pigmentación, estimulación de nódulos fijadores de nitrógeno, resistencia a enfermedades, entre otras (Ghani, 2020).

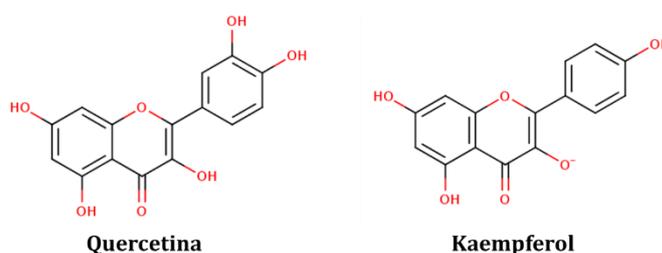


Figura 1. 7. Flavonoles comunes del brócoli (*Brassica oleracea* var. *Italica* Plenck). Extraído y modificado de Ghani (2020).

Los ácidos hidroxicinámicos (HCA) son un tipo de compuestos fenólicos no flavonoides, caracterizados por una estructura química C6-C3 (**Figura 1. 8**). Estos compuestos, y sus derivados, se encuentran presentes en numerosas frutas y

hortalizas, libres o formando parte de polímeros vegetales en la pared celular, cumpliendo funciones de defensa tanto química como estructural. Dentro de las HCA más comunes del brócoli se encuentran el ácido sinápico, ácido clorogénico, ácido *p*-cumárico y ácido ferúlico (Ghani, 2020).

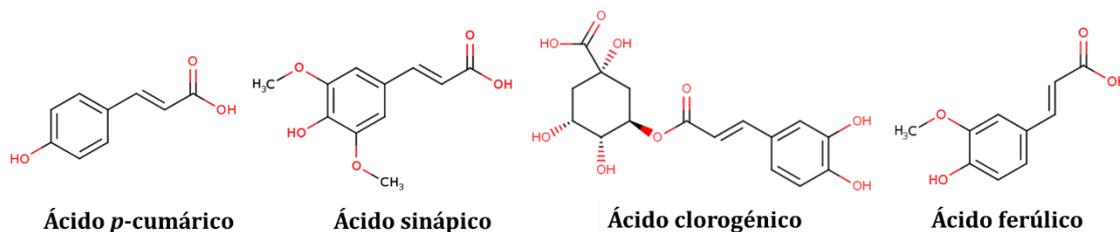


Figura 1. 8. Algunos de los ácidos hidroxicinámicos más comunes del brócoli y las crucíferas. Extraído y modificado de Ghani (2020).

En los últimos años, los compuestos fenólicos han sido intensamente investigados por sus efectos promotores de la salud, incluyendo propiedades antiinflamatorias, inhibición enzimática, propiedades antimicrobianas, antialérgicas y antitumorales (Tavares-da-Silva et al., 2016). Pero la acción más importante de este grupo de compuestos bioactivos es su actividad antioxidante (Ruiz et al., 2018). Pueden desempeñar un papel importante en la adsorción y neutralización de especies reactivas de oxígeno (ROS), la extinción del oxígeno singlete y triplete o la descomposición de peróxidos. Las ROS, derivadas de los procesos de oxidación, son una parte importante de los mecanismos de defensa contra infecciones, pero su generación excesiva puede dañar los tejidos y generar enfermedades como cáncer, aterosclerosis, inflamación y enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson o Alzheimer. Por lo tanto, los compuestos fenólicos se consideran posibles agentes protectores, reduciendo el daño oxidativo de las ROS en el cuerpo humano y retardando el progreso de muchas enfermedades crónicas (Cartea et al., 2010; Medina et al., 2015; Ruiz-Alcaraz et al., 2022). Estudios recientes demuestran como los ácidos hidroxicinámicos y sus derivados inhiben la propagación metastásica de células en pulmones y huesos (Iqbal et al., 2022).

En los últimos años ha habido un gran avance identificando efectos beneficiosos de la ingesta de fitoquímicos en diversas enfermedades, y en la explicación de los

mecanismos de acción. Cuestiones como su identificación y cuantificación en diferentes matrices alimentarias, técnicas en el procesado y en la conservación para mantener tanto la seguridad de frutas y hortalizas, como su contenido en fitoquímicos biodisponibles y bioactivos, forman parte de las líneas de investigación relevantes y retos de futuro en la obtención de alimentos de calidad, que permitan prevenir y ayuden en la modulación y tratamiento de enfermedades crónicas no transmisibles y de alta prevalencia del siglo XXI.

1.2. Fisiología postcosecha

Las frutas y hortalizas son órganos vivos, que continúan con su actividad metabólica después de la cosecha. Durante el período de postcosecha, los productos hortofrutícolas experimentan una serie de cambios asociados a reacciones bioquímicas que suceden a nivel celular y conllevan a la pérdida de calidad y el deterioro del producto. La interacción con el ambiente condiciona estos procesos y, por lo tanto, se pueden establecer condiciones para ralentizarlos y mantener la calidad por un mayor tiempo, extendiendo la vida útil de estos alimentos (Yahia, 2019).

Durante la postcosecha, los tejidos vegetales continúan consumiendo nutrientes, pero, a diferencia de cuando se encuentran en la planta, estos componentes no se vuelven a suministrar al tejido vegetal, provocando su deterioro (Robertson, 2016). La respiración, es el proceso responsable de la obtención de energía y de la síntesis de precursores bioquímicos esenciales para el crecimiento y mantenimiento del tejido celular (Robertson, 2016). Varios mecanismos bioquímicos y fisiológicos están relacionados con el proceso de respiración, incluyendo hidrólisis de carbohidratos, síntesis de compuestos volátiles, pigmentación, entre otros. Esencialmente, la respiración es la degradación oxidativa de compuestos orgánicos de reserva a moléculas simples (como dióxido de carbono y agua) con liberación de energía (Fonseca et al., 2002; Saltveit, 2019). El proceso consume O_2 en una serie de reacciones enzimáticas. Glucólisis, el ciclo del Krebs y el sistema de transporte de electrones son las vías metabólicas de la respiración aeróbica (**Figura 1. 9**).

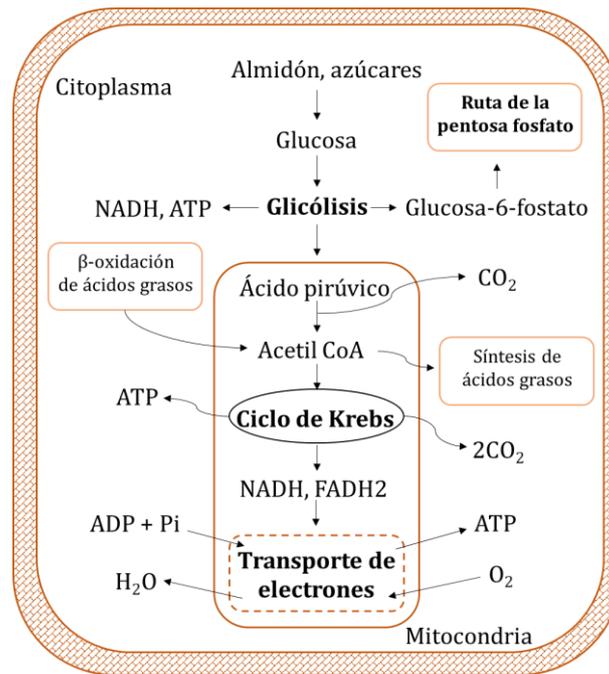


Figura 1. 9. Descripción general del metabolismo respiratorio, localización en la célula de las reacciones que comprenden este mecanismo y algunos de los productos derivados. Extraído y adaptado de Saltveit (2019).

Cuando los sustratos son principalmente carbohidratos, el cociente respiratorio (RQ) (relación de CO₂ producido y O₂ consumido) es igual a 1. Por ejemplo, la oxidación de la glucosa (uno de los sustratos predominantes) puede escribirse como:



de cuya estequiometría se desprende que el consumo de O₂ es igual a la generación de CO₂.

Cuando el sustrato es un lípido, el RQ es menor que 1, debido a que la relación carbono/oxígeno es menor en estos compuestos que en los carbohidratos. Cuando el sustrato son ácidos orgánicos, el RQ es mayor a 1. Por lo tanto, los RQ normales reportados van desde 0,7 a 1,3. Cuando el RQ es mucho mayor a 1, indica que se está desarrollando una respiración anaerobia o fermentación. En el metabolismo fermentativo, se da la descarboxilación del piruvato obteniendo CO₂ y etanol, sin consumo de O₂ (Fonseca et al., 2002; Robertson, 2016).

La respiración es uno de los procesos metabólicos más relevantes que conlleva al deterioro de las frutas y hortalizas durante la postcosecha. Cuanto mayor es la tasa respiratoria, más rápida es la pérdida de calidad. Es por ello que la mayor parte de las tecnologías postcosecha están enfocadas en reducir la tasa respiratoria con el objetivo de prolongar la vida útil de estos productos (Opara et al., 2019a). Además, las tecnologías aplicadas deben controlar la tasa respiratoria para evitar la respiración anaeróbica, que implica la generación de productos indeseados que aceleran el deterioro del vegetal (Fagundes et al., 2015; Mastrandrea et al., 2017). El brócoli se caracteriza por presentar una alta tasa respiratoria, por lo que es altamente perecedero (vida útil no mayor a 3 días) y resulta imprescindible aplicar tecnologías de conservación para su adecuada comercialización (Gao et al., 2018).

La temperatura se ha identificado como el factor externo con mayor impacto en la tasa respiratoria. En general, las reacciones biológicas se aceleran entre 2 o 3 veces al aumentar 10°C la temperatura. Es por ello que la refrigeración es uno de los factores más relevantes durante la postcosecha, independientemente de que se apliquen otras tecnologías de conservación (Robertson, 2016).

El estrés o daño provocado en los tejidos también aumenta significativamente la tasa respiratoria. La ruptura de tejidos desencadena la producción de compuestos (por ejemplo, etileno) que estimulan la respiración acelerando el deterioro y senescencia del tejido. Las lesiones pueden originarse por daños mecánicos durante el transporte o por cortes, por ejemplo, durante la producción de frutas y hortalizas mínimamente procesadas (Yahia et al., 2019).

Otros factores externos que afectan a la respiración son las concentraciones de O₂ y CO₂. En la literatura científica está ampliamente descrito que la tasa respiratoria se ralentiza al disminuir el O₂ disponible como consecuencia de la reducción de la actividad metabólica, debida a una disminución de la actividad de enzimas oxidasas como la polifenoloxidasas, ácido ascórbico oxidasas o la ácido glicólico oxidasas. La influencia del CO₂ aún no está tan clara y depende del tipo de producto y del tiempo de exposición al gas, entre otros factores (Fonseca et al., 2002; Saltveit, 2019). Una de las hipótesis de por qué el CO₂ puede disminuir la tasa respiratoria es porque es un producto del proceso de respiración y causa inhibición por producto. Otra hipótesis es que las concentraciones elevadas de CO₂ podrían afectar el ciclo de

Krebs y la actividad mitocondrial. La evidencia reciente muestra que la modificación de la atmosfera circundante inhibe la tasa respiratoria prolongando la vida útil de los alimentos, por lo que el envasado en atmosferas modificadas es una de las tecnologías más ampliamente utilizadas en la conservación en postcosecha de frutas y hortalizas (Opara et al., 2019a).

Además de la pérdida de agua que origina la respiración, los tejidos vegetales pierden agua durante la postcosecha por el proceso de transpiración. Esta pérdida de agua suele ser un problema grave en la mayoría de los vegetales ya que provoca la pérdida de peso y cambios en la textura como marchitamientos, pérdida de firmeza, contracción, etc. (Bovi et al., 2018). Para el brócoli se ha reportado que pérdidas de peso mayores al 6% respecto al peso inicial, lo convierten en un producto inviable comercialmente (Yildiz & Wiley, 2017). La ausencia de un control de la pérdida de agua puede dar lugar a pérdidas superiores al 50% de su peso en tan sólo 5 días (condiciones ambientales) (Jia et al., 2009; Malekzadeh et al., 2023). La transpiración es un proceso de transferencia de masa, donde el agua se mueve desde el producto hacia la atmosfera circundante. Principalmente, es consecuencia de dos fenómenos: la respiración que genera calor y afecta el transporte de agua hacia la superficie y la posterior evaporación; y el gradiente de presión de vapor de agua entre el producto y el ambiente, que afecta la transferencia de agua desde el producto hacia la atmosfera circundante (Castellanos et al., 2016; Madonna et al., 2018). Es por esto que la temperatura y la humedad relativa juegan un papel fundamental en el control de la transpiración y mantenimiento de la calidad de los vegetales durante su almacenamiento (Madonna et al., 2018; Robertson, 2016).

Otro de los fenómenos importantes que se desarrolla en el brócoli durante la postcosecha es el amarilleo debido a la degradación de clorofilas. Como se ha mencionado, el color es un aspecto crítico de la calidad del brócoli, por lo que el control de la degradación de clorofilas durante la vida útil es importante. La degradación de las clorofilas está directamente relacionada con los procesos de senescencia y al metabolismo energético (Huang et al., 2021). El proceso de degradación de clorofilas en el brócoli consiste en dos etapas: la primera es la conversión de la clorofila en otros compuestos “no verdes” en los cloroplastos, y la segunda es el transporte de estos catabolitos “no verdes” hacia las vacuolas. Estos

procesos son catalizados por varias enzimas catabólicas, entre las que se encuentran la clorofilasa, feofitinasas y feoforbida oxigenasa. La clorofilasa actúa no solo como la primera enzima de la vía catabólica de la clorofila, sino también como la enzima limitante de la velocidad del catabolismo (Huang et al., 2021). Es por ello que la aplicación de tecnologías que permitan inhibir la actividad de estas enzimas retardando la degradación de clorofilas pueden contribuir en la extensión de la vida postcosecha del brócoli.

El crecimiento de microorganismos tales como bacterias, levaduras y mohos, es otro de los fenómenos que se desarrolla durante la vida postcosecha y que debe controlarse ya que compromete aspectos de inocuidad, organolépticos y vida útil del producto (Yahya et al., 2019).

1.3. Envasado en atmósfera modificada

Después de la refrigeración, el envasado en atmósfera modificada (MAP) es la segunda tecnología más eficaz en el control de los procesos de senescencia de frutas y hortalizas, siendo importante para la reducción de pérdidas en el sector hortofrutícola (Fagundes et al., 2015; Opara et al., 2019a). Es una tecnología de bajo costo relativo, flexible (puede aplicarse desde envases individuales hasta pallets) y que aporta valor añadido a los productos frescos haciéndolos más fáciles para su uso y mejorando su presentación (Mashabela et al., 2019).

En términos generales, la tecnología MAP consiste en el confinamiento de alimentos en un envase en el que la atmósfera interior se modifica para proporcionar una atmósfera adecuada para conservar la calidad y extender la vida útil del alimento (D. S. Lee, 2021). En el caso de frutas y hortalizas, donde el producto respira y transpira, la tecnología MAP consiste en el envasado de estos productos frescos en films permeables a los gases y al vapor de agua. En este sistema, se establece una interacción dinámica entre el producto y el envase, generando la modificación de la atmósfera en contacto con el producto (Opara et al., 2019a; Robertson, 2016). La modificación de la atmósfera viene dada principalmente por la interacción de dos fenómenos: la respiración, que consume O_2 y genera CO_2 y agua, y la transferencia

de gases entre el interior y exterior del envase a través del film (Castellanos et al., 2016) (Figura 1. 10).

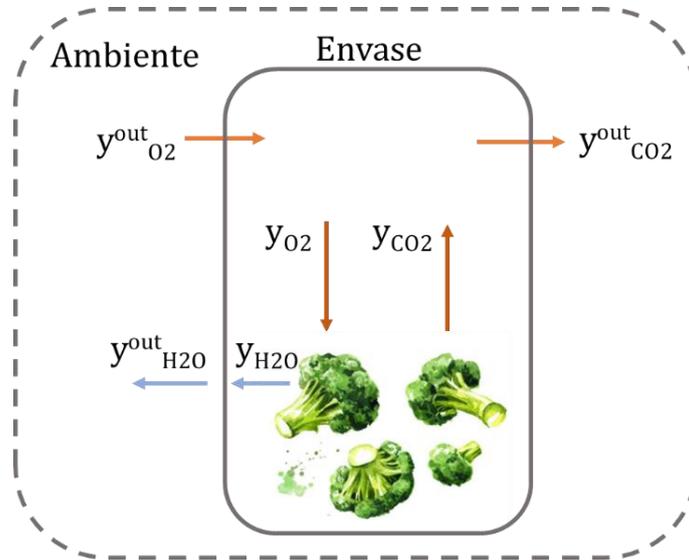


Figura 1. 10. Esquema de los flujos de O₂, CO₂ y vapor de agua en un sistema MAP. Extraído y modificado de Opara et al. (2019a).

Como consecuencia de estos procesos, el espacio dentro del envase se empobrece en O₂ y se enriquece en CO₂ a lo largo del tiempo. Eventualmente se llega a una atmosfera de equilibrio (estado estacionario) cuando las velocidades de transferencia de cada gas a través del film son iguales a la tasa respiratoria. Las ecuaciones (1) y (2) describen los cambios en la concentración de gases en el envase en función del tiempo (balance de masa global), bajo las hipótesis de que no hay estratificación de gases dentro del envase y que la presión dentro del mismo es constante.

$$V_{libre} * \frac{\partial C_{O_2}}{\partial t} = \frac{P_{O_2} * A * (C_{O_2_{ext}} - C_{O_2})}{e} - RR_{O_2} * m \quad (1)$$

$$V_{libre} * \frac{\partial C_{CO_2}}{\partial t} = \frac{P_{CO_2} * A * (C_{CO_2_{ext}} - C_{CO_2})}{e} - RR_{CO_2} * m \quad (2)$$

Donde:

V_{libre} es el volumen libre del envase (m^3)

C es la concentración dentro del paquete ($mol\ m^{-3}$)

C_{ext} es la concentración de la atmósfera exterior ($mol\ m^{-3}$)

t es el tiempo (s)

P es la permeabilidad del film de envasado ($m^3\ \mu m\ m^{-2}\ s^{-1}$)

A es el área de transferencia (m^2)

e es el espesor del film de envasado (μm)

RR es la tasa respiratoria ($mol\ kg^{-1}\ s^{-1}$)

m es la masa del producto envasado (kg)

La reducción de O_2 e incremento de CO_2 dentro del envase enlentecen varios mecanismos vinculados al deterioro de las frutas y hortalizas como la respiración, pardeamiento enzimático, degradación del color y textura, pérdida de nutrientes, deshidratación y crecimiento microbiano (Mahajan & Lee, 2023). Como consecuencia, se logra mantener la calidad y extender la vida útil de estos productos (D. S. Lee, 2021).

Además de la modificación en términos de O_2 y CO_2 , el MAP permite mantener una humedad relativa alta dentro del envase, ya que el film actúa como una barrera al vapor de agua. El menor gradiente de humedad entre el producto y el ambiente disminuye la tasa de transpiración del producto, reduciendo significativamente su deshidratación (Belay et al., 2018; Hussein et al., 2015).

El MAP puede ser pasivo o activo. En el MAP pasivo la atmósfera de equilibrio deseada se alcanza exclusivamente por la interacción entre la respiración del producto y la permeabilidad del film. En el MAP activo se busca acelerar la obtención de la atmósfera deseada inyectando una mezcla gaseosa para sustituir el aire del espacio cabeza antes del sellado hermético del envase (Opara et al., 2019a).

Por lo tanto, el diseño del MAP implica estudiar la relación entre los distintos factores que se interrelacionan durante el período de almacenamiento y que generan las concentraciones de O₂, CO₂ y humedad relativa dentro del envase. Algunos de estos factores son: permeabilidad del film a los gases y al vapor de agua, espesor del film, área del envase, tasa respiratoria del producto, masa de producto a envasar, condiciones de almacenamiento (temperatura y humedad relativa), entre otros (Yildiz & Wiley, 2017).

La selección del material de envasado es uno de los aspectos más relevantes (Castellanos et al., 2016; Fonseca et al., 2002). Sin embargo, los films poliméricos disponibles comercialmente para el MAP presentan varias limitaciones. Por ejemplo, presentan bajas permeabilidades al O₂ y CO₂ y una relación alta de permeabilidad CO₂/O₂ (un factor que se denomina β) que no es conveniente para productos de alta tasa respiratoria, ya que aumenta el riesgo de anaerobiosis. Además, presentan alta barrera al vapor de agua generando condensación y aumentando el riesgo de proliferación microbiana (Mahajan & Lee, 2023). Las limitaciones de los films poliméricos disponibles y el interés de la aplicación de MAP en productos hortofrutícolas de alta tasa respiratoria ha dado lugar al desarrollo de nuevos sistemas de envasado. Así surge el envasado en atmósfera modificada mediado por perforación (PM-MAP), que se basa en alterar la permeabilidad de los films a través de la realización de macro o micro perforaciones (**Figura 1. 11**) (Qu et al., 2022). De esta manera se logra regular la permeabilidad del film para adecuarla a los requerimientos de cada producto a través del número, tamaño y posición de las perforaciones (Fonseca et al., 2000; Hussein et al., 2015). Lo que se busca es mejorar las propiedades de transferencia del film para que se alcancen rápidamente condiciones de equilibrio de O₂, CO₂ y humedad relativa adecuadas y seguras para cada producto (Hussein et al., 2015).

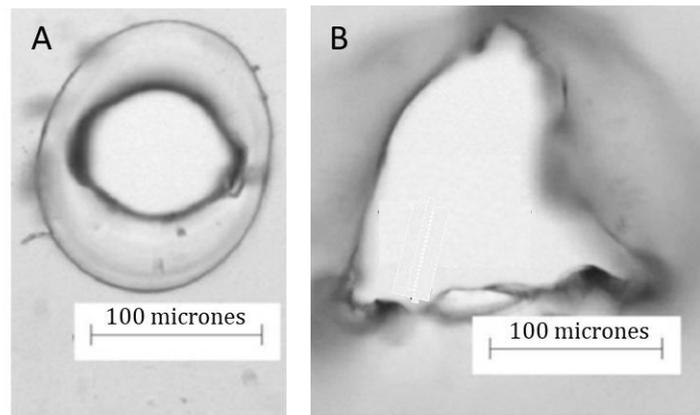


Figura 1. 11. Imágenes de diferentes micro perforaciones. A – micro perforación laser en polipropileno biorientado. B – perforación mecánica en tereftalato de polietileno. Extraído y modificado de Hussein et al. (2015).

Actualmente, hay varias limitaciones para la aplicación del MAP en el sector agroindustrial, como son la especificidad requerida para cada producto que se envasa, la baja permeabilidad a los gases y vapor de agua que presentan los films convencionales y los abusos de temperatura que existen dentro de la cadena de suministro. Atender estas cuestiones en el diseño de sistemas de envasado es necesario para extender la vida útil de los productos hortofrutícolas frescos (Mahajan & Lee, 2023).

Por otra parte, el MAP presenta la desventaja de generar grandes cantidades de residuos plásticos, ya que los films de envasado utilizados no son biodegradables. Uno de los desafíos que presenta esta tecnología para contribuir a la sostenibilidad medioambiental y ajustarse a las nuevas normativas de envases plásticos, es el cambio hacia materiales de envasado pensados en el marco de una economía circular (Mahajan & Lee, 2023). Por lo tanto, los estudios de aplicación de nuevos materiales de envasado sostenibles para el sector de las frutas y hortalizas frescas, como alternativa a los plásticos convencionales, es una línea de investigación relevante en esta área a nivel internacional (Shaikh et al., 2021).

1.4. Frutas y hortalizas mínimamente procesadas

1.4.1. Aspectos generales

Las frutas y hortalizas mínimamente procesadas son aquellas que han sido sometidas a operaciones leves como lavado, desinfección, pelado, cortado y/o envasado, con el fin de ofrecer comodidad y funcionalidad a los consumidores, a la vez que se garantiza la seguridad y calidad (Alzamora et al., 2016; Rehan et al., 2021). En la **Figura 1. 12** se muestran las operaciones unitarias generales que forman parte del proceso de elaboración de frutas y hortalizas mínimamente procesadas.

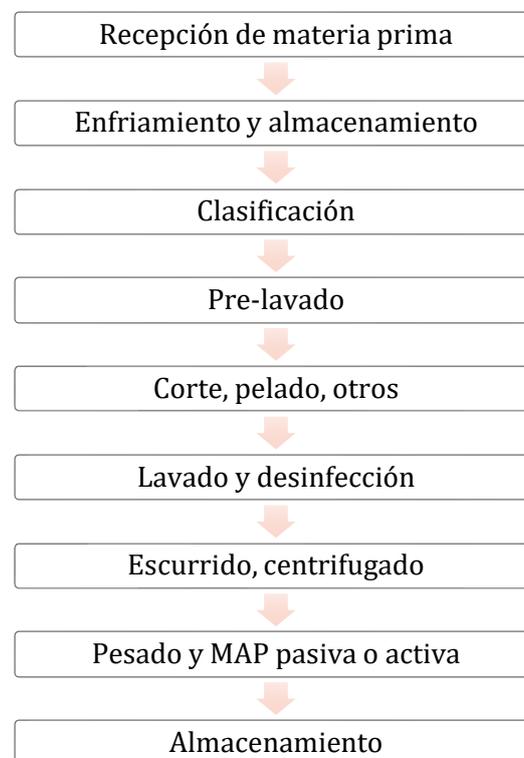


Figura 1. 12. Diagrama de flujo general del proceso de producción de productos hortofrutícolas mínimamente procesados. Extraído y modificado de Yildiz & Wiley (2017).

Estos productos están listos o preparados para consumir o cocinar de forma sencilla, y se denominan productos IV gama (o en inglés “ready-to-eat”, “fresh-cut”, “easy-to-use”). Dentro de estos productos encontramos vegetales o frutas cortadas, ensaladas, mezclas de vegetales listos para cocinar, entre otros. Los productos IV gama se caracterizan por ser semejantes a las frutas y hortalizas frescas intactas, es

decir que deben conservar la frescura, calidad fisicoquímica, organoléptica y nutricional (Yousuf et al., 2020). La ventaja para el consumidor es que ofrecen un considerable ahorro de tiempo en la preparación de las comidas y permiten tener acceso a alimentos saludables de forma práctica y cómoda. Además, el producto se aprovecha en un 100% reduciendo la generación de residuos alimentarios a nivel doméstico y de restauración y hostelería. Sin embargo, generan una gran cantidad de residuos plásticos, que es uno de los desafíos actuales del sector agroalimentario a nivel industrial, en la búsqueda de soluciones sostenibles para el envasado de alimentos, que sean compatibles con los objetivos globales de desarrollo sostenible (Shaikh et al., 2021a). Otro reto importante de la industria IV gama es frenar el acelerado deterioro de los productos “listos para comer” frente a los vegetales frescos sin procesar (Yildiz & Wiley, 2017). Las operaciones de procesado mínimo desencadenan reacciones químicas que aceleran la senescencia y favorecen una alta tasa de respiración de los tejidos (Sandhya, 2010; Yousuf et al., 2020). Operaciones como el pelado y corte provocan la ruptura de tejidos liberando enzimas y acelerando procesos físicos y bioquímicos asociados a la degradación del color, textura, sabor y otros procesos indeseados. Además, estas operaciones afectan el contenido de nutrientes y compuestos bioactivos provocando pérdidas nutricionales sustanciales a lo largo de la vida útil de estos productos (Yildiz & Wiley, 2017).

Para que los productos mínimamente procesados conserven las características originales de las frutas y hortalizas frescas durante su comercialización, es necesario aplicar tecnologías de conservación. Las tecnologías de conservación más utilizadas se basan en las bajas temperaturas de procesamiento y almacenamiento, aplicación de atmósferas modificadas y tratamientos con desinfectantes y conservantes. Se utiliza el concepto de tecnología de obstáculos, donde se aplica una combinación de estas tecnologías de forma de que sean varias las barreras impuestas para el deterioro (Ramos et al., 2013). En los últimos años, también se han estudiado tecnologías de conservación emergentes como la aplicación de desinfectantes alternativos al cloro, la aplicación de soluciones antioxidantes y antimicrobianas, la radiación UV-C, el empleo de ultrasonidos de alta potencia, pulsos de luz, plasma frío, altas presiones hidrostáticas, sistemas de envasado activos e inteligentes, películas comestibles, entre otras (De Corato, 2019).

1.4.2. Estado actual y tendencias

Los productos IV gama aparecen en Estados Unidos en la década de los 1970s. A partir de entonces, el mercado se ha expandido al resto del mundo y ha crecido de forma exponencial. Una de las fuerzas dominantes que impulsan esta demanda es la creciente necesidad de alimentos de fácil preparación y consumo. Algunos de los factores socioeconómicos vinculados con esta necesidad son los cambios en el estilo de vida de los consumidores (se dispone de menos tiempo para cocinar), incorporación de la mujer al mundo laboral, tamaño de las familias y hogares, aumento de la esperanza de vida, entre otros (Alzamora et al., 2016). En los países desarrollados, esto se ve directamente reflejado en la composición del mercado de frutas y hortalizas frescas, donde los productos mínimamente procesados son los que predominan (**Figura 1. 13**). Por otro lado, la mayor concientización de los consumidores por la alimentación y su impacto en la salud han aumentado la demanda de productos frescos, seguros y de alta calidad nutritiva. Dentro de estos productos se encuentran las frutas y hortalizas, que están asociadas directamente a efectos beneficiosos sobre la salud humana, atribuidos principalmente a su alto contenido de compuestos bioactivos, vitaminas, fibras y minerales. Estas tendencias de consumo contribuyen significativamente al crecimiento del mercado de frutas y hortalizas mínimamente procesadas. La pandemia de COVID-19 también ha tenido un impacto significativo en el sector de procesado de frutas y hortalizas, ya que ha destacado la importancia de comer de una manera segura y nutritiva, aumentando la tendencia al consumo de productos frescos y saludables. Los productos alimentarios veganos también están presentando una gran demanda, lo que crea nuevas oportunidades en el sector de productos IV gama (Ahmadzadeh & Khaneghah, 2020; De Corato, 2019; de Corato, 2020).

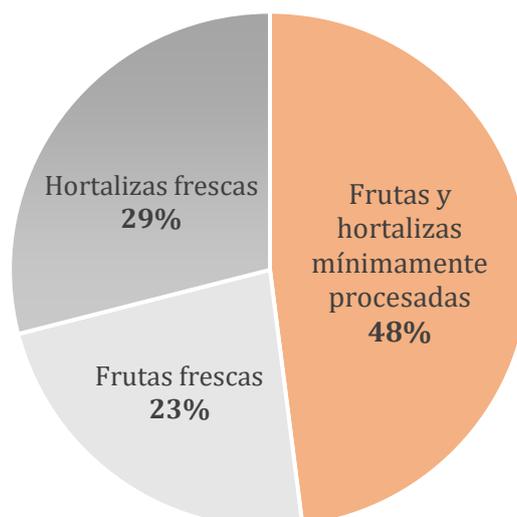


Figura 1. 13. Mercado de frutas y verduras frescas y mínimamente procesadas en EEUU. Extraído y modificado de De Corato (2020).

Según estudios de investigación recientes, el tamaño y participación del mercado mundial de procesado de frutas y verduras fue de alrededor de US\$ 310 mil millones en 2021 y se prevé que crezca a alrededor de US\$ 530 mil millones para 2028, con una tasa de crecimiento anual del 7,5% durante el período 2022 – 2028 (GlobeNewswire, 2022). Sin embargo, para que el mercado pueda crecer como es esperado, la industria de procesamiento mínimo de frutas y hortalizas debe enfrentar desafíos importantes. Incorporar mejoras en las tecnologías que permitan mantener los productos frescos, preservar la calidad nutritiva y extender la vida útil para lograr un suministro factible de acuerdo con los requisitos del consumidor, son algunos de estos desafíos (De Corato, 2020). Además, el procesado mínimo de frutas y hortalizas debe evolucionar aún más en términos de una mejor conservación de las propiedades nutritivas y promotoras de la salud, al mismo tiempo que garantice alimentos seguros, con buenas características organolépticas y sostenibles.

1.4.3. Problemas y necesidades de la industria de alimentos mínimamente procesados

La industria de las frutas y hortalizas IV gama presenta limitaciones que podrían impedir el crecimiento del mercado. Una de ellas es la gestión de la temperatura en

las cadenas de suministro, que es clave en el mantenimiento de la calidad, seguridad y extensión de la vida útil de estos productos. El abordaje de este aspecto resulta fundamental para lograr reducir un problema importante de la industria alimentaria: la pérdida y el desperdicio de alimentos. La gestión de las cadenas de frío está recibiendo cada vez más atención tanto en la práctica como en la literatura científica. Existen datos que dejan en evidencia el abuso de temperatura que reciben los productos IV gama. En Estados Unidos, Nunes et al. (2009) reportó fluctuaciones de temperatura desde 0°C a 19°C para frutas y hortalizas frescas cortadas y desde 1°C a 19°C para ensaladas en bolsa. En los artículos se expresa que, debido a la falta de control de temperatura durante el suministro, la mitad de estos productos son desperdiciados. Zeng et al. (2014) informaron fluctuaciones de temperatura para ensaladas en bolsa de entre 0°C y 8°C durante el transporte y de entre 1°C y 10°C durante el período de venta minorista. Brown et al. (2016) cita que entre un 40 y un 58% de las vitrinas minoristas registran temperaturas superiores a los 7°C. En Japón, para lechuga iceberg, se registraron fluctuaciones de temperatura durante el transporte en el rango de 3°C a 15°C (Ndraha et al., 2018). En España, el abuso de temperatura durante la venta al por menor es muy pronunciado, afectando negativamente a la vida útil de los productos, que se reduce drásticamente entre un 25% y 57%, dependiendo del producto, estación del año y ubicación del producto en las estanterías (Baldera Zubeldia et al., 2016). Estos estudios sugieren que el mantenimiento de la cadena de frío en el sector minorista no está garantizado. Esta situación se supone que empeora en países en desarrollo, donde no existen registros de datos (Ndraha et al., 2018).

La temperatura es el factor que más impacta en la calidad de los productos IV gama. El diseño y desarrollo de estos productos se realiza para su almacenamiento en condiciones de temperatura reglamentarias, entre 0°C y 4°C (Codex Alimentarius, 2003). Por lo tanto, los abusos de temperatura durante la cadena de suministro provocan el deterioro prematuro de los productos, que deben ser retirados del mercado con las consecuentes pérdidas que esto conlleva. Este es uno de los aspectos que se abordará en esta Tesis Doctoral, evaluando el impacto del almacenamiento en diferentes escenarios de temperatura e identificando condiciones para preservar el contenido de compuestos bioactivos y extender la vida útil de brócoli IV gama. Establecer condiciones efectivas para extender la vida

útil manteniendo la calidad nutritiva del alimento, es clave para el crecimiento de esta industria.

Otro de los desafíos que enfrenta la industria de alimentos en general, y del que no escapa la industria de las frutas y hortalizas IV gama, es el de optimizar el uso de recursos y disminuir el impacto ambiental (Raffo & Paoletti, 2022). Los plásticos utilizados para el envasado de alimentos son una importante preocupación. Las agencias gubernamentales a nivel global están trabajando en esta problemática y se han desarrollado normativas que buscan disminuir el impacto medioambiental generado por los envases plásticos y avanzar hacia modelos de desarrollo más sostenibles (Ahmadzadeh & Khaneghah, 2020). En este sentido, existe un gran desafío en la búsqueda de nuevos envases que sigan cumpliendo con los requisitos indispensables para garantizar la seguridad y calidad de los alimentos, pero que, de manera concomitante, reduzcan el impacto ambiental. Este desafío ha llevado a trabajar en nuevos materiales biodegradables o de base biológica (bioplásticos) como alternativas a los materiales de envasado convencionales. En el sector de las frutas y hortalizas, los bioplásticos han captado la atención debido a su potencial para mantener la calidad organoléptica de frutas y hortalizas (Matthews et al., 2021). En la presente Tesis Doctoral se aborda este tema mediante estudios de aplicación de bioplásticos para el envasado de inflorescencias o cabezas de brócoli y de brócoli IV gama.

1.5. Envasado de alimentos

1.5.1. Aspectos generales y materiales para el envasado de alimentos

El envase es un elemento fundamental en la industria alimentaria. Esencialmente, se diseñan para contener al alimento, mantener su calidad y seguridad e informar al consumidor sobre sus características (Alias et al., 2022a). Además de estas funciones fundamentales, para que los envases sean adecuados deben cumplir con otras numerosas características (Yildiz & Wiley, 2017b). En el caso particular del envasado de frutas y hortalizas frescas, se deben considerar características como:

- Permeabilidad a los gases
- Velocidad de transmisión al vapor de agua

- Propiedades mecánicas
- Protección frente a la contaminación biológica y daños mecánicos y físicos
- Transparencia
- Fiabilidad del sellado
- Tolerancia a las condiciones de almacenamiento
- Facilitar el transporte, manipulación, almacenamiento y comercialización
- Cumplir con las normativas vigentes de materiales en contacto con alimentos
- Coste asequible

Además, a medida que la industria de alimentos crece y se transforma, los requisitos de los materiales de envasado también lo hacen. Por ejemplo, el impacto medioambiental de los materiales es otro de los factores que se debe tener en cuenta para la selección (Opara et al., 2019).

Los plásticos convencionales son los que se aplican ampliamente para el envasado de alimentos, incluido el sector de frutas y hortalizas, debido a que cumplen con muchos de los requisitos y funcionalidades (Alojaly & Benyounis, 2020). Los plásticos son formulaciones basadas en uno o más polímeros en combinación con varios aditivos como plastificantes, estabilizantes, obturadores, etc. Son materiales sintéticos obtenidos por aplicación de calor o presión, que pueden moldearse de diversas formas. Según su forma, los envases se pueden clasificar como rígidos o flexibles. En la industria de los productos IV gama, los que más se utilizan son las películas o films flexibles. En productos más delicados, se suelen combinar bandejas rígidas con películas flexibles. Los envases flexibles tienen como ventaja que requieren menor relación material/producto, son más baratos, de bajo peso y ocupan menor volumen respecto a los envases rígidos. Sin embargo, los envases flexibles no pueden reutilizarse y presentan importantes problemas ambientales relacionados con su eliminación (Ncube et al., 2021).

Las propiedades que debe cumplir un material de envasado dependen de las características del producto y de las condiciones externas en las que el producto será transportado y almacenado. Polietileno (PE), polipropileno (PP), tereftalato de polietileno (PET) y cloruro de polivinilo (PVC) son los plásticos más comunes para el envasado de frutas y hortalizas, y representan más del 90% del volumen total de

plásticos utilizados para embalaje y envasado (Alojaly & Benyounis, 2020). En la **Tabla 1. 4** se describen algunas de las propiedades de estos materiales y en la **Figura 1. 14** se muestran datos de sus propiedades de barrera.

Tabla 1. 4. Propiedades de materiales de envasado convencionales para el envasado en atmósfera modificada de frutas y hortalizas (Opara et al., 2019b).

Films	Propiedades de barrera	Propiedades funcionales
Polietileno (PE)	Baja barrera a los gases. Alta barrera al vapor de agua.	Limitaciones en cuanto a la transparencia, resistencia al impacto, estiramiento e idoneidad para el termosellado.
PE de baja densidad (LDPE)	Muy baja barrera a los gases. Alta barrera al vapor de agua.	Habitual como film flexible. Resistente. Alta calidad del termosellado. De los más utilizados.
PE lineal de baja densidad (LLDPE)	Muy baja barrera a los gases. Alta barrera al vapor de agua.	Muy buena resistencia al impacto, desgarró, tracción, elongación, etc.
PE de alta densidad (HDPE)	Mayor barrera a los gases que el resto de la familia de los PE. Alta barrera al vapor de agua.	Semi transparente. Requiere mayores temperaturas para el termosellado.
Polipropileno (PP)	Baja barrera a los gases, pero mayor que la del PE. Alta barrera al vapor de agua.	Muy ligero. Se pueden fabricar envases rígidos y flexibles. De los más utilizados. Excelente claridad y dureza.
Polipropileno orientado (OPP)	Aumenta la barrera a los gases, respecto al PP. Alta barrera al vapor de agua.	Mejores propiedades ópticas respecto al PP.
Tereftalato de polietileno (PET)	Propiedades moderadas o pobres como barrera a los gases y al vapor de agua.	Resistente, rígido. Gran transparencia.
Cloruro de polivinilo (PVC)	Moderada barrera a los gases. Pobre barrera al vapor de agua.	Alta resistencia a la tensión. Buena transparencia. Material rígido o flexible.

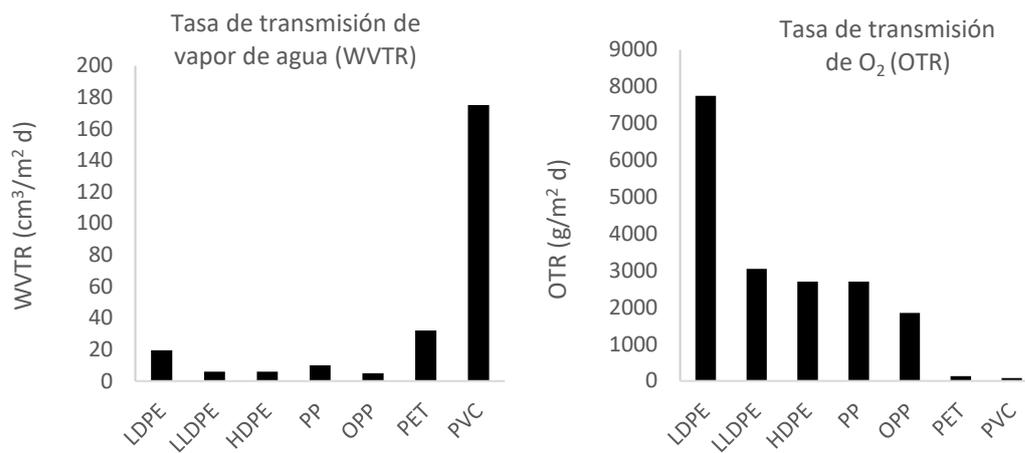


Figura 1. 14. Tasas de transmisión de vapor de agua (38°C y 90% RH) y de O₂ (25°C y 0% RH) representativas de plásticos convencionales para el envasado en atmosfera modificada (Shaikh et al., 2021).

Debido a sus propiedades, funcionalidades y a su bajo costo, los plásticos convencionales se han utilizado ampliamente en la industria alimentaria durante años. Estos materiales transformaron la industria y permitieron su crecimiento. Sin embargo, el envasado de alimentos contribuye de forma negativa y significativa al problema del impacto medioambiental. Cerca del 50% de la producción global de plástico se utiliza en material de embalaje, y de este material el 60% corresponde al envasado de alimentos (Shaikh et al., 2021). Como ejemplo, en la **Figura 1. 15** se muestra el peso que tiene el envasado de alimentos dentro de la demanda de plástico en diferentes sectores del mercado europeo.

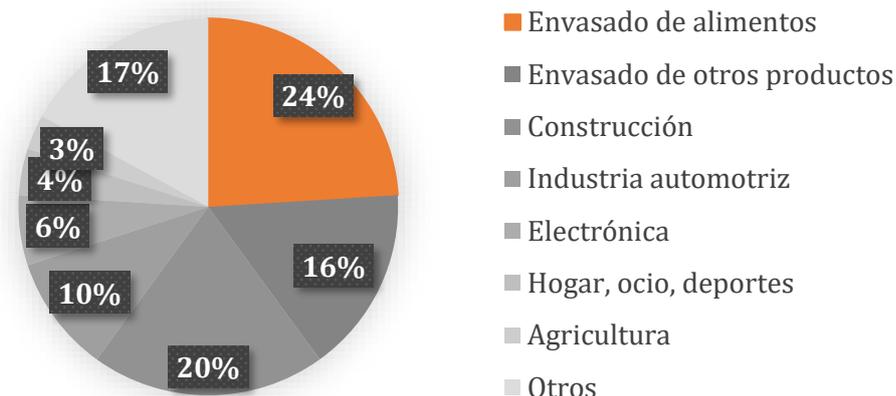


Figura 1. 15. Demanda de plástico en los principales sectores del mercado. Extraído y modificado de Matthews et al. (2021).

El 99% de los plásticos convencionales son producidos a partir de fuentes no renovables mediante procesos de refinación en industrias petroquímicas (Mangaraj et al., 2018). Además, son materiales no biodegradables (no sufren degradación física, química ni biológica) y conducen a un aumento de los desechos generando graves problemas medioambientales y de salud pública (Shaikh et al., 2021b). Por ejemplo, se acumulan en calles y caminos obstruyendo drenajes y generando desbordamiento, se vierten en océanos y ríos dañando la vida submarina, se queman liberando gases nocivos que degradan la calidad del aire y contribuyen al calentamiento global (Mangaraj et al., 2018; Shaikh et al., 2021a). Los problemas generados por la acumulación de residuos plásticos están entre los temas más relevantes en las agendas de los gobiernos a nivel global. Por ejemplo, en 2018, la Unión Europea adoptó estrategias para el plástico en una economía circular que abarca aspectos sobre los materiales que se utilizan, cómo se utilizan y cómo se reciclan. Una de las estrategias específica que para el 2030, todos los envases de plástico colocados en el mercado de la Unión Europea deben ser reutilizables, reciclables de manera rentable o ser biodegradables o compostables (Directiva UE 2019/904). En Uruguay también se han implementado políticas con el objetivo de reducir la generación de residuos plásticos. La Ley de uso sustentable de bolsas plásticas (Ley N° 19655 del 7/1/2019) prohíbe la fabricación, importación,

distribución, venta y entrega, a cualquier título, de bolsas plásticas que no sean compostables o biodegradables (Ley N° 19655, 2019).

En respuesta a las nuevas estrategias y políticas en el sector de los plásticos, se está trabajando en el desarrollo de nuevos materiales y envases de plástico sostenibles. En el caso del envasado de alimentos, estos materiales además de cumplir con las políticas para el control de residuos plásticos, deben tener propiedades y funcionalidades semejantes a los plásticos convencionales, sin comprometer la seguridad, calidad y vida útil de los alimentos (Matthews et al., 2021).

En este contexto, surgen los bioplásticos (también llamados polímeros biodegradables, biopolímeros, polímeros verdes) como alternativa a los plásticos convencionales. Los bioplásticos forman parte de una familia de materiales con diferentes propiedades y aplicaciones. Según *European Bioplastics*, “... un material plástico se define como bioplástico si es de base biológica, biodegradable o presenta ambas propiedades”. En la **Figura 1. 16** se muestra una clasificación de los bioplásticos más comunes a través de un sistema de coordenadas procedencia/biodegradabilidad (European Bioplastics, 2021).

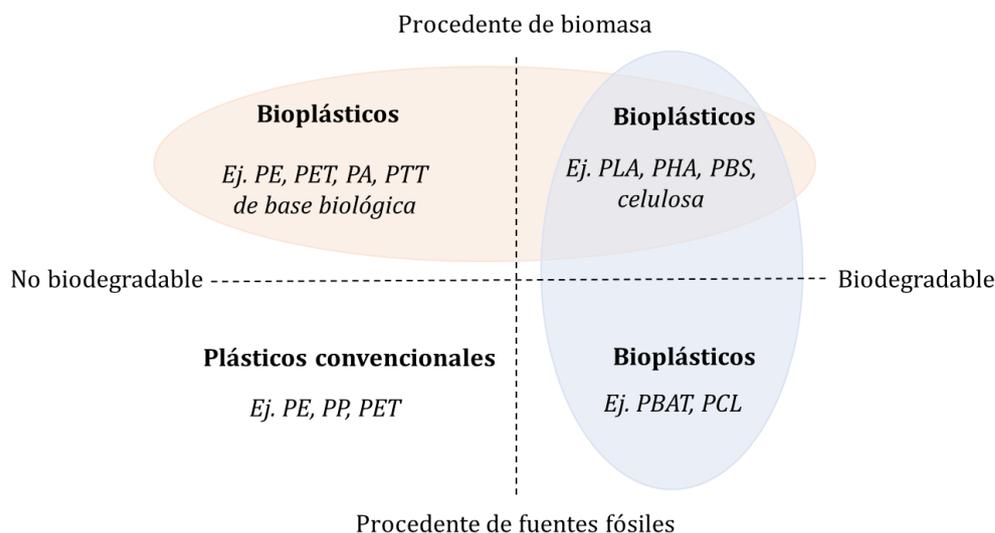


Figura 1. 16. Sistema de coordenadas procedencia/biodegradabilidad, para clasificación de bioplásticos. Extraído y modificado de European Bioplastics (URL: <https://www.european-bioplastics.org/bioplastics/>).

En cuanto a la definición de biodegradabilidad, según la Sociedad Americana para Pruebas y Materiales (ASTM), el plástico biodegradable *“es aquel que se degrada debido a la acción de microorganismos naturales como bacterias, hongos y algas”* (ASTM, 2004). Agua, dióxido de carbono, compuestos inorgánicos y biomasa son los principales productos formados por la descomposición de los plásticos biodegradables.

En la actualidad, estos materiales reemplazan solo un 1% de los plásticos convencionales. Sin embargo, su uso está aumentando a gran velocidad. En 2021, la producción mundial de bioplásticos fue de 2.417 millones de toneladas y se proyecta que para el 2026 la producción se triplique hasta los 7.593 millones de toneladas (European Bioplastics, 2021) (**Figura 1. 17**).

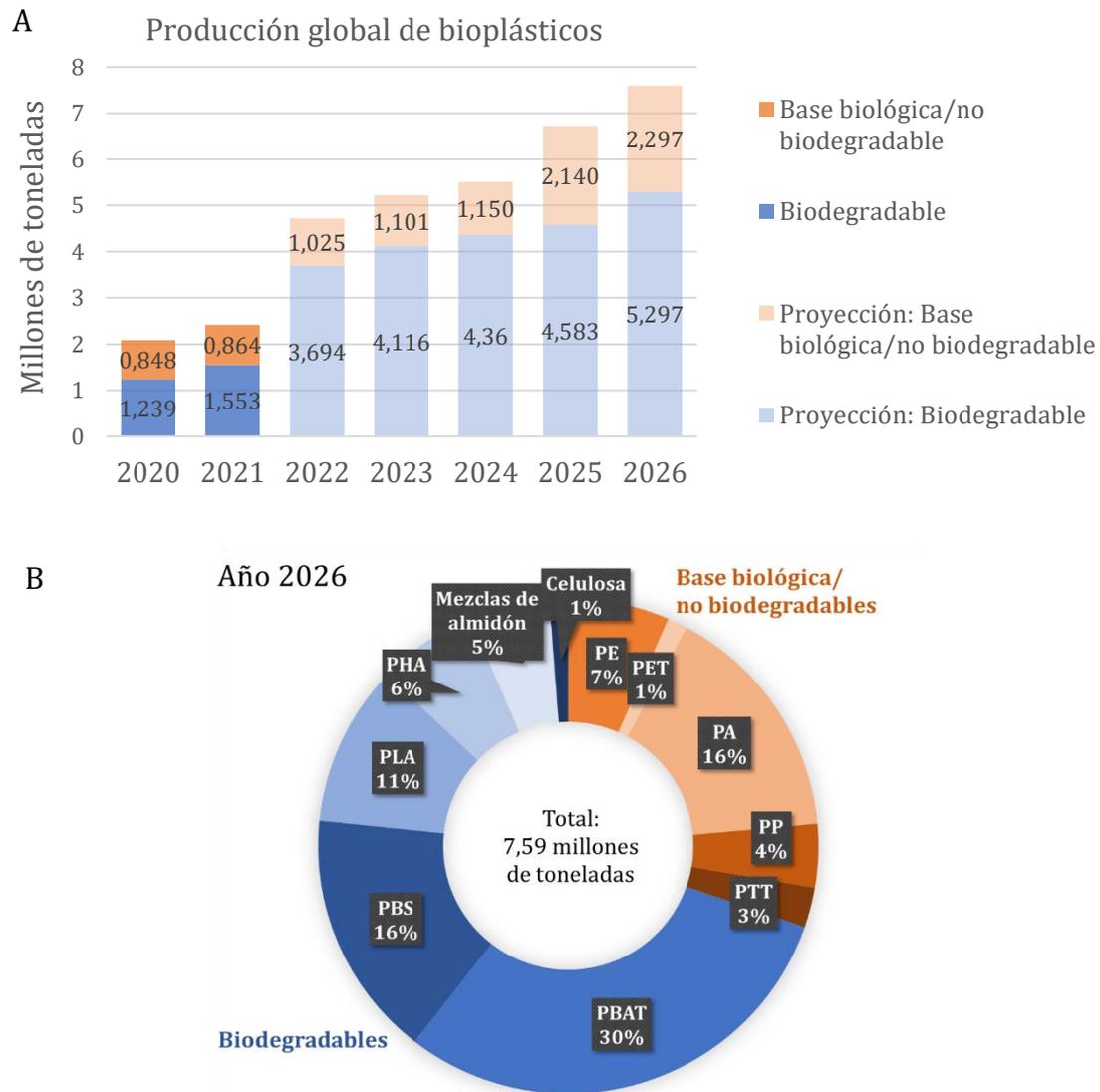


Figura 1. 17. A) Producción global de bioplásticos y su proyección hasta el año 2026. B) Proyección de bioplásticos para el año 2026 por tipo de material. Extraído y modificado de European Bioplastics (2021) (URL: <https://www.european-bioplastics.org/market/>).

El envasado de alimentos es el área de mayor distribución de los bioplásticos, representando aproximadamente el 50% del total global de bioplástico producido. Las actividades de I+D recientes han puesto de manifiesto que estos materiales presentan potencial para sustituir a los plásticos convencionales (Shaikh et al., 2021b). Los bioplásticos se puede aplicar en el envasado en atmósfera modificada, en el envasado activo y como envases comestibles en diferentes productos. Sin embargo, aún son escasas las investigaciones que evalúen los efectos de estos

nuevos materiales en la calidad y composición de los alimentos durante la vida útil, desde la recolección y transporte, hasta el almacenamiento y comercialización. Los polímeros de base biológica y biodegradables más prometedores para el envasado de alimentos son los de celulosa, quitosano, ácido poliláctico (PLA) y los polihidroxicanoatos (PHA) (Khan et al., 2021). En la **Figura 1. 18** se muestran datos recientes de las propiedades de barrera de los bioplásticos con posible aplicación para envasado en atmósfera modificada y una comparativa con los films plásticos convencionales.

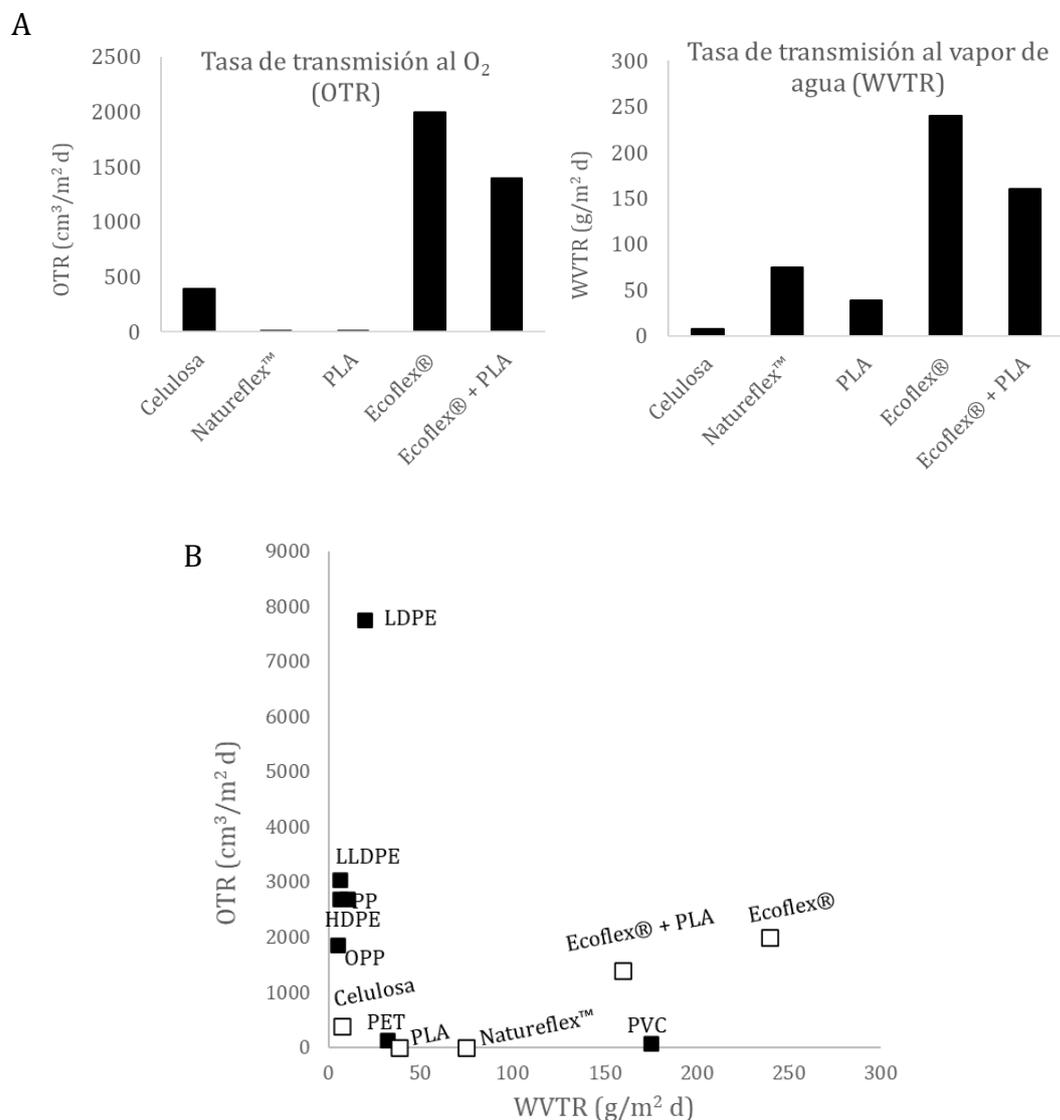


Figura 1. 18. A – Tasas de transmisión al O₂ (OTR) (25°C y 0% RH) y vapor de agua (WVTR) (38°C y 90% RH) de bioplásticos para el envasado en atmósfera modificada. B – Gráfico de OTR vs WVTR para diferentes plásticos convencionales y bioplásticos (Shaikh et al., 2021; Siegenthaler et al., 2011).

1.5.1.1. Bioplásticos evaluados en esta Tesis Doctoral

1.5.1.1.1. Celulosa

La celulosa es uno de los materiales más importantes utilizados recientemente en el procesamiento de polímeros biodegradables para su aplicación en el envasado de alimentos. Es uno de los polímeros más abundantes en la naturaleza, obteniéndose fácilmente de la pared celular de los tejidos vegetales. La celulosa es un polímero lineal formado a partir de unidades repetitivas de celobiosa, que presenta gran potencial para la elaboración de films (Shaikh et al., 2021). Se agrega principalmente como relleno o agente de refuerzo en polímeros, pero también puede emplearse como matriz en la producción de films. Los films de una sola capa a base de celulosa suelen ser flexibles, transparentes, proporcionan barrera selectiva a los gases, barrera al vapor de agua, permiten incorporar o encapsular agentes antioxidantes y antimicrobianos, lo que hace que presenten gran potencial para su aplicación en la preservación de frutas y hortalizas (Y. Liu et al., 2021a). Además, son envases livianos y asequibles. Sin embargo, debido a su naturaleza hidrofílica, las películas a base de celulosa tienen baja resistencia al agua, uno de los principales inconvenientes en muchas de las aplicaciones para envasado de alimentos (Alias et al., 2022b). Los derivados de celulosa más comunes incluyen acetato de celulosa, carboximetilcelulosa, metilcelulosa e hidroxipropilmetilcelulosa. Algunos de los polímeros a base de celulosa disponibles comercialmente incluyen Tenite™ de Eastman, Fasal™ de IFA y Natureflex™ de UCB (Shaikh et al., 2021).

1.5.1.1.2. Ácido poliláctico

Otro de los biopolímeros prometedores para reemplazar los plásticos convencionales en el sector de envasado de alimentos es el ácido poliláctico (PLA). El PLA es un poliéster alifático lineal, que se obtiene principalmente por polimerización de apertura de anillo del monómero de lactida, derivado del ácido láctico. El ácido láctico se obtiene a través de la fermentación de fuentes renovables ricas en carbohidratos como el maíz, almidón de arroz y sacarosa (Siracusa et al., 2008). Las propiedades del PLA se pueden cambiar de cristalino a amorfo cambiando la relación de los monómeros que lo conforman (isómeros L o D). La cristalinidad y contenido de monómeros cambian la tasa de degradación del

polímero donde la degradación más baja se da a un mayor contenido de monómeros. El PLA posee certificado de compostabilidad, cumple con los requisitos de seguridad para su uso en contacto con alimentos y se puede utilizar en la fabricación de films delgados de alta transparencia, características que lo hacen atractivo para su aplicación en alimentos. Sin embargo, presenta una alta permeabilidad al vapor de agua (aproximadamente $2,0 \text{ g mm m}^{-2} \text{ kPa}^{-1} \text{ d}^{-1}$) y muy baja permeabilidad al O_2 y CO_2 (aproximadamente $1,3 \text{ cm}^3 \text{ mm m}^{-2} \text{ kPa}^{-1} \text{ d}^{-1}$) lo que dificulta su aplicación para el envasado de productos hortofrutícolas frescos (Briassoulis & Giannoulis, 2018; Garavito et al., 2022). Por lo tanto, se han propuesto mezclas de PLA con otros compuestos para la obtención de films con propiedades comparables a los convencionales (Mistriotis et al., 2016; Shaikh et al., 2021). Por ejemplo, la empresa BASF (Alemania) comercializa el polímero Ecoflex®, un polímero compuesto de una mezcla de PLA y tereftalato adipato de polibutileno (PBAT), completamente biodegradable, que en el sector de alimentos se usa para la fabricación de bandejas o para el envasado de alimentos de corta vida útil (Siracusa et al., 2008). Actualmente, diferentes empresas comercializan PLA con diferentes nombres comerciales, como Natureworks™ PLA producido por Natureworks™ o Galacid™ de Galacid (Shaikh et al., 2021).

1.5.1.1.3. Tereftalato Adipato de Polibutileno

El tereftalato adipato de polibutileno o poli (butilén adipato-co-tereftalato) (PBAT) es un copoliéster aromático-alifático lineal obtenido de la condensación de 1,4-butanodiol con una mezcla de ácido tereftálico y ácido adípico. Su estructura química está formada por una parte alifática que es responsable de su biodegradabilidad, y una parte aromática que proporciona buenas propiedades mecánicas. Posee alta flexibilidad, elongación y buena procesabilidad, que le permiten ser un compuesto ideal para la obtención de films por extrusión. Concentraciones de ácido tereftálico entre 35 y 55% molar exhibe muy buenas propiedades como material de envasado. A concentraciones superiores al 55% la tasa de biodegradación disminuye. El PBAT se puede mezclar con celulosa, almidón, PLA y otros polímeros biodegradables. Se comercializa bajo el nombre comercial de Ecoflex™ desarrollado por BASF, Origo-Bi™ desarrollado por Novamont, Easter Bio™ desarrollado por Eastman Chemical (Shaikh et al., 2021).

1.5.2. Envases multifunción: Aptitud para el cocinado en microondas

La funcionalidad del envase es otra característica que ha cobrado importancia, y que impulsa el diseño de nuevos materiales y diseños de envases. Un ejemplo es la aptitud del envase para ser usado en el horno de microondas. El cocinado de vegetales con microondas ha ganado popularidad en los últimos años, debido a que es una forma rápida y sencilla de preparar estos alimentos. Las propiedades que deben cumplir los envases para el envasado de frutas y vegetales frescos ya fueron mencionadas. Pero si además el envase debe ser apto para su uso en horno microondas, se debe prestar especial atención a características como: resistencia a las interacciones alimento-envase, resistencia a temperaturas elevadas, resistencia a la presión, funcionalidad/comodidad, entre otras (Regier, 2017). Además, existen necesidades especiales cuando un envase se va a usar en hornos microondas:

- compatibilidad con las microondas (envasado pasivo para microondas)
- interactividad con las microondas (envasado activo para microondas)

La compatibilidad con las microondas significa que la interacción entre las microondas y el recipiente es débil (envasado pasivo) y por lo tanto las microondas atraviesan el envase con una reducción de potencia poco significativa. Por otra parte, los envases pueden diseñarse para interactuar con las microondas (envasado activo), con el fin de crear ciertos efectos como por ejemplo el calentamiento preferencial de la superficie y el dorado.

Envasado pasivo para microondas

El material empleado para este propósito debe tener valores de constante dieléctrica y factor de pérdida dieléctrica pequeños, de forma de que no haya interacción entre el envase y las microondas y no haya reducción de potencia significativa. Otros aspectos que considerar son la migración de componentes desde el envase hacia el alimento (prohibida por las legislaciones alimentarias) y la resistencia a la temperatura. En el calentamiento por microondas las temperaturas más altas se generan dentro del alimento, por lo que está limitada a aproximadamente 100°C. Es decir que materiales que presenten temperaturas de fusión o ablandamiento por encima de esta temperatura podrían considerarse para esta aplicación. Sin embargo, hay factores que pueden aumentar la temperatura de

los alimentos por arriba de 100°C, como el aumento de presión o la composición particular del alimento. Por lo tanto, las opciones de elección del material son acotadas. Los materiales más utilizados son el cartón, cartón con PP (posible hasta 130°C), PET (posible hasta 200 °C), HDPE (punto de fusión 125°C) y PP (punto de fusión 115°C) (Regier et al., 2017).

Entre los diseños, existen los envases con cubierta activa o ventilación. En general están hechos de PE y son pasivos respecto a las microondas, pero activos en cuanto al control de presión y temperatura dentro del envase. El objetivo es regular la presión que se genera debido al vapor de agua y a la expansión de gases por aumento de la temperatura. El efecto de regulación puede llevarse a cabo mediante agujeros en el film (producidos por el fabricante o por el consumidor según las instrucciones del envase), por agujeros que se desarrollan durante el calentamiento por microondas o incluso por válvulas integradas. El efecto deseado es el mismo: las microondas calientan el alimento, el vapor y los gases dentro del envase, esto hace que aumente la presión y se generen condiciones similares a las de una olla a presión. Por lo tanto, se puede lograr una distribución de calor más uniforme combinada con tiempos cortos de calentamiento.

Los vegetales mínimamente procesados están incluidos dentro de los alimentos que se presentan en este tipo de envases doble propósito. Por un lado, se aplica MAP y se almacenan en refrigeración para mejorar su conservación, y posteriormente se pueden introducir directamente al horno microondas para su rápida cocción y consumo. Si bien al principio las tecnologías se enfocaban en la funcionalidad y conveniencia del sistema envase-alimento, en los últimos años se observa una fuerte tendencia para el desarrollo de envases que conserven y mejoren la calidad nutritiva de los alimentos. Por lo tanto, estudiar el efecto de los métodos de cocinado en envases para microondas y cómo afecta el cocinado en envases de microondas a las características nutricionales y bioactivas de los vegetales, es un tema que atrae interés en la investigación y la innovación agroalimentaria.

1.6. Cocinado de alimentos vegetales y efectos en la calidad

1.6.1. Aspectos generales

Los parámetros de calidad de los alimentos generalmente se relacionan con los efectos de la producción primaria y el procesamiento industrial. Sin embargo, el cocinado de alimentos a nivel doméstico, como paso final previo al consumo, también genera un impacto significativo en la calidad. Específicamente en los vegetales, además de los efectos asociados al procesado mínimo, conservación y almacenamiento, resulta necesario determinar el impacto de las metodologías de cocinado en la calidad, sobre todo en el contenido de nutrientes y compuestos bioactivos (Baenas et al., 2019; Hennig & Verkerk, 2014). Es bien sabido que los métodos de cocinado inducen importantes cambios en la composición química y estructura física de los vegetales. Estos cambios no solo afectan su sabor y textura, sino que influyen en la concentración y biodisponibilidad de nutrientes y componentes bioactivos (Sun et al., 2021). Esto puede comprometer las cualidades nutricionales y funcionales de las hortalizas, por lo que resulta relevante determinar métodos y condiciones que permitan preservar el contenido de estos compuestos y su efecto beneficioso para la salud humana (Soares et al., 2017). Existen varios estudios que se han enfocado en este aspecto, los cuales reportan tanto efectos positivos como negativos dependiendo del tipo de compuesto, matriz alimentaria y método de cocción y sus condiciones (Guijarro-Real et al., 2022b; Tabart et al., 2018). Los métodos más usuales para la cocción de vegetales, y por lo tanto los más estudiados, son el hervido, escaldado, cocción al vapor, frito/salteado, horno convencional y horno microondas.

1.6.2. Uso del horno microondas para el cocinado de hortalizas

El uso de microondas en el procesamiento doméstico de alimentos se utiliza cada vez más debido a su capacidad para lograr altas tasas de calentamiento, reducción significativa del tiempo de cocción, calentamiento uniforme, facilidad de operación, bajo costo y bajo mantenimiento. Debido a la reducción del tiempo de cocción, es un método prometedor para conservar la calidad nutricional y organoléptica de diversos alimentos, incluidas las hortalizas (Guo et al., 2017b).

Las microondas son ondas electromagnéticas cuya frecuencia varía dentro de 300 MHz a 300 GHz. Los hornos de microondas doméstico funcionan a una frecuencia de 2,45 GHz, mientras que los sistemas de microondas industriales funcionan a frecuencias de 915 MHz y 2,45 GHz (Chandrasekaran et al., 2013). El calentamiento se produce principalmente debido a mecanismos dipolares e iónicos. Es causado por la interacción del campo electromagnético con las moléculas de carga no nula que conforman el alimento. El campo eléctrico oscilante de alta frecuencia hace que las moléculas dipolares que componen el alimento acompañen los cambios del campo desplazándose (conducción) y/o rotando (polarización). Estos movimientos provocan fricción entre las moléculas generando calor en el interior del alimento y calentándolo (Chandrasekaran et al., 2013; Guo et al., 2017b).

En los últimos años se han realizado investigaciones con el objetivo de determinar los efectos de la cocción por microondas en la calidad de hortalizas, específicamente con crucíferas (Jones et al., 2006; López-Berenguer et al., 2007; Tabart et al., 2018; Vallejo et al., 2003a; G. F. Yuan et al., 2009). Los resultados acerca de los efectos sobre la retención de componentes nutricionales y bioactivos son dispares, probablemente debido a las diferentes condiciones de estudio y de equipos utilizados, así como de la potencia, masa de producto, movilidad del producto dentro del horno, velocidad de calentamiento, adición de agua para la cocción, etc. Además, las características propias del vegetal como las propiedades dieléctricas, profundidad de penetración, contenido de humedad, densidad, geometría, relación superficie/volumen y calor específico también pueden afectar significativamente la calidad nutricional del producto cocinado (Dar et al., 2019).

Por otro lado, la creciente demanda de productos mínimamente procesados ha llevado a las industrias alimentarias a la aplicación de tecnologías novedosas para inactivar enzimas, pero que también tienen efectos adversos sobre la textura, sabor y nutrientes (Liburdi et al., 2019). En este sentido, el uso de microondas se ha estudiado especialmente como alternativa al proceso de escaldado. En publicaciones recientes se indica que, en comparación con el escaldado convencional (en agua), el escaldado por microondas permite: una mayor retención de nutrientes debido a la reducción de las pérdidas por lixiviación, velocidad de

calentamiento más rápida, reducción del tiempo del tratamiento, mayor profundidad de penetración y ahorro de espacio (Liburdi et al., 2019).

A pesar de que la energía de microondas tiene una amplia aplicación y usos en varios procesos alimentarios, la naturaleza compleja de la interacción microondas-alimento hace que se requiera mayor investigación que permita mejorar la comprensión de este sistema. Por otro lado, la mayor concientización en la población para un estilo de vida sana va asociado a una alimentación equilibrada y variada, rica en frutas y hortalizas. Por lo tanto, la necesidad de obtener alimentos de calidad, con un valor nutricional y fitoquímico adecuado, seguros y saludables, es una prioridad y reto de investigación e innovación global.

CAPÍTULO 2.

*Revisión bibliográfica y justificación
del estudio*

2.1. Envasado en atmósfera modificada de brócoli y otras crucíferas

Los efectos beneficiosos del envasado en atmósfera modificada (MAP) de frutas y hortalizas se han estudiado ampliamente (Hussein et al., 2015; Mahajan & Lee, 2023; Opara et al., 2019a). En el caso particular de las crucíferas, son varios los estudios que explican los beneficios del MAP en términos de extensión de vida útil y conservación de parámetros fisicoquímicos y organolépticos. Por ejemplo, Jia et al. (2009) **(1)**, evaluaron la vida útil de floretes de brócoli sin envasar y envasados en polipropileno (MAP), durante el almacenamiento a 4 °C y 20 °C. Para concentraciones de equilibrio de 2 kPa de O₂ y 15 kPa de CO₂, los floretes presentaron una vida útil de 24 días (4 °C) y de 7 días (20 °C), mientras que la vida útil de floretes sin envasar fue de 8 y 2 días, respectivamente (**Tabla 2. 1**). Fernández-León et al. (2013) **(2)**, también estudiaron el efecto del MAP (5 y 10 kPa de O₂ y CO₂ respectivamente) en atributos de calidad de floretes de brócoli durante el almacenamiento a 5 °C. Los floretes MAP retuvieron en mayor medida el peso, color y apariencia general respecto a los almacenados al aire, con una vida útil de 12 días (**Tabla 2. 1**). Lucera et al. (2011) **(3)**, registraron una mayor extensión en la vida útil (mantenimiento de peso y atributos sensoriales) en floretes MAP (14-19 días) respecto a floretes almacenados en aire (6-9 días) a 5 °C (**Tabla 2. 1**). Durante el almacenamiento a 1 °C de cabezas de brócoli, Serrano et al. (2006) **(4)**, observaron una conservación significativamente mayor del peso, color y capacidad antioxidante al aplicar MAP (polipropileno) frente a dejar las inflorescencias expuestas al aire (**Tabla 2. 1**).

De la literatura se desprende que las condiciones recomendadas para extender la vida útil del brócoli y floretes de brócoli son temperaturas de 1-2 °C y presiones parciales de O₂ de 1-3 kPa y de CO₂ de 5-10 kPa (He & Xiao, 2018 (5); Lucera et al., 2011; Opara et al., 2019) (**Tabla 2. 1**). Sin embargo, son pocos los trabajos que citan el efecto perjudicial en la calidad y vida útil del brócoli cuando las condiciones de almacenamiento se alejan de las recomendadas. Además, los rangos de temperaturas y atmósferas recomendados para la conservación del brócoli son estrechos y poco representativos de lo que ocurre en la cadena de suministro (Mahajan & Lee, 2023). En este punto, es importante aclarar que el MAP es una tecnología efectiva para prolongar la vida útil y reducir las pérdidas postcosecha si

se diseña adecuadamente. De lo contrario, puede desencadenar metabolismos no deseados en el tejido vegetal reduciendo significativamente la vida postcosecha. El control de la temperatura durante la cadena de suministro es uno de los problemas más importantes y limitantes de la aplicación de la tecnología de MAP, porque los cambios de permeabilidad de los films y de las tasas de respiración de los productos en respuesta a la temperatura son muy diversos (Mahajan & Lee, 2023). Por lo tanto, un film que genera la atmósfera deseada para un producto determinado a la temperatura óptima de almacenamiento, puede dar lugar a atmósferas extremas y potencialmente dañinas a temperaturas más altas, ya que el aumento de la tasa de respiración supera el cambio en la permeabilidad del envase. En relación a esto, Raffo & Paoletti (2022), mostraron como casi todos los productos muestreados en cadenas de suministro comerciales tenían olores desagradables cuando se analizaban cerca de la fecha de caducidad. A pesar de ello, son escasos los trabajos en la literatura científica que tengan en cuenta estas cuestiones a la hora de diseñar sistemas de envasado para productos hortofrutícolas intactos y/o mínimamente procesados. Se han encontrado algunos trabajos recientes de envasado de crucíferas con este enfoque, como el de Boerzhijin et al. (2020) para kale **(6)** y el de Yuan et al. (2021) **(7)** para col china (pak choi), los cuales se describen en la **Tabla 2. 1**.

Por otro lado, dado que el brócoli es valorado por su alto contenido de compuestos bioactivos y su potencial efecto beneficioso sobre la salud humana, además de la conservación de su calidad externa, es importante evaluar la conservación de sus compuestos bioactivos. Si bien existen varios estudios acerca del efecto del MAP y la temperatura de almacenamiento sobre los compuestos bioactivos del brócoli, aún no está claro como las condiciones de almacenamiento pueden afectar los mecanismos de biosíntesis y degradación postcosecha de estos compuestos. Trabajos recientes de Yang et al. (2022 y 2023) **(8 y 9)** (**Tabla 2. 1**) se han enfocado en el estudio de la expresión de genes relacionados con el metabolismo postcosecha de GSL, para aportar a la comprensión en esta área.

Por otra parte, los resultados publicados en esta temática son diversos y en ocasiones contradictorios (Campos et al., 2019; Yahya et al., 2019). Por ejemplo, algunos autores observaron que el almacenamiento de brócoli MAP a 4 °C mantuvo estable el contenido de GSL, y que el almacenamiento a 20 °C provocó pérdidas

significativas de estos compuestos (Rangkadilok et al., 2002; Rodrigues & Rosa, 1999). Otros autores han observado pérdidas de GSL en brócolis MAP tanto en almacenamiento refrigerado como a temperatura ambiente (Fernández-León, Fernández-León, Lozano, Ayuso, Amodio, et al., 2013; Jia et al., 2009) (**Tabla 2. 1**). Incluso algunos autores dudan de que la temperatura ambiental tenga un efecto significativo sobre el contenido de GLS durante el almacenamiento de brócoli por períodos cortos (Rybarczyk-Plonska et al., 2016) (**10**) (**Tabla 2. 1**). Respecto a la tecnología MAP, Rangkadilok et al. (2002) (**11**), observaron que la retención de glucorafanina en muestras de brócoli almacenadas a 20 °C era mayor cuando se aplicaba MAP (1,5 kPa de O₂ y 6 kPa de CO₂) que cuando se dejaban expuestas al aire (**Tabla 2. 1**). Fernández-León et al. (2013), observaron en floretes de brócoli MAP un mayor contenido de GSL, capacidad antioxidante, vitamina C, β-caroteno, clorofila y contenido total de (poli)fenoles respecto a floretes sin envasar (**Tabla 2. 1**). Schreiner et al. (2007) (**12**), encontraron que las condiciones de 1 kPa de O₂ y 21 kPa de CO₂ eran adecuadas para la conservación de GSL en mezclas de brócoli y coliflor (7 días a 8 °C) (**Tabla 2. 1**). Jia et al. (2009), mostraron que los floretes de brócoli MAP retuvieron el 74% de los GSL totales, mientras que los expuestos al aire retuvieron menos del 50% (**Tabla 2. 1**). Por otro lado, algunos trabajos indican que la modificación de la atmósfera podría incluso aumentar el contenido de GSL como una respuesta al estrés (Pereira et al., 2019 (13); Rybarczyk-Plonska et al., 2016) (**Tabla 2. 1**). A pesar de que existen varios trabajos sobre el tema, las condiciones que permiten conservar los compuestos bioactivos del brócoli no están del todo claras. Además, las condiciones recomendadas son temperaturas de almacenamiento por debajo de 4 °C (no representativas de las cadenas de suministro reales) y concentraciones de O₂ bajas (1-5 kPa) que suponen un riesgo potencial cuando existen abusos de temperatura. En la **Tabla 2. 1** se describen algunos trabajos sobre la aplicación del envasado en atmósfera modificada en brócoli y otras crucíferas, y los principales hallazgos derivados de los mismos.

Tabla 2. 1. Efecto del envasado en atmósfera modificada sobre distintos parámetros de calidad y vida útil de crucíferas. N° corresponde al orden de aparición en el texto.

N°	Producto/ masa (g)	Cultivar	Material de envasado	Tipo de MAP	O ₂ /CO ₂ (kPa)	Tempera- tura de almacena- miento	Tiempo de alma- cena- miento	Principales hallazgos	Referencia
(1)	Floretes de brócoli/ 250	Youxiu	Control sin envasar; PE (e=40µm) sin perforar (M ₀); Microperf. (Ø = 750 µm) (M ₁); Macroperf. (Ø = 8800 µm) (M ₂)	Pasiva	4°C M ₀ : 1-2/14 M ₁ : 5/11 M ₂ : 20/0,04 20°C M ₀ : 2/16 M ₁ : 6/12 M ₂ : 20/0,04	4°C y 20°C	23 d y 5 d	La vida útil a 4°C/20°C fue para el Control 10/2 d; M ₀ 23/7 d; M ₁ : 19/6 d y M ₂ 15/5 d. MAP retardó el deterioro postcosecha. El contenido de GSL disminuyó entre 15% y 56%. M ₀ presentó la mejor performance.	(Jia et al., 2009)
(2)	Floretes de brócoli/ 250	Parthe- non	PP (e=30µm) microperfora- do	Activa: 5 kPa O ₂ + 10 kPa CO ₂	10/5	5°C	12 d	El detrimento del color, apariencia, olor y compuestos funcionales fue menor cuando se aplicó MAP. La pérdida de GSL fue del 20-23% en MAP y de 48-57% en el control.	(Fernández-León et al., 2013)

Tabla 2. 1. Continuación.

N°	Pro- ducto/ masa (g)	Cultivar	Material de envasado	Tipo de MAP	O ₂ /CO ₂ (kPa)	Tempera- tura de almacena- miento	Tiempo de alma- cena- miento	Principales hallazgos	Referencia
(3)	Floretes de brócoli/ 100	n.d.	OPP (e=20µm) OPP (e=40µm) OPP (e=80µm) PP (e=30µm) con 50, 20, 12, 9 y 7 microperf. (Ø = 70µm)	Pasiva	Todos los OPP: <0,5/15 PP7: 10/9 PP9 y PP12: 13/13 PP20: 16/5 PP50: 19/3	5°C	25 d	La selección del film es crucial para crear condiciones que garanticen conservar la calidad. Films micro perforados fueron los más efectivos en mantener el peso y calidad sensorial. La vida útil aumentó 30% respecto al producto sin envasar o sin perforar.	(Lucera et al., 2011)
(4)	Cabeza o pella de brócoli/ 400	Mara- thon	PP sin perforar, micro y macro perforado (bolsas de 30 x 40 cm)	Pasiva	Sin perforar: 5/6 Micro perf. 14/2 Macro perf.: 20/0,07	1°C	28 d	PP sin perforar y micro perforado preservó peso, color, calidad sensorial y AOC de cabezas de brócoli durante 28 d. Cabezas en PP macro perforado tuvieron una vida útil de 5 d.	(Serrano et al., 2006)

Tabla 2. 1. Continuación.

N°	Producto/ masa (g)	Cultivar	Material de envasado	Tipo de MAP	O ₂ /CO ₂ (kPa)	Tempera- tura de almacena- miento	Tiempo de alma- cena- miento	Principales hallazgos	Referencia
(5)	Cabeza de brócoli/ 300	n.d.	poli éter cetona sulfonada (SPEEK)/ fluoruro de polivinilideno (PVDF)	Pasiva	2/8,2	1°C	25 d	MAP extendió la vida útil (25d) respecto al control (15d) y redujo la pérdida de color, textura, clorofila, ácido ascórbico y polifenoles totales.	(He & Xiao, 2018)
(6)	Kale/ 80	n.d.	PP de alta, media y baja OTR. (bolsas de 23 x 40 cm)	Pasiva	Alta OTR: 21/0 Media OTR: 1,9-7,4/ 8,5-9,6 Baja OTR: 0/20	10°C	12 d	La OTR del film de envasado afectó la calidad postcosecha. El envase con OTR media retardó la degradación de color, clorofilas, carotenoides y ácido ascórbico.	(Boerzhijin et al., 2020)
(7)	Pak choi/ 300	n.d.	- BOPP sin perforar; - BOPP macro perforado (Ø = 6000 µm); - BOPP micro perforado (Ø = 100 µm).	Pasiva	sin perforar: 0,2/n.d. macro perf.: 21/0,04 micro perf.: 19/5 (4°C) 8,6/8,5 (20°C)	4°C (7 d) + 20°C (3 d)	10 d	El film microperforado evitó el metabolismo anaeróbico, retrasó el amarilleo, aumentó AOC y mantuvo el sabor del producto 3 d después del almacenamiento refrigerado.	(Yuan et al., 2021)

Tabla 2. 1. Continuación.

N°	Producto/ masa (g)	Cultivar	Material de envasado	Tipo de MAP	O ₂ /CO ₂ (kPa)	Tempera- tura de almacena- miento	Tiempo de alma- cena- miento	Principales hallazgos	Referencia
(8)	Cabeza de brócoli/ 2130	Naihan- Youxiu	PE	Pasiva	n.d.	0°C, 10°C, 20°C	35 d	El amarilleo se retrasó en condiciones de almacenamiento a baja temperatura. El contenido de GSL y sulforafano se correlacionó con la aparición de tonos amarillos.	(Yang et al., 2022)
(9)	Cabeza de brócoli/ 3195	Naihan- Youxiu	PE	Pasiva	n.d.	4°C	25 d	Marcado deterioro de la calidad y pérdida de 75% de GRA. El suministro insuficiente de donantes de azufre sería responsable de la pérdida de GRA.	(Yang et al., 2023)
(10)	Cabezas de brócoli/ n.d.	Mara- thon	PVC (e=10 µm)	Pasiva	n.d.	Prealmace- namiento: 0°C y 4°C Almace- namiento: 10°C y 18°C	10 d	La temperatura de prealmacenamiento afectó el contenido de GSL. Se sugiere la combinación de un prealmacenamiento a 0°C y almacenamiento a 10°C para promover niveles altos de GSL y retrasar la senescencia.	(Rybarczyk- Plonska et al., 2016)

Tabla 2. 1. Continuación.

N°	Pro- ducto/ masa (g)	Cultivar	Material de envasado	Tipo de MAP	O ₂ /CO ₂ (kPa)	Tempera- tura de almacena- miento	Tiempo de alma- cena- miento	Principales hallazgos	Referencia
(11)	Cabezas de brócoli/ n.d.	Mara- thon	LDPE macroperf. (Ø = 8800 µm)	Pasiva	LDPE macroperf. 21/0,03	4°C 20°C	10 d	Primer reporte que demuestra estabilidad de glucorafanina en brócoli MAP y almacenado en refrigeración.	Rangkadiok et al. (2002)
			LDPE microperf. (Ø = 750 µm)		LDPE microperf. <3/>10				
			LDPE continuo		LDPE continuo <3/>10				
(12)	Floretes de brócoli y coliflor/ 200	brócoli: Milady coliflor: Clarke	BOPP (e=30µm) microperf. (Ø = 370 µm)	Pasiva	2 perf.: 1/21 8 perf.: 8/14	8°C	7 d	Se recomienda concentraciones de 1% O ₂ y 21% CO ₂ para el envasado de brócoli y coliflor a 8°C por 7 d. En estas condiciones se mantienen el contenido de GSL indólicos y alifáticos y apariencia externa.	(Schreiner et al., 2007)

Tabla 2. 1. Continuación.

N°	Pro- ducto/ masa (g)	Cultivar	Material de envasado	Tipo de MAP	O ₂ /CO ₂ (kPa)	Tempera- tura de almacena- miento	Tiempo de alma- cena- miento	Principales hallazgos	Referencia
(13)	Kale/ 100	Diplotaxis tenuifolia L.	BOPP	Activa. O ₂ (kPa): 2,5; 5; 10 y 20 (balanceado o con N ₂)	<0,5/5-10	5°C	14 d	La atmósfera afectó los parámetros nutricionales. Las presiones de O ₂ iniciales óptimas fueron: 5 kPa para ácido ascórbico y 20 kPa para ácidos sinápico y ferúlico.	(Pereira et al., 2019)
(14)	Floretes de coliflor/ 150	n.d.	100% BOPP; 20% NF + 80%BOPP; 40% NF + 60%BOPP	Pasiva	100% BOPP: 0,4/28 20% NF: 6/11 40% NF: 17/6	5°C	12 d	La ventana de celulosa reguló la condensación de vapor de agua dentro del envase. La vida útil en film de 100% celulosa estuvo limitada por una crítica pérdida de peso.	(Madonna et al., 2018)
(15)	Floretes de brócoli/ 12	n.d.	Almidón de maíz/goma arábiga/arcilla sepiolita (bolsa de 9 cm x 9 cm)	Pasiva	n.d.	25°C	6 d	El film formulado retardó la pérdida de peso y firmeza de floretes de brócoli.	(Upadhyay et al., 2022)

Tabla 2. 1. Continuación.

N°	Pro- ducto/ masa (g)	Cultivar	Material de envasado	Tipo de MAP	O ₂ /CO ₂ (kPa)	Tempera- tura de almacena- miento	Tiempo de alma- cena- miento	Principales hallazgos	Referencia
(16)	Floretes de brócoli/ 200	Naxos	BOPP (e=25µm) sin perforar y microperf.; 20% NatureFlex + 80%BOPP (20NF) sin perforar y microperf. (bolsas 22 x 26 cm)	Pasiva	BOPP: 0,5/22 BOPP microperf.: 7-8/11-13 20NF: 3-4/13-15 20NF microperf.: 10-11/8-9	10°C	11 d	La ventana de celulosa reguló la humedad y condensación dentro del envase. Los envases sin perforar con ventana de celulosa retuvieron mejor el color y atributos de calidad. Presentaron mayor pérdida de peso respecto a controles sin envasar.	(Caleb et al., 2016)
(17)	Floretes de coliflor/ 150	Star 4405	100% BOPP; 20% NF + 80%BOPP; 40% NF + 60%BOPP	Pasiva	BOPP: 0,4/28 20% NF: 6/11 40% NF: 17/6	5°C	12 d	El film con 20% de NatureFlex presentó mejor retención del color, ácido ascórbico, fenoles y GSL, con una vida útil de 8 d. La composición gaseosa influyó en el contenido de GLS.	(Mashabela et al., 2019)

n.d.: no disponible; NF: NatureFresh™; PE: polietileno; LDPE: polietileno de baja densidad; PP: polipropileno; BOPP: polipropileno biorientado; OPP: polipropileno orientado; PVC: cloruro de polivinilo; PET: tereftalato de polietileno; Ø: diámetro de la perforación; perf.: perforaciones; e: espesor del film; OTR: tasa de transferencia al oxígeno; GSL: glucosinolatos; GRA: glucorafanina.

Teniendo en consideración todos los antecedentes descritos, en esta Tesis Doctoral se propone evaluar distintos films de envasado y condiciones de temperatura de almacenamiento para brócoli, isotérmicas y no isotérmicas, tratando de contemplar escenarios reales de transporte, comercialización y almacenamiento. Se pretende evaluar concentraciones gaseosas generadas usando diferentes films de envasado (envasado pasivo) y temperaturas de almacenamiento, que sean más amplias que las recomendadas actualmente, y que aseguren la calidad externa, seguridad, contenido de compuestos bioactivos y una vida útil adecuada del producto. Se estudiará el efecto del envase y temperatura sobre la calidad global del brócoli, incluyendo parámetros fisicoquímicos, sensoriales y compuestos bioactivos. Se persigue la generación de conocimiento sobre el impacto de estos factores en la evolución de GSL y compuestos fenólicos, y en las correlaciones entre estos compuestos y otros parámetros de calidad fisicoquímicos y organolépticos que no se han encontrado en la literatura científica.

Dentro del desafío de seleccionar materiales de envasado, esta Tesis Doctoral evaluará la aplicación de bioplásticos como una alternativa sostenible para el envasado de brócoli. Como fue mencionado en la Introducción, el desarrollo y aplicación de bioplásticos para el envasado de alimentos es una de las líneas de investigación más relevantes a nivel internacional. En los últimos años se ha investigado la funcionalidad de los bioplásticos frente a los films convencionales, pero los trabajos se han centrado principalmente en las propiedades mecánicas de los films (Briassoulis & Giannoulis, 2018; Ma et al., 2016; Pietrosanto et al., 2020). Los estudios de evaluación de la efectividad de los bioplásticos como materiales de envasado para productos hortofrutícolas todavía son escasos. Recientemente hay un aumento en el número de publicaciones en esta área principalmente sobre films bioplásticos (basados en celulosa y ácido poliláctico) que se han evaluado para el envasado en atmósfera modificada de productos frescos como coliflor (Madonna et al., 2018) **(14)** (**Tabla 2. 1**), papa (Ierna et al., 2017a), granada (Belay et al., 2018), tomate (Patanè et al., 2019) y maracuyá (R. Zhang et al., 2019). Estudios sobre la aplicación de bioplásticos para el envasado de brócoli solo se han encontrado el de Upadhyay et al. (2022) **(15)**, quienes evaluaron un film formulado a base de almidón de maíz, goma arábiga y arcilla sepiolita, y el de Caleb et al. (2016) **(16)** quienes

propusieron un sistema de envasado compuesto por PP y una ventana fija de film de celulosa (NatureFlex™) (**Tabla 2. 1**). Como resultado, los primeros obtuvieron que el film formulado retardó la pérdida de peso y firmeza de floretes de brócoli. Los segundos obtuvieron que la ventana de celulosa ayudó a controlar la humedad relativa y condensación dentro del envase, aunque causó una significativa pérdida de peso respecto a los films convencionales (**Tabla 2. 1**). Mashabela et al. (2019) (**17**) también evaluaron un sistema de envasado que consistía en una ventana de NatureFlex™ en un film de PP para el envasado de floretes de coliflor. Observaron que el envase de 20% de NatureFlex™ y un 80% del PP retuvo mejor el color, apariencia general y fitoquímicos en comparación al sistema de 100% PP (**Tabla 2. 1**). El envasado con bioplásticos también resultó prometedor para tomates mínimamente procesados. Tomates cortados envasados en bandejas de PLA y film de celulosa (NatureFlex™ E946) presentaron mayor vida útil y retención de componentes nutricionales respecto al envasado con materiales convencionales. Los autores concluyeron que el uso de estos materiales para el envasado de productos hortofrutícolas puede ser una alternativa prometedora para reducir el impacto del procesado en el contenido de nutrientes (Patanè et al., 2019). Sin embargo, el mismo material (NatureFlex™ E946) fue empleado para el envasado de papas mínimamente procesadas con resultados no satisfactorios, ya que la migración de agua desde el producto hacia el biopolímero modificó las propiedades de barrera y apariencia, alterando su rendimiento (Ierna et al., 2017a). Zhang et al. (2019) evaluaron el uso de un film de PLA/PBAT para el envasado de maracuyá y encontraron que conservó el sabor, pero no fue satisfactorio respecto a la pérdida de agua, color y encogimiento en comparación con el PE. En consecuencia, todavía hay información limitada acerca de la aptitud y potencial de los nuevos bioplásticos para su uso en el MAP de productos hortofrutícolas. En esta Tesis Doctoral se abordará este aspecto, evaluando la idoneidad de bioplásticos comercialmente disponibles para el envasado de brócoli, determinando su impacto en propiedades fisicoquímicas, organolépticas, componentes bioactivos y vida útil.

2.2. Cocinado de brócoli y retención de compuestos bioactivos

El brócoli es una hortaliza que se consume principalmente cocinada, por lo que además de los efectos asociados al procesado mínimo y almacenamiento, es necesario determinar el impacto de las técnicas de cocinado sobre los compuestos bioactivos, para determinar las condiciones más idóneas para mantener estos compuestos y poder así ejercer su efecto beneficioso para la salud humana (López-Hernández et al., 2022). Son varios los estudios que se han enfocado en determinar los efectos del cocinado en distintos parámetros nutricionales del brócoli, y estos reportan tanto efectos positivos como negativos dependiendo del proceso y las condiciones (Barakat & Rohn, 2014; López-Berenguer et al., 2007; Pellegrini et al., 2010; Soares et al., 2017; Tabart et al., 2018). La comparación entre estudios es difícil debido a que dentro de un mismo método de cocinado son varios los factores que pueden variar, como el tiempo de cocción, temperatura, relación peso del vegetal:agua, tamaño, variedad, entre otros (Hennig & Verkerk, 2014). Los métodos más estudiados para el cocinado de brócoli son hervido tradicional, escaldado y cocinado al vapor, frito o salteado, horno convencional y horno microondas.

Los GSL son compuestos solubles en agua y generalmente se pierden durante la cocción por lixiviación en el agua circundante o bien por su termolabilidad (Tabart et al., 2018). En general, el método de cocción al vapor es el método que ha demostrado mejor retención de GSL. Los trabajos más clásicos indicaban pérdidas de entre un 15 y 40%, dependiendo de factores como tiempo, temperatura y tamaño del vegetal (Soares et al., 2017; Song & Thornalley, 2007). Algunos autores, incluso, habían documentado aumentos en el contenido de GSL con el cocinado al vapor debido a que no existe lixiviación (Zhao et al., 2019), y a que posiblemente la extracción de GSL en ese material vegetal se ve facilitada con respecto al vegetal crudo (Domínguez-Perles et al., 2011). El hervido tradicional es el método que ha resultado más agresivo respecto a la pérdida de GSL, ya que induce pérdidas de entre 40 y 77% de los GSL, siendo uno de los factores determinantes la proporción vegetal:agua (Oliviero et al., 2012; Soares et al., 2017; Tabart et al., 2018).

El cocinado de brócoli en horno de microondas es uno de los métodos con resultados más conflictivos respecto a sus efectos en el contenido de GSL y compuestos fenólicos. La mayoría de las publicaciones presentan pérdidas drásticas en el contenido de GSL, semejantes a las del método de hervido. Por ejemplo, Vallejo et al.

(2003), en uno de los estudios pioneros en esta temática, pusieron de manifiesto reducciones de un 74% de GSL totales en floretes de brócoli cocinados al microondas doméstico durante 5 minutos y con una potencia de 1000 W. La alta tasa de evaporación que presenta este método podría explicar las grandes pérdidas observadas (Jones et al., 2010; Vallejo et al., 2003a; G. F. Yuan et al., 2009). Sin embargo, otros estudios más recientes, ofrecen resultados más positivos sobre el nivel de retención de GSL en brócolis cocinados al microondas (Barakat & Rohn, 2014; López-Berenguer et al., 2007; Soares et al., 2017; Wu et al., 2019). Por ejemplo, Tabart et al. (2018), cocinaron floretes de brócoli durante 19 minutos a una potencia de 950 W (sin agregar agua) y no encontraron diferencias en el contenido de GSL entre brócolis crudos y cocidos. Las discrepancias entre estudios pueden deberse a las condiciones de cocción, ya que son varios los parámetros que pueden variar como los tiempos de cocción, potencia, adición o no de agua, volumen de agua utilizada, tamaño y masa del vegetal, etc. (Barakat & Rohn, 2014).

Las hortalizas mínimamente procesadas y comercializadas en bolsas aptas para cocinado en microondas han ganado popularidad y se han convertido en una tendencia de consumo. Sin embargo, es escasa la información sobre el efecto de este método de cocción en los componentes nutricionales y bioactivos (Zhong et al., 2015, 2017). Los escasos estudios existentes indican que el brócoli cocinado en bolsa para microondas mantuvo su contenido de ácido ascórbico y aumentó su capacidad antioxidante. En cuanto a retención de compuestos nutricionales, la cocción en bolsa fue equivalente a la cocción al vapor, y mejor que la cocción en microondas convencional (sin bolsa). Los autores concluyen que la cocción por microondas y en bolsa es un método que aumenta el valor nutricional, ablanda rápidamente y produce mínimos cambios de color en el brócoli (Zhong et al., 2015, 2017). El efecto del cocinado de brócoli en bolsas para microondas sobre los contenidos de GSL no está suficientemente estudiado. Por lo tanto, un objetivo específico de esta Tesis Doctoral fue evaluar los efectos del cocinado en microondas por ser un método popular, con resultados contradictorios en la literatura y que presenta la variante poco estudiada de la utilización de bolsas microondables.

CAPÍTULO 3.

Objetivos

Esta Tesis Doctoral tiene como objetivo general evaluar los efectos del envasado, almacenamiento y cocinado sobre la calidad (físicoquímica y organoléptica) y los compuestos bioactivos (glucosinolatos y ácidos hidroxicinámicos) del brócoli, como insumo para el diseño de estrategias innovadoras para la extensión de su vida útil y conservación de su potencial saludable. Así, se busca generar nuevos conocimientos que puedan ser utilizados por distintos actores para mantener la calidad de un producto fresco de alta demanda (como es el brócoli) teniendo en cuenta las dimensiones de los impactos a nivel nutricional, medioambiental y económico.

Para alcanzar este objetivo general, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Estudiar el impacto de diferentes films de envasado y temperaturas de almacenamiento sobre la evolución de parámetros de calidad (físicoquímicos y organolépticos), compuestos bioactivos (glucosinolatos y ácidos hidroxicinámicos) y vida útil del brócoli mínimamente procesado durante el almacenamiento postcosecha.
- Evaluar la aplicación de bioplásticos como alternativa a los plásticos convencionales para el envasado y conservación de cabezas o pellas y floretes de brócoli mínimamente procesados.
- Evaluar los efectos del cocinado en horno microondas convencional y empleando bolsas para microondas, en el contenido de componentes nutricionales y funcionales de floretes de brócoli con procesado doméstico e industrial.

CAPÍTULO 4.

Materiales y métodos

En este capítulo se describe como se llevaron a cabo los ensayos de envasado y cocción, y las técnicas analíticas utilizadas para la determinación de los parámetros de calidad estudiados. Los diseños experimentales específicos de cada ensayo serán descritos en los capítulos siguientes.

4.1. Ensayos de envasado

En los ensayos de envasado el material vegetal se procesó de forma semejante a como se haría en la industria, lo que implicó la realización de las siguientes etapas: recepción del material vegetal, selección, pre-lavado, corte, lavado, desinfección, escurrido, centrifugado, pesado, envasado, almacenamiento y muestreo con frecuencias predeterminadas según los distintos tipos de análisis. A continuación, se detalla cómo fueron llevadas a cabo cada una de estas etapas.

Selección

Las cabezas o pellas de brócoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica* Plenck) fueron cosechadas por sus productores en estado de madurez comercial. En las experiencias realizadas en Uruguay se utilizó la variedad “Legacy” (de un productor del departamento de Canelones) y en las experiencias en España la variedad “Marathon” (de la empresa hortofrutícola Grupo Lucas de la Región de Murcia, España) (**Figura 4. 1**). Las cabezas se trasladaron al laboratorio el mismo día de la cosecha y se procedió inmediatamente con su procesamiento. Se seleccionaron cabezas redondas, libres de defectos, uniformes en tamaño y color para conformar un lote homogéneo.

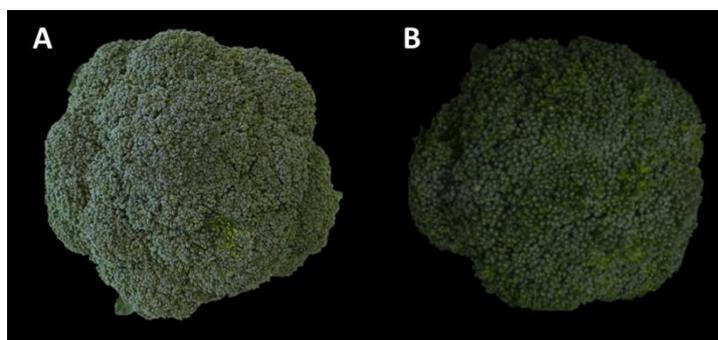


Figura 4. 1. A – Cabeza de brócoli *Brassica oleracea* var. *italica* Plenck cv. Legacy. B – Cabeza de brócoli *Brassica oleracea* var. *italica* Plenck cv. Marathon.

Pre-lavado

Se realizó un prelavado con agua a 2°C para bajar la temperatura y eliminar la

suciedad gruesa.

Corte

Los floretes individuales se obtuvieron realizando cortes limpios con cuchillo de acero inoxidable y separando los floretes del tallo principal (**Figura 4. 2**).



Figura 4. 2. Etapa de corte para la obtención de floretes individuales de brócoli durante los ensayos de envasado.

Lavado y desinfección

El lavado se realizó con agua corriente. Para la desinfección se sumergieron los floretes en una solución de hipoclorito de sodio (NaClO) de 100 ppm durante 2 min (**Figura 4. 3**).



Figura 4. 3. Etapa de lavado y desinfección de floretes de brócoli llevadas a cabo en los ensayos de envasado.

Escurreo y centrifugado

Los floretes se retiraron de la solución desinfectante con un colador, se enjuagaron con agua corriente y se escurrieron durante un minuto. Luego se colocaron en una centrifugadora manual y se centrifugaron por 30 – 45 segundos para eliminar el

excedente de agua.

Pesado y envasado

Los floretes se pesaron y colocaron en bolsas. La masa de brócolis colocada en cada envase, así como el material y dimensiones de las bolsas se detallarán en las secciones correspondientes a cada ensayo. Las bolsas se sellaron con una envasadora con inyección de aire (MAP pasiva) (Supervac GK105/1, Austria) (**Figura 4. 4**).



Figura 4. 4. Floretes de brócoli envasados (unidad experimental) obtenidos luego de las etapas de pesado y envasado.

Almacenamiento

Las bolsas conteniendo los floretes se colocaron en cámaras con control automático de temperatura ($\pm 2^{\circ}\text{C}$) y estantes con ventilación. Las temperaturas de almacenamiento aplicadas se especificarán en las secciones correspondientes a cada ensayo.

Muestreo y conservación de las muestras

Para cada ensayo de envasado se estableció una frecuencia de muestreo. Cada bolsa con floretes de brócoli constituyó una unidad experimental. En cada punto de muestreo se tomaron aleatoriamente 3 o 5 bolsas de cada condición de estudio (muestreo por triplicado o quintuplicado). Los análisis de propiedades físicas y organolépticas se realizaron inmediatamente después del muestreo. Para la determinación de compuestos bioactivos, las muestras fueron congeladas a -18°C , liofilizadas, envasadas en films impermeables al agua y almacenadas en desecadores en obscuridad hasta el día de su análisis.

4.2. Medidas de temperatura y humedad dentro de los envases

Para cada condición de estudio, se colocaron registradores de temperatura y humedad (iButtons, Maxim Integrated Products Inc., California, USA) dentro de 2 unidades experimentales al azar. Se obtuvieron registros de temperatura y humedad cada 4 horas a lo largo del almacenamiento.

4.3. Composición gaseosa del espacio cabeza

Ensayos en Uruguay

La concentración de O₂ y CO₂ se determinó utilizando un analizador de gases Servomex 1450C Food Package Analyzer (Crowborough, Sussex, UK). La aguja del equipo se introdujo en los envases mediante un septo de silicona (para evitar rotura del envase) y el equipo extrajo una muestra de la mezcla gaseosa del espacio cabeza. El equipo realiza la determinación de la concentración de O₂ (%) mediante transductores paramagnéticos y la concentración de CO₂ (%) mediante transductores de infrarrojo. Se realizaron dos medidas por unidad experimental. Los resultados se expresaron como presiones parciales (kPa) de O₂ y CO₂ en el espacio cabeza de los envases.

Ensayos en España

La concentración de O₂ y CO₂ se cuantificaron por cromatografía gaseosa (Shimadzu 14B-GC) según Serrano et al. (2006). Las muestras gaseosas se tomaron con jeringa, introduciendo la aguja en el envase mediante septo de silicona, y posteriormente se inyectaron en el cromatógrafo. Se realizaron dos medidas por unidad experimental. Los resultados se expresaron como presiones parciales (kPa) de O₂ y CO₂ en el espacio cabeza de los envases.

4.4. Pérdida de masa (ML)

El contenido de cada bolsa se pesó individualmente el día de su preparación (m_o) y en cada día de muestreo (m_i). La pérdida de masa se calculó como porcentaje (%) del peso inicial según la siguiente ecuación:

$$ML (\%) = \frac{m_o - m_i}{m_o} * 100$$

4.5. Tasa respiratoria

La tasa de respiración se determinó como tasa de consumo de O₂ (RRO₂) utilizando el método de sistema cerrado (Barrios et al., 2014; Fonseca et al., 2002). Los floretes de brócoli se transfirieron del envase al sistema de medición y se equilibraron a la temperatura de medición (18 ± 2°C) y composición atmosférica. Se colocaron en recipientes herméticos en condiciones de temperatura controlada (18 ± 2°C). El seguimiento de la evolución de O₂ en el interior de los recipientes se realizó durante 10 horas, asumiendo que en este tiempo el producto no envejeció significativamente y que la concentración de O₂ no varió lo suficiente como para influir en la tasa respiratoria. Las mediciones se realizaron por triplicado para cada condición estudiada. La concentración de O₂ en el espacio de cabeza de los recipientes se determinó con analizador de gases Servomex 1450C Food Package Analyzer (Crowborough, Sussex, UK) introduciendo la aguja a través de septos en los recipientes. Se tomó un registro de la concentración de O₂ cada 2 horas. La tasa de respiración se determinó como tasa de consumo de O₂ (RRO₂) calculada utilizando la siguiente ecuación:

$$RRO_2 = \frac{\partial C_{O_2}}{\partial t} * \frac{V_{libre}}{m} * 10^4$$

Donde RRO₂ se expresa como mL kg⁻¹ h⁻¹, C_{O₂} es la concentración de O₂ dentro del recipiente (%v/v), t es el tiempo (h), m es la masa de producto (kg), V_{libre} es el volumen libre dentro del recipiente (m³).

4.6. Color

Se trabajó con el modelo cromático CIELAB. Los parámetros del espacio de color CIELAB (L*, a*, b*, C_{ab} y h_{ab}) se determinaron usando un colorímetro - espectrofotómetro CM 600d (Konica Minolta, Japón). Se siguieron las recomendaciones de la Comisión Internationale de L'Eclariage (CIE, 2004): ángulo estándar del observador 10° e iluminante estándar D65. El área de medición fue de 8 mm y el equipo fue calibrado utilizando una placa reflectora blanca estándar. La medida se realizó sobre 5 floretes de cada unidad experimental, en tres posiciones diferentes. En las cabezas de brócoli se tomaron 6 medidas en 6 posiciones diferentes de cada unidad experimental.

4.7. Textura

El análisis de textura se realizó utilizando un texturómetro TA.XT2i (Stable Micro Systems Ltd., Reino Unido). La celda de carga de 50 kg se calibró con un peso de 5 kg. Se realizaron dos determinaciones de textura: penetración sobre el tallo para evaluar la dureza y compresión sobre la cabeza o floretes para evaluar la compacidad. A continuación, se describen ambos ensayos.

4.7.1. Dureza del tallo

La dureza de los tallos de los floretes se determinó mediante ensayos de penetración sobre los tallos cortados de un centímetro de espesor. El texturómetro se equipó con una sonda cilíndrica de 3 mm de diámetro, que penetró los tallos longitudinalmente (**Figura 4. 5 - A**). Las condiciones de prueba utilizadas para las mediciones fueron: velocidad de pre-test = 2,0 mm s⁻¹; velocidad de test = 1,0 mm s⁻¹; velocidad post-test = 5,0 mm s⁻¹ y distancia de penetración = 5 mm. Los datos de fuerza (N) versus tiempo (s) se registraron utilizando el software Texture Exponent (Versión 3.2, Stable Micro Systems Ltd.). El valor de dureza se determinó como la fuerza máxima registrada en las curvas fuerza vs tiempo. Las mediciones se realizaron en cinco tallos de brócoli por unidad experimental.

4.7.2. Compacidad de la cabeza o del florete

La compacidad de cabezas y floretes de brócoli se determinó mediante ensayos de compresión. El texturómetro se equipó con una placa de compresión de 100 mm de diámetro (P/100) para las cabezas y 75 mm de diámetro (P/75) para los floretes, y se aplicó una deformación del 5% del diámetro de la cabeza o florete (**Figura 4. 5 - B**). La medida se tomó dos veces, girando la cabeza o florete 90° entre medidas para obtener datos en dos ejes. Los valores de firmeza se midieron como la fuerza máxima registrada dividida por el desplazamiento (N mm⁻¹). La medida se realizó sobre 5 floretes de cada unidad experimental y sobre todas las cabezas de brócoli, promediando las medidas y obteniendo un único valor por unidad experimental.

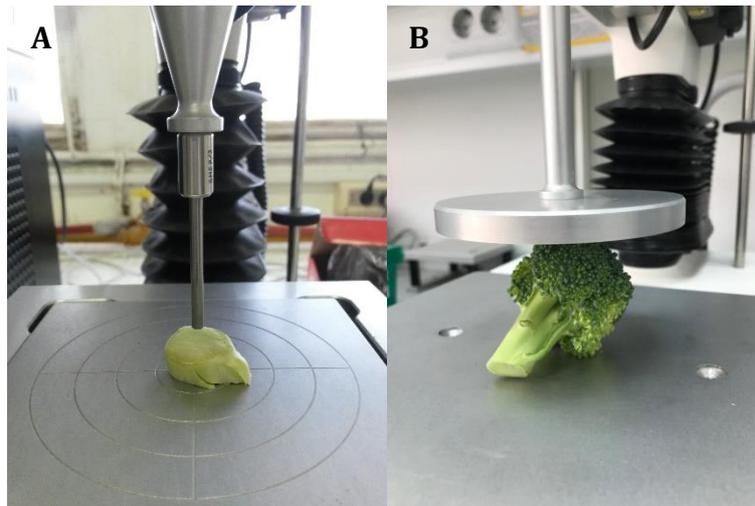


Figura 4. 5. Ensayos para determinación de textura. A – Ensayo de penetración para determinación de dureza del tallo. B – Ensayo de compresión para determinación de compacidad.

4.8. Evaluación sensorial

Los atributos evaluados fueron: apariencia externa, color y olor, y fueron seleccionados de acuerdo a la experiencia previa del grupo de investigación. Cada atributo se calificó individualmente utilizando una escala subjetiva del 1 al 5. La evaluación fue llevada a cabo por un panel de siete miembros, con experiencia previa en evaluación sensorial de vegetales, que fue entrenado especialmente para la evaluación de brócoli fresco. Los evaluadores fueron capacitados con muestras de brócoli generadas en distintas condiciones de tiempo (0 a 5 días) y temperatura de almacenamiento (5 y 20°C). En una primera sesión, a través de una discusión abierta con el líder del panel, los evaluadores acordaron la escala de calificación para diferenciar la apariencia, el olor y el color de las muestras. En sesiones sucesivas, los evaluadores fueron capacitados utilizando muestras generadas en diferentes condiciones de almacenamiento.

Durante los ensayos, las evaluaciones se realizaron inmediatamente después de retirar el brócoli de las condiciones de almacenamiento. Se presentaron muestras codificadas (3 dígitos) en orden aleatorio a los miembros del panel que realizaron evaluaciones independientes por muestra. La escala de calificación para la apariencia fue: 5 = excelente, como recién cosechado; 4 = muy bueno, defectos menores; 3 = defectos regulares y moderados; 2 = pobre, defectos importantes; y 1 = muy pobre, no comestible. En el caso del olor: 5 = olor típico, fresco; 4 = olor

extraño ligero; 3 = olor extraño moderado; 2 = olor extraño más que moderado; 1 = olor extraño fuerte, desagradable. En el caso del color: 5 = verde oscuro; 4 = verde, trazas de amarillo; 3 = verde claro, ligeramente amarillo; 2 = verde claro, muy amarillo y 1 = amarillo. Se consideró una puntuación de 3 como límite de comerciabilidad (Fernández-León, Fernández-León, Lozano, Ayuso, Amodio, et al., 2013; Winkler et al., 2007).

4.9. Calidad microbiológica

10 g de cada unidad experimental se colocaron asépticamente en una bolsa Stomacher estéril con 90 mL de Agua Peptonada Tamponada (PW) (Scharlab, Barcelona) y se homogeneizaron en un Stomacher. Las muestras se analizaron en busca de bacterias aerobias mesófilas, bacterias aerobias psicrótroficas y mohos y levaduras. Para el análisis de bacterias mesófilas y psicrótroficas se utilizó recuento en placa de agar (PCA) (Scharlab, Barcelona) y se incubó durante 24-48 h a 30°C y durante 7 días a 5°C, respectivamente. Se utilizó Agar Rosa de Bengala Cloranfenicol (RB) (Scharlab, Barcelona) para mohos y levaduras y se incubó durante 5 d a 25°C. Los resultados se expresaron como unidades formadoras de colonias por gramo de peso fresco (ufc g⁻¹). Las determinaciones se realizaron por triplicado.

4.10. Contenido de glucosinolatos (GSL) y ácidos hidroxicinámicos (HCA)

4.10.1. Obtención de extractos

La extracción de GSL y HCA se realizó según Baenas et al. (2016). A 50 mg de muestra liofilizada y molida se le adicionó 1 mL de metanol (70 % v/v) e inmediatamente se calentó la mezcla a 70 °C durante 30 min en un baño calefactor, agitando con vórtex cada 5 min. Después del calentamiento, las muestras se colocaron en hielo por 5 min, se centrifugaron (17500 × g, 15 min, 4 °C) y el sobrenadante fue recolectado y filtrado a través de filtros Millex-HV13 de 0,22 µm (Millipore, Billerica, MA, USA) y colocado en viales de cromatografía para su análisis. Las extracciones y análisis se realizaron por triplicado para cada condición de estudio (3 réplicas genuinas).

4.10.2. Identificación de GSL y HCA

La identificación de GSL y HCA se realizó según Abellán Victorio (2022) y Baenas et al. (2016). GSL y HCA se identificaron a partir de sus iones parentales (m/z [M-H]), patrones de fragmentación (m/z MS², MS³), espectros de absorción UV-visible, tiempos de retención y orden de elución. Se utilizó un HPLC-DAD-ESI-MSⁿ (Agilent Technologies HPLC 1200, Waldbronn, Alemania) acoplado en serie a un detector de masas Bruker de trampa de iones (UltraHCT, Bremen, Alemania) (**Figura 4. 6**). Se utilizó una columna Luna C18 100A (250 x 4.6 mm, 5 μ m de tamaño de partícula; Phenomenex, Macclesfield, Reino Unido) y método de elución por gradiente con dos fases móviles. Fase móvil A: agua/ácido fórmico (99:1, v/v); Fase móvil B: acetonitrilo (100%). El volumen de inyección fue de 20 μ L y el flujo constante de 0.8 mL/min con gradiente lineal según los siguientes parámetros (t (min) - %B): 0'-1%, 17'-17%, 20'-17%, 25'-25%, 32'-35%, 37'-40%, 42'-50%, 45'-99%. El rango de análisis de los espectros de masas fue desde m/z 50 a 1200, estableciéndose los parámetros de ionización de acuerdo con las indicaciones del fabricante: temperatura 350°C, voltaje del capilar 4 kV, presión del nebulizador 65.0 psi y flujo de nitrógeno 11 L/min.



Figura 4. 6. Cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC-DAD-ESI-MSⁿ) acoplado a trampa de iones, utilizado para la identificación de glucosinolatos y ácidos hiroxicinámicos.

4.10.3. Cuantificación de GSL y HCA

Una vez identificados los compuestos, la cuantificación se realizó en un HPLC-DAD (Waters Cromatografía SA, Barcelona, España), con columna Luna C18 100A (250 x

4.6 mm, 5 μm de tamaño de partícula; Phenomenex, Macclesfield, Reino Unido) y método de elución por gradiente con dos fases móviles. Fase móvil A: agua desionizada/ácido trifluoroacético (99.9/0.1 v/v); Fase móvil B: acetonitrilo/ácido trifluoroacético (99.9:0.1). El volumen de inyección, flujo y gradiente fueron los mismos que en 4.10.2. Los cromatogramas se registraron a 227 nm y 330 nm para GSL y HCA respectivamente. Se utilizaron patrones de sinigrina y glucobrassicina (Phytoplan, Alemania) para la cuantificación de glucosinolatos alifáticos e indólicos respectivamente, y ácido clorogénico y sinápico (Sigma, St. Louis, MO, USA) para cuantificación de HCA. Los resultados se expresaron en μmol por gramo de materia seca ($\mu\text{mol g}^{-1}$).

4.11. Capacidad antioxidante

4.11.1. Obtención de extractos

La extracción se llevó a cabo según Baenas et al. (2012) con algunas modificaciones. A 100 mg de muestra liofilizada y molida se adicionó 1,5 mL de metanol (70% v/v) y se introdujo la mezcla en baño de ultrasonido (Cole Parmer, USA) por 60 min, agitando cada 20 min en vórtex. Los extractos fueron almacenados en oscuridad y refrigeración durante 16 horas. Luego del almacenamiento, se sonicaron durante 60 min, se centrifugaron a $10500\times\text{g}$ durante 5 min, y el sobrenadante fue extraído para realizar los análisis por ABTS, DPPH y ORAC. Las extracciones y análisis se realizaron por triplicado para cada condición de estudio (3 réplicas genuinas).

4.11.2. Método ABTS

El análisis por ABTS se realizó siguiendo el método desarrollado por Re et al. (1999) con ligeras modificaciones. El radical ABTS ($\text{ABTS}^{\bullet+}$) (2,2-azinobis-[3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico]) se originó haciendo reaccionar 10 mL de solución madre de ABTS 7mM (Sigma Adrich, Alemania) con 10 mL de solución de $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 2,45 mM. La mezcla se dejó en la oscuridad y a temperatura ambiente durante 16 horas. La solución utilizada para el análisis se preparó tomando un volumen de la solución anterior y diluyéndolo en etanol hasta que su absorbancia a 734 nm fuera de $0,70 \pm 0,02$. La reacción tuvo lugar directamente en la cubeta de medición. Se añadieron 3 mL de radical ABTS y 100 μL de extracto o estándar, se dejó reaccionar

por 5 min y se tomó la medida de absorbancia a 734 nm en espectrofotómetro (UV-Mini 1240, Shimadzu Corp., Japón). Para la cuantificación, se preparó una curva de calibración de Trolox (Sigma Adrich, Alemania) en un intervalo de concentración de 0 - 320 μM . Los resultados se expresaron como μmol equivalentes de Trolox por gramo de materia seca ($\mu\text{mol g}^{-1}$).

4.11.3. Método DPPH

El análisis por DPPH se realizó siguiendo el método desarrollado por Brand-Williams et al. (1995) con algunas modificaciones según Mena et al. (2011). Las reacciones fueron iniciadas agregando 2 μL del extracto al pocillo con 250 μL de solución madre de DPPH (0,04 g L^{-1}). Los cambios de absorbancia a 515 nm después de 50 min de reacción fueron medidos usando microplacas de 96 pocillos (Nunc, Roskilde, Denmark) y un lector de microplacas Infinite® M200 (Tecan, Grödig, Austria). Para la cuantificación, se preparó una curva de calibración de Trolox (Sigma Adrich, Alemania) en un intervalo de concentración de 0 - 200 μM . Los resultados se expresaron como μmol equivalentes de Trolox por gramo de materia seca ($\mu\text{mol g}^{-1}$).

4.11.4. Método ORAC

El ensayo de ORAC se realizó de acuerdo con Ou et al. (2002) utilizando microplacas de 96 pocillos (Nunc, Roskilde, Dinamarca) y un lector de microplacas Infinite® M200 (Tecan, Grödig, Austria). Los análisis se realizaron en buffer fosfato pH 7,4 a 37 °C. El radical peroxilo se generó utilizando diclorhidrato de 2, 2'-azobis (2-amidino-propano). Se utilizó fluoresceína como sustrato. Las condiciones de fluorescencia fueron: excitación a 485 nm y emisión a 520 nm. Se utilizó una curva de calibración de Trolox en un intervalo de concentración de 10 - 200 μM . Los resultados se expresaron como μmol equivalentes de Trolox por gramo de materia seca ($\mu\text{mol g}^{-1}$).

4.12. Contenido de clorofilas y carotenoides

Se determinaron clorofila a y b, y carotenoides totales según Serrano et al. (2006). Las muestras liofilizadas se extrajeron con acetona (75% v/v) y se centrifugaron (AOAC 942.04-1942). Se registró la absorbancia de los extractos a 647 y 664 nm

para clorofilas y a 470 nm para carotenoides totales, usando un espectrofotómetro (Bio-Tek Instruments, Vermont, EE. UU). La concentración de pigmentos en los extractos se calculó con las siguientes formulas y los resultados se expresaron en mg g⁻¹ de materia seca (Lichtenthaler, 1987).

$$\text{Clorofila } a \text{ (Chl } a) = 12,25A_{664} - 2,79A_{647}$$

$$\text{Clorofila } b \text{ (Chl } b) = 21,50A_{647} - 5,10A_{663}$$

$$\text{Clorofilas totales} = 7,15A_{664} - 18,71A_{647}$$

$$\text{Carotenoides totales} = (10005A_{470} - 1,82\text{Chl } a - 85,02\text{Chl } b)/198$$

4.13. Minerales

En los ensayos de cocción se determinó el contenido de minerales. Se analizó la concentración de boro (B), calcio (Ca), potasio (K), magnesio (Mg), sodio (Na), fósforo (P) y azufre (S), en muestras de brócoli liofilizadas y molidas (100 mg). Las muestras fueron digeridas en un horno de microondas (CEM Mars Xpress, Carolina del Norte, EE. UU) mediante digestión ácida con HNO₃ - HClO₄ (2:1). La determinación de minerales se llevó a cabo utilizando un espectrofotómetro de emisión ICP modelo 5500 de Perkin-Elmer (Waltham, MA), a 589 nm, utilizando un detector de conductividad y cuantificador por comparación con patrones auténticos (Servicio de Ionómica, CEBAS-CSIC, Murcia, España). Los contenidos se expresaron en g/100 g y mg/kg de peso seco, dependiendo del mineral.

4.14. Actividad mirosinasa por HPLC-UV

4.14.1. Selección de la técnica

Se adaptó y puso a punto una técnica de determinación de actividad mirosinasa propuesta por Pardini et al. (2021). La técnica consiste en la extracción de la enzima en extracto acuoso y posterior determinación de la actividad mirosinasa por HPLC-UV.

Se seleccionó esta técnica por presentar las siguientes ventajas:

- La extracción de la enzima se realiza en extractos acuosos, condición que representan mejor las condiciones fisiológicas del tejido vegetal y elimina la necesidad de una purificación preventiva de la enzima.

- Se pueden caracterizar muestras con una alta actividad mirosinasa ya que el rango operativo fiable del HPLC es más amplio respecto al que permite la espectrofotometría tradicional.
- La cromatografía permite cuantificar directamente el glucosinolato objetivo, eliminando interferencias dadas por otros compuestos presentes.

4.14.2. Extracción de mirosinasa endógena

A 250 mg de muestra de brócoli liofilizada se agregó 5 mL de buffer fosfato 100 mM (pH 6) y se agitó en vórtex. La mezcla se sonicó durante 30 min a temperatura controlada de 22 ± 2 °C para tratar de asegurar la extracción completa de la enzima, y luego se incubó durante 2 hs a 37 ± 1 °C para asegurar la hidrólisis total de glucosinolatos endógenos. La mezcla se centrifugó (15 min, 2647 g), se colectó el sobrenadante y se almacenó a 4°C.

4.14.3. Determinación de actividad mirosinasa

Como sustrato se utilizó glucobrasicina (Phytoplan, Alemania). Se preparó una solución madre de glucobrasicina 2 mM. A 500 µL del extracto de la enzima se le agregó 200 µL de solución madre y se llevó a 1 mL con agua desionizada (concentración final del sustrato 400 µM). Los blancos se realizaron con el mismo procedimiento, pero reemplazando el extracto de mirosinasa por buffer fosfato. La mezcla se incubó 30 min a 37 °C. La reacción se detuvo incorporando 4 mL de metanol a 80°C. Posteriormente, la mezcla fue almacenada 1-2 horas a 4°C, centrifugada (10 min, 1500 rpm), el sobrenadante fue recolectado, filtrado (Millex-HV13 de 0,22 µm) y colocado en viales para su análisis por HPLC. El análisis se realizó como se describe en 4.10.3. La actividad mirosinasa se expresó en micro moles de glucobrasicina hidrolizada por minuto, por gramo de material vegetal seco ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$), calculada a partir de la siguiente ecuación:

$$v \left(\frac{\mu\text{mol}}{\text{min g}} \right) = \frac{(A_{\text{Blank}} - A_t)}{m * t} * \frac{V_{\text{tot}}}{V_{\text{ext}}} * \frac{V_{\text{SE}}}{M} * 1000$$

Donde:

A_{Blank} : area del pico de glucobrasicina correspondiente al blanco

A_t : area del pico de glucobrasicina luego de 30 min de reacción

m : pendiente de la curva de calibración de glucobrasicina

t: tiempo de reacción (min)

V_{tot} : volumen total de la mezcla de reacción (0,001 L)

V_{ext} : volumen de extracto de mirosinasa usado en la reacción (500 μL)

V_{SE} : volumen de buffer usado en la extracción (μL)

M: masa de material vegetal liofilizado usado en la extracción (mg)

4.15. Ensayos de cocción

4.15.1. Brócoli procesado domésticamente

Brócolis (cv. Parthenon) se compraron en un supermercado local (Murcia, España), se trasladaron al laboratorio y se procesaron inmediatamente. Las cabezas de brócoli se cortaron en floretes, se lavaron con agua corriente y se centrifugaron en una centrífuga de vegetales doméstica. Aproximadamente 200 g de floretes se colocaron en bolsas aptas para el cocinado en microondas y se cocinaron en un horno microondas doméstico durante 3 y 5 minutos a 800 W. Como control se utilizó el producto cocinado en las mismas condiciones, pero sin bolsa (microondas convencional). Todos los tratamientos se realizaron por triplicado.

4.15.2. Brócoli procesado industrialmente

Se usaron brócolis (cv. Parthenon) mínimamente procesados (cortados en floretes, sanitizados y envasados en bolsas aptas para microondas) provistos por la empresa Verdisfresh - Grupo Alimentario Citrus (GAC) (Valencia, España). Los brócolis fueron enviados al laboratorio en condiciones de refrigeración y los ensayos se realizaron inmediatamente. Los tratamientos de cocción fueron análogos a los descritos en 4.15.1.

4.16. Análisis estadístico de los datos

4.16.1. Estudios de envasado

Los datos se analizaron mediante análisis de varianza (ANOVA), considerando como factores de variación: material de envasado, nivel de perforación, temperatura y tiempo de almacenamiento, según cada ensayo. Cuando existieron diferencias significativas, las medias se compararon mediante test de Tukey ($p \leq 0,05$). En todos los casos se verificó la distribución normal de los errores mediante test de Shapiro-

Wilk ($p \leq 0,05$) y la homogeneidad de las varianzas mediante test de Bartlett ($p \leq 0,05$). Los análisis se realizaron con el paquete “agricolae” del software R versión 4.1.2.

Para evaluar la relación entre las variables estudiadas se llevó a cabo un Análisis de Componentes Principales (PCA) basado en la matriz de correlación. Como criterio de selección del número de componentes principales se consideraron los primeros componentes que explicasen más de un 70% de la varianza total de los datos. Los análisis se realizaron con el paquete “FactoMiner” del software R versión 4.1.2.

4.16.2. Estudios de cocción

Los datos se analizaron mediante ANOVA, considerando como factores de variación: método de cocción y tiempo de cocción. Cuando existieron diferencias significativas, las medias se compararon mediante test de Tukey ($p \leq 0,05$). Se realizó un ANOVA de una vía seguido por un test de Dunnett ($\alpha = 0,05$) para comparar cada tratamiento contra la muestra de brócoli fresco (sin cocinar). En todos los casos se verificó la distribución normal de los errores mediante test de Shapiro-Wilk ($p \leq 0,05$) y la homogeneidad de las varianzas mediante test de Bartlett ($p \leq 0,05$). Los análisis se realizaron con software XLSTAT (Statistical and data analysis solution, USA).

CAPÍTULO 5.

Estrategia

5.1. Ensayos de envasado

Se diseñaron ensayos de envasado en atmosfera modificada pasiva para estudiar los efectos del almacenamiento y envasado en parámetros de calidad fisicoquímicos y organolépticos, y en el perfil y contenido de compuestos bioactivos de brócoli. Los factores estudiados fueron:

- Temperatura de almacenamiento
- Material del film de envasado
- Nivel de microperforación de los films de envasado

5.1.1. Selección de temperaturas de almacenamiento

Para los ensayos se seleccionaron temperaturas de entre 2°C y 15°C con el objetivo de contemplar las siguientes condiciones:

Rangos de temperaturas	Condición	Referencia
2-4°C	Temperaturas recomendadas de transporte y comercialización	(Castro-Ibáñez et al., 2017)
6-10°C	Temperaturas habituales de los refrigeradores comerciales y domésticos	(Matar et al., 2021)
12-15°C	Temperaturas abusivas que pueden alcanzarse durante el suministro	(Ndraha et al., 2018)

Se llevaron a cabo ensayos en condiciones de almacenamiento isotérmico y con aumento de temperatura intentando simular condiciones habituales en el ciclo de vida del producto.

5.1.2. Selección del material de envasado

5.1.2.1. Plásticos convencionales

La selección del material de envasado se realizó en base a experiencias preliminares donde se evaluaron films de PE (polietileno) y PP (polipropileno), perforados y sin perforar, que son materiales que se utilizan comúnmente para el envasado de frutas y hortalizas. Se seleccionó PP perforado (perforación mecánica con una aguja

hipodérmica de 600 μm de diámetro) por ser el material que presentó mejores resultados para el envasado de floretes de brócoli (**Tabla 5. 1**).

Dado que el brócoli es un producto de alta tasa respiratoria, y por lo tanto proclive a alcanzar concentraciones de O_2 y CO_2 extremas y perjudiciales, esta Tesis Doctoral puso foco en evaluar films perforados y en estudiar el efecto del nivel de perforación del film en los distintos parámetros de calidad. Para esto se seleccionaron films de BOPP (polipropileno biorientado), con dos líneas de micro perforaciones láser (de 100 μm de diámetro) y tres niveles de separación entre perforaciones: 15 mm (BOPP-CAD15), 30 mm (BOPP-CAD30) y 45 mm (BOPP-CAD45) (**Tabla 5. 1**). La selección del material y niveles de perforación se realizó tomando en cuenta los siguientes aspectos:

- Se estimó un rango de tasas de transferencia al O_2 (OTR) requeridas para alcanzar concentraciones de O_2 de equilibrio moderadas (próximas a 10 kPa) en distintas condiciones de temperatura (4-15°C). Para ello se emplearon datos de tasa respiratoria de floretes de brócoli determinadas en el laboratorio a temperaturas de 4, 10 y 15°C. Se empleó la siguiente ecuación, que corresponde a un balance de O_2 global en el sistema en estado estacionario:

$$OTR = \frac{RR_{O_2} * m}{A * \frac{(p_{O_2ext} - p_{O_2})}{RT}}$$

Donde:

OTR es la tasa de transferencia de O_2 del film ($\text{cm}^3 \text{ m}^{-2} \text{ d}$)

RR_{O_2} es la tasa respiratoria ($\text{mol kg}^{-1} \text{ d}^{-1}$)

m es la masa de producto envasado (kg)

A es el área de transferencia (m^2)

p_{O_2ext} es la presión parcial de O_2 en el ambiente (kPa)

p_{O_2} es la presión parcial de O_2 en el interior del envase (kPa)

R es la constante de los gases ideales ($\text{cm}^3 \text{ kPa mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$)

T es la temperatura (K)

El rango de OTR estimado fue de 4.000 - 25.000 $\text{cm}^3 \text{ m}^{-2} \text{ d}$.

- Se realizó una visita a la planta PDS Group (Murcia, España), quienes se especializan en la fabricación de films para el sector hortofrutícola, incluyendo productos IV gama. En base a su experiencia, posibilidades de fabricación y rango de OTR estimado se seleccionaron los films de BOPP con los niveles de perforación mencionados.

Para el estudio en cabezas de brócoli se empleó un film estirable y autoadherente de LLDPE (polietileno lineal de baja densidad), que es el mismo material que utiliza el productor (Grupo Lucas, Murcia, España) para la distribución y comercialización del producto (**Tabla 5. 1**).

5.1.2.2. Bioplásticos

Se evaluaron bioplásticos que estuvieran comercialmente disponibles en Uruguay y/o España, de costo asequible y que presentaran potencial para el envasado de hortalizas. Se seleccionaron: Nature Fresh® y NatureFlex™.

Nature Fresh®

Nature Fresh® es un film transparente, estirable y autoadherente, fabricado por Fabbri Group CO (Italia) a partir de Ecovio® y Ecoflex®, polímeros producidos por BASF (Alemania). Ecovio® y Ecoflex® son polímeros completamente biodegradables compuestos por PBAT (tereftalato adipato de polibutileno) y PBAT/PLA (ácido poliláctico), respectivamente. Nature Fresh® es una mezcla de Ecovio® y Ecoflex® cuya composición final es PBAT > 95% y PLA < 5%. Las propiedades de barrera se muestran en la **Tabla 5. 1**. Se evaluó la idoneidad de este material para el envasado individual de cabezas de brócoli.

NatureFlex™

NatureFlex™ es fabricado por Futamura Group (Reino Unido) y consiste en un núcleo de celulosa regenerada y transparente, recubierto por ambos lados con poli(alcohol vinílico) y cloruro de polivinilideno. Se encuentra certificado como compostable en la industria (normas EN 13432, EN 14995, AS4736, ASTM D6400 y ISO 17088) y en el hogar (normas AS5810)(NatureFlex™, n.d.). Las propiedades de barrera se muestran en la **Tabla 5. 1**. Para los estudios se utilizaron bolsas confeccionadas por el fabricante (dimensiones de 17 cm x 20,5 cm, de 23,3 µm de espesor) que se utilizaron para evaluar la idoneidad de este material para el

envasado de floretes de brócoli.

Tabla 5. 1. Tasas de transmisión al oxígeno (OTR), dióxido de carbono (CTR) y vapor de agua (WVTR) de los films evaluados en esta Tesis Doctoral.

Films	OTR (cm ³ m ⁻² día ⁻¹)	CTR (cm ³ m ⁻² día ⁻¹)	WVTR* (g m ⁻² día ⁻¹)	Espesor (µm)	Proveedor o fabricante
PP (sin perforar)	1660 [†]	7680 [†]	7	30	Garrido (Uruguay)
BOPP (sin perforar)	900 ^{††}	3600 ^{††}	0,8	30	PDS Group SL (Murcia, España)
BOPP-CAD15	17260 **	14650 **	nd	30	PDS Group SL (Murcia, España)
BOPP-CAD30	11570 **	9870 **	nd	30	PDS Group SL (Murcia, España)
BOPP-CAD45	9160 **	7840 **	nd	30	PDS Group SL (Murcia, España)
LLDPE	8000 ^{††}	52000 ^{††}	40	10	Grupo Lucas (Murcia, España)
Nature Fresh®	5500 ^{††}	60000 ^{††}	3000	10	Fabbri Group CO (Italia)
NatureFlex™	1 ^{††}	nd	600	23,3	Futamura Group (Reino Unido)

nd: sin datos

*38°C y 90% HR

†20°C y 80% HR

††23°C y 0% HR

** Las tasas de transmisión fueron estimadas mediante el cálculo del área de las perforaciones y el modelo empírico propuesto por González-Buesa et al. (2009, 2013).

5.2. Ensayos de cocción

Se diseñaron ensayos de cocción en horno microondas para evaluar el efecto del método y tiempo de cocción sobre la retención de compuestos bioactivos. Se realizaron dos ensayos de cocción independientes: uno empleando brócolis adquiridos en un supermercado local y procesándolos de forma doméstica; y otro con brócolis mínimamente procesados por la industria Verdisfresh - Grupo Alimentario Citrus (GAC) (Valencia, España). En ambos ensayos se evaluaron los

mismos factores y niveles:

Factor	Niveles	Justificación de la selección
Método de cocción	Convencional (sin bolsa)	Se evaluó el efecto de la nueva alternativa de cocción en bolsa frente a una cocción convencional por microondas.
	Con bolsa microondable	
Tiempo de cocción	5 min	Se evaluó el tiempo recomendado por los fabricantes (5 min) y un tiempo inferior que podría resultar en una mejor retención de fitoquímicos (3 min).
	3 min	

La determinación de los principales compuestos bioactivos (GSL y HCA) se realizó en ambos ensayos. Además, en algunos ensayos se incorporaron determinaciones de otros parámetros de calidad como capacidad antioxidante, contenido de minerales (ensayo con brócoli industria) y calidad microbiológica (ensayo con brócoli doméstico).

CAPÍTULO 6.

TEMA 1.

Envasado en Atmósfera Modificada

6.1. Efecto de la temperatura de almacenamiento sobre la calidad externa y contenido de compuestos bioactivos de floretes de brócoli envasados en film de polipropileno

6.1.1. Diseño experimental

Cabezas de brócoli (cv. Legacy) se obtuvieron y procesaron como se describe en Materiales y Métodos (4.1.). Aproximadamente 250 ± 5 g de floretes de brócoli se envasaron en bolsas de PP (30×25 cm, $30 \mu\text{m}$ de espesor) con una perforación mecánica ($0,6$ mm de diámetro). Cada bolsa constituyó una unidad experimental. Las muestras se almacenaron en oscuridad a 4°C (temperatura recomendada), 8°C (temperatura próxima a estanterías comerciales y refrigeradores domésticos) y 15°C (temperatura abusiva) durante 21 días. Los muestreos se realizaron los días 0, 7, 14 y 21, y se muestrearon 3 unidades experimentales por cada condición de temperatura. Se realizó el seguimiento de los siguientes atributos de calidad: composición gaseosa del espacio cabeza, pérdida de masa, color, textura, tasa respiratoria, atributos sensoriales, capacidad antioxidante y contenido de glucosinolatos y compuestos fenólicos. En la **Figura 6. 1** se muestra un esquema del diseño experimental descrito.

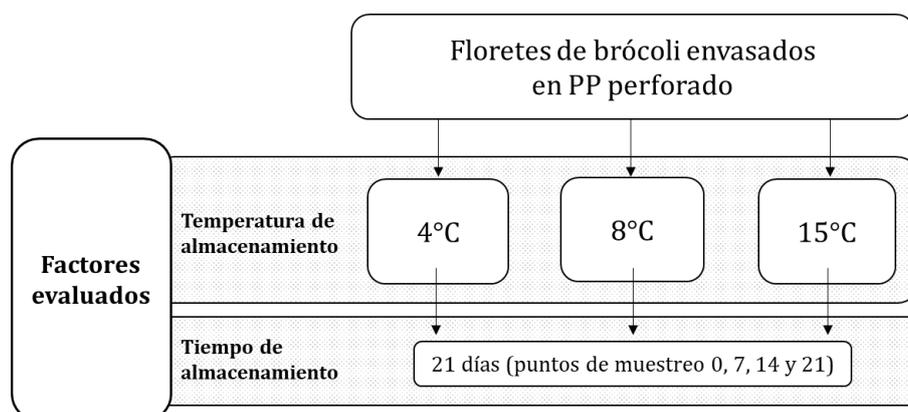


Figura 6. 1. Diseño experimental para evaluar el efecto de la temperatura de almacenamiento en la calidad externa y compuestos bioactivos de floretes de brócoli (cv. Legacy) envasados en atmósfera modificada pasiva, empleando polipropileno perforado como material de envasado.

6.1.2. Resultados y discusión

6.1.2.1. Composición gaseosa del espacio cabeza

Todas las muestras presentaron disminución en los niveles de O₂ y aumento en los niveles de CO₂ con el tiempo ($p < 0,0001$) (**Figura 6. 2**). El cambio en la composición gaseosa se dio rápidamente, obteniéndose concentraciones de O₂ inferiores a 5 kPa y de CO₂ superiores a 10 kPa en los primeros 7 días de almacenamiento, independientemente de la condición de temperatura. La temperatura tuvo un efecto significativo en la evolución de la composición gaseosa durante el almacenamiento ($p < 0,0001$). Floretes de brócoli almacenados a 4°C presentaron las mayores concentraciones de O₂ ($8,0 \pm 1,5$ kPa al día 21) seguidos por los floretes almacenados a 8°C ($1,2 \pm 0,5$ kPa al día 21) y 15°C ($0,6 \pm 1,0$ kPa al día 21). De forma análoga, floretes almacenados a 4°C presentaron los menores niveles de CO₂ ($12,3 \pm 1,8$ kPa al día 21), seguidos por los floretes almacenados a 8°C ($15,8 \pm 0,6$ kPa al día 21) y a 15°C ($18,9 \pm 1,0$ kPa al día 21). Las diferencias en la evolución gaseosa entre las distintas condiciones se atribuyen principalmente a la incidencia de la temperatura en la tasa respiratoria. El aumento de temperatura provoca un incremento en el consumo de O₂ y generación de CO₂ por parte del tejido vegetal haciendo que se modifiquen las concentraciones de equilibrio alcanzadas dentro de los envases (Fonseca et al., 2002; Opara et al., 2019a). Si bien en la literatura las concentraciones de O₂ y CO₂ recomendadas para la conservación de brócoli son de 1-2 kPa y 5-10 kPa respectivamente, el diseño del MAP se debe realizar para alcanzar concentraciones en el entorno del 10 kPa para O₂ y CO₂ de forma de evitar condiciones de anaerobiosis en caso de fluctuaciones de temperatura (Ilahy et al., 2020; Jones et al., 2006; Lucera et al., 2011). Se ha informado que las condiciones que inducen el metabolismo fermentativo son por debajo de 0,5 kPa para O₂ y por encima de 20 kPa para CO₂ (Beaudry, 2000). En el presente estudio no se alcanzaron estos niveles, pero floretes almacenados a 15°C presentaron concentraciones próximas a estos valores. Teniendo en cuenta los valores recomendados, floretes de brócoli envasados en PP perforado deben mantenerse a temperaturas próximas a los 4°C para alcanzar una composición atmosférica de equilibrio en el entorno de 10 kPa de O₂ y CO₂ que asegure condiciones seguras de conservación. Conservación a temperaturas mayores podrían inducir rápidamente cambios atmosféricos con

agotamiento de O_2 y acumulación excesiva de CO_2 aumentando el riesgo de anaerobiosis con las consecuentes pérdidas de calidad y seguridad.

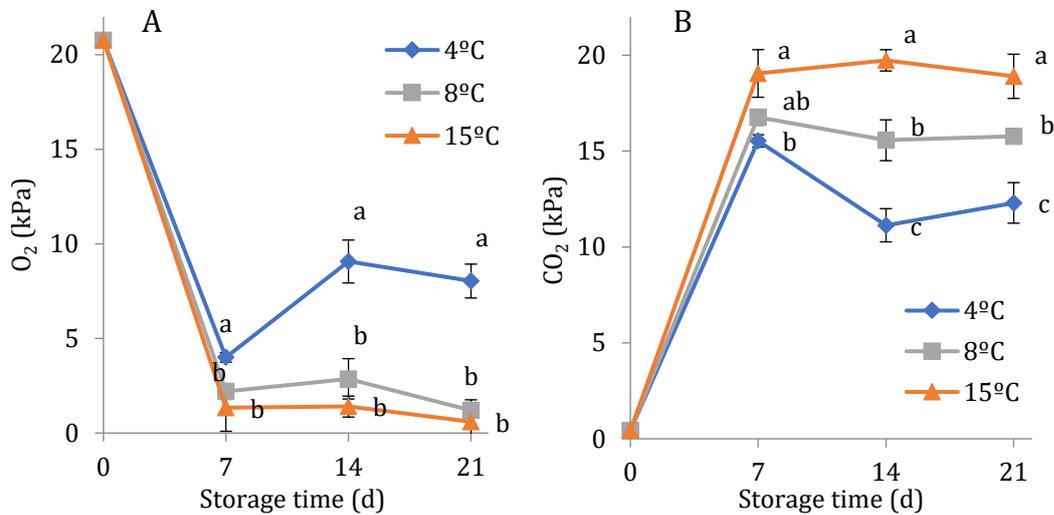


Figura 6. 2. Evolución de la composición gaseosa del espacio de cabeza de floretes de brócoli MAP en polipropileno perforado, durante el almacenamiento a 4, 8 y 15°C: A - concentración de O_2 . B - concentración de CO_2 . Las barras verticales representan la desviación estándar ($n = 3$) y letras diferentes indican diferencias significativas entre temperaturas de almacenamiento dentro del mismo período de tiempo según el test de Tukey ($p < 0,05$).

6.1.2.2. Pérdida de masa (ML)

Los floretes de brócoli presentaron una pérdida de masa (ML) significativa a lo largo del tiempo a todas las temperaturas ($p < 0,05$) (**Figura 6. 3**). Sin embargo, al final del almacenamiento la ML fue inferior al 3% en todas las condiciones, que es un valor aceptable para la comercialización de este producto (Vallejo et al., 2003b). Según la bibliografía, el valor de ML máxima para evitar síntomas de marchitamiento y senescencia en floretes de brócoli es del 6% (Horticulture Innovation Australia). Estudios preliminares con floretes de brócoli sin envasar mostraron una ML del 13% después de 14 días de almacenamiento a 6-8°C (datos no mostrados), indicando que la deshidratación es uno de los factores limitantes de su vida útil si no se aplican tecnologías adecuadas de conservación. El MAP con PP perforado mostró ser una solución para evitar el detrimento causado por la deshidratación, tanto a bajas (4°C) como a altas (15°C) temperaturas. El MAP incide en los fenómenos involucrados en la transpiración permitiendo reducir la pérdida

de agua del tejido vegetal a través de dos mecanismos principales: ralentiza la respiración y por lo tanto disminuye el transporte de agua hacia la superficie del tejido y su posterior evaporación; y aumenta la humedad relativa (RH) dentro del envase (disminuye la diferencia de presión de vapor entre el vegetal y el ambiente) y por lo tanto se reduce la transferencia convectiva de agua hacia la atmósfera (Castellanos et al., 2016; Fonseca et al., 2002; Opara et al., 2019a).

Los registros de RH mostraron que, a las 8 horas después de envasado, la atmósfera dentro de los envases se encontraba saturada de vapor de agua (RH = 100%) en todas las condiciones de almacenamiento. Esto explica que la ML durante el almacenamiento haya sido relativamente baja.

La temperatura de almacenamiento tuvo un efecto significativo en la evolución de la ML ($p < 0,001$). Floretes de brócoli almacenados a 4 y 8°C no mostraron diferencias significativas en el valor de ML, y presentaron un incremento paulatino a lo largo del tiempo sin cambios significativos entre los últimos puntos de muestreo. Por otro lado, floretes almacenados a 15°C presentaron una ML creciente durante todo el período de almacenamiento, y valores significativamente mayores respecto a los floretes almacenados a temperaturas más bajas ($p < 0,001$). Estos resultados coinciden con el hecho de que mayores temperaturas de almacenamiento incrementan tanto la tasa respiratoria como la tasa de transpiración (Serrano et al., 2006). Otros trabajos donde se evaluaron los efectos de la calidad del brócoli bajo condiciones de MAP en PP y PE mostraron resultados semejantes. Por ejemplo, Jia et al. (2009) obtuvieron pérdidas de masa inferiores al 4% para floretes almacenados a 4°C durante 23 días. Fernández-León et al. (2013) obtuvieron pérdidas de masa del 0,75% en floretes MAP almacenados por 12 días a 5°C.

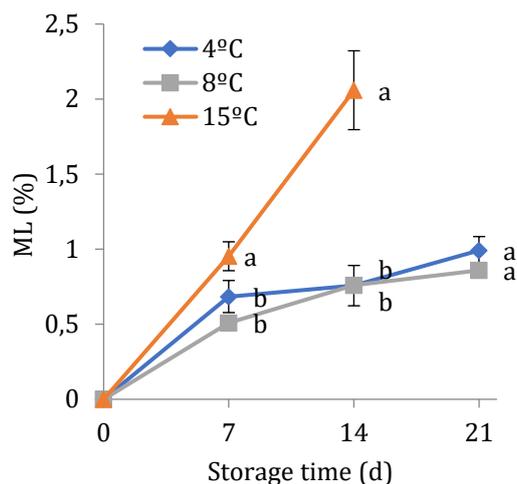


Figura 6. 3. Evolución de la pérdida de masa de floretes de brócoli MAP, en polipropileno perforado, durante el almacenamiento a 4, 8 y 15°C. Las barras verticales representan la desviación estándar ($n = 3$) y letras diferentes indican diferencias significativas entre temperaturas de almacenamiento dentro del mismo período de tiempo según el test de Tukey ($p < 0,05$).

6.1.2.3. Color

Ni el tiempo de almacenamiento ni la temperatura tuvieron un impacto significativo en los parámetros colorimétricos de floretes de brócoli MAP en PP perforado ($p > 0,05$). L^* ($41,5 \pm 1,1$), C^*_{ab} ($18,3 \pm 1,9$) y h_{ab} ($115,5 \pm 1,2$) (parámetros que representan la luminosidad, saturación y el tono del color respectivamente) permanecieron constantes a lo largo del almacenamiento, sin diferencias significativas respecto a las muestras recién cosechadas (día 0). En ensayos preliminares a temperatura de almacenamiento de 4°C, floretes de brócoli sin envasar presentaron un incremento significativo de L^* (de $44,4 \pm 0,4$ a $57,2 \pm 0,3$) y C^*_{ab} (de $16,9 \pm 0,7$ a $32,5 \pm 0,7$), y un descenso significativo de h_{ab} (de $117,7 \pm 0,6$ a $87,6 \pm 1,0$), evoluciones que se corresponden a un marcado amarilleo del producto. El fenómeno de amarilleo, provocado por la degradación de clorofilas, es uno de los más importantes y con mayor impacto en la calidad del brócoli. Se ha reportado que la degradación de clorofilas está directamente relacionada con los procesos de senescencia y con el metabolismo energético (Y. Zhang et al., 2021). Esto explica que floretes bajo condiciones de MAP conserven su color característico. Las reacciones de degradación de clorofila están catalizadas por enzimas cuya actividad depende

de las concentraciones de O₂ y CO₂. Se ha reportado que concentraciones bajas de O₂ (~ 5%) y altas de CO₂ (15-20%) reducen la actividad de estas enzimas (Y. Zhang et al., 2021). Además, se ha reportado que bajas concentraciones de O₂ (5%) previenen el deterioro de las membranas celulares y esto tiene un efecto en la conservación de clorofilas que se encuentran unidas a proteínas de las membranas tilacoidales (Y. Zhang et al., 2021). Esto explica la inhibición de la pérdida de color en las condiciones de este estudio. Otros autores han reportado efecto inhibitorio de la pérdida de color en brócoli MAP, pero generalmente en condiciones de refrigeración (entre 1 y 5°C) (Jia et al., 2009; Serrano et al., 2006; Fernández-León et al., 2013). Trabajos que han evaluado el efecto de la temperatura sobre el color, han observado que la temperatura es el factor de mayor impacto y que mayores temperaturas aceleran la pérdida de color (Schouten, Zhang, Verschoor, et al., 2009). En este estudio, se identificaron rangos de concentraciones de O₂ y CO₂ que permitieron inhibir la pérdida de color en floretes de brócoli almacenados a altas temperaturas (8 y 15°C). Se demuestra que el MAP resulta clave para conservar este importante parámetro de calidad a temperaturas de almacenamiento elevadas.

6.1.2.4. Textura

La dureza del tallo aumentó significativamente en la primera semana de almacenamiento en todas las muestras, independientemente de la temperatura de almacenamiento ($p < 0,05$) (**Tabla 6. 1**). Los floretes de brócoli almacenados a 4 y 8°C mantuvieron los valores de dureza alcanzados al día 7 hasta el final del período de almacenamiento, sin diferencias significativas entre ellos. Por otro lado, los floretes almacenados a 15°C presentaron una disminución significativa de la dureza a partir día 7 ($p < 0,05$). El día 21 no se realizaron mediciones porque los floretes estaban muy deteriorados.

El aumento de la dureza podría estar vinculado a la pérdida de masa, ya que la pérdida de agua a nivel celular podría resultar en un aumento de la fuerza necesaria para romper el tallo del brócoli (Toivonen & Brummell, 2008a). Por ejemplo, Serrano et al. (2006) observaron un aumento en la dureza de cabezas de brócoli (como fuerza de corte) durante el almacenamiento refrigerado, donde los brócolis

que habían presentado la mayor pérdida de peso también presentaron el mayor incremento de dureza. Si del set de datos se elimina el valor de dureza del día 14 de brócolis almacenados a 15°C y se aplica un análisis de correlación, se obtiene un coeficiente de correlación de Pearson de 0,867 ($p = 0,005$), indicando que existe correlación (moderada) entre la pérdida de masa y la dureza. Sin embargo, cuando se analiza el set de datos completo no se obtiene correlación entre dichas variables ($r = 0,014$). Se concluye que, mientras no se alcanzan niveles de deterioro avanzados, existe correlación entre la pérdida de masa y la dureza de floretes de brócoli. En estados senescencia avanzados existen otras variables que impactan en la dureza. La disminución en la dureza en floretes almacenados a 15°C (observada a partir del día 7) probablemente esté vinculada con procesos de degradación del tejido producto del envejecimiento y senescencia que se dan con mayor rapidez a temperaturas altas. También puede deberse a la mayor condensación de agua dentro del envase, que genera condiciones propicias para el crecimiento microbiano y que impacta en el ablandamiento del tejido.

Tabla 6. 1. Cambio en la firmeza del tallo (% respecto al día 0) de floretes de brócoli MAP, en polipropileno perforado, durante el almacenamiento a 4, 8 y 15°C. Los resultados están expresados como el promedio \pm la desviación estándar ($n = 3$). Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas dentro de la misma columna (días) y letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas dentro de la misma fila (temperaturas) según el test de Tukey ($p < 0,05$).

Tiempo de almacenamiento (días)	4°C		8°C		15°C	
7	8,2 \pm 2,1	a,A	12,2 \pm 0,4	a,A	11,2 \pm 3,9	a,A
14	11,4 \pm 1,6	a,A	11,3 \pm 1,7	a,A	3,0 \pm 0,4	b,B
21	13,9 \pm 3,3	a,A	11,2 \pm 1,9	a,A	nd	

nd: no determinado

6.1.2.5. Tasa respiratoria

La tasa respiratoria (RRO_2) de floretes almacenados a 4°C permaneció sin cambios significativos a lo largo del tiempo (**Figura 6. 4**). En floretes almacenados a 8°C, se observó un incremento significativo de la RRO_2 a partir del día 14, que permaneció constante hasta el final del período. La RRO_2 de floretes almacenados a 8°C tendió a

presentar valores superiores respecto a la RRO_2 de floretes almacenados a 4°C, con diferencias estadísticamente significativas el día 21. Esto se puede explicar por el efecto de la temperatura en la tasa respiratoria de productos hortofrutícolas, que se encuentra exhaustivamente estudiado y documentado (Fonseca et al., 2002; Jacxsens et al., 2002). Sin embargo, en floretes almacenados a 15°C se observó una disminución continua de RRO_2 a lo largo del tiempo. A la hora de interpretar estos resultados, es importante tener en cuenta las condiciones en las que se determinó la RRO_2 . Como se explica en Materiales y métodos (4.5.), la RRO_2 se mide a través del método de sistema cerrado, una vez abiertos los envases y aclimatados los floretes a 18°C y composición atmosférica. Es decir que la RRO_2 no se determina en las condiciones de almacenamiento. Esta medida se considera como una estimación del estado metabólico del tejido. Por lo tanto, la disminución continua en el tiempo de la RRO_2 de floretes almacenados a 15°C, y que ésta sea significativamente menor comparada con las tasas de floretes almacenados a 4 y 8°C, podría indicar que el vegetal se encuentra en un proceso de senescencia avanzado (hay menor disponibilidad de nutrientes y los procesos metabólicos se enlentecen). Por lo tanto, los resultados sugieren que la RRO_2 se vio afectada predominantemente por la temperatura. Estas observaciones coinciden con otros trabajos donde se ha demostrado que la temperatura es el parámetro crítico que influye en la tasa de respiración de este tipo de productos (Belay et al., 2016; Fonseca et al., 2002; Jacxsens et al., 2002).

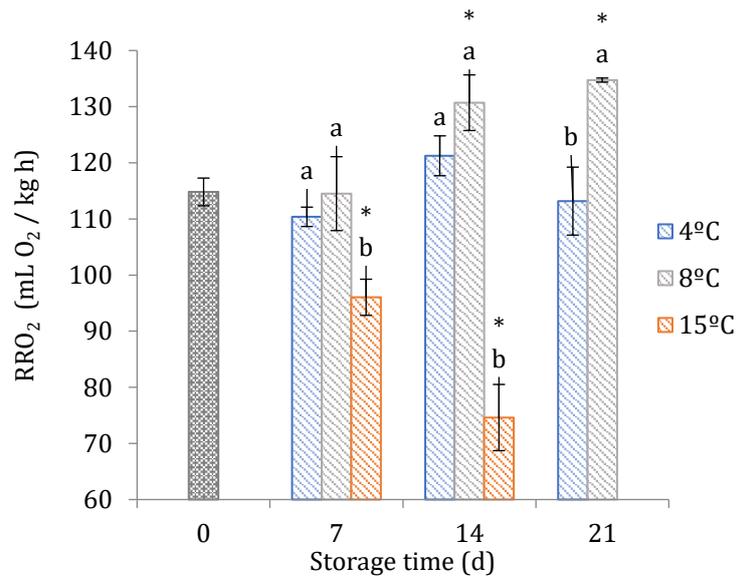


Figura 6. 4. Tasa respiratoria medida en O₂ (mL O₂ kg⁻¹ h⁻¹) de floretes de brócoli MAP, en polipropileno perforado, durante el almacenamiento a 4, 8 y 15°C. Los resultados están expresados como el promedio y las barras verticales representan la desviación estándar (n = 3). Letras diferentes indican diferencias significativas entre condiciones de temperatura según el test de Tukey (p < 0,05). “*” indican diferencias significativas entre floretes almacenados y floretes recién cosechados (día 0) (Test de Dunnett, α = 0.05).

6.1.2.6. Contenido de glucosinolatos (GSL)

En las muestras de brócoli se identificaron siete GSL diferentes. Dos GSL alifáticos: glucoiberina (GIB) y glucorafanina (GRA), cuatro indólicos: 4-hidroxi glucobrasicina (HGB), glucobrasicina (GB), 4-metoxi glucobrasicina (MGB) y neoglucobrasicina (NGB), y uno aromático: gluconasturtina (GST). GIB y GST fueron detectados en concentraciones traza. La información del espectro de masas de los GSL identificados se resume en la **Tabla 6. 2** y en la **Figura 6. 5** se muestra un cromatograma tipo de estas muestras de brócoli.

Tabla 6. 2. Glucosinolatos intactos detectados en floretes de brócoli (*Brassica oleracea* var. *italica* cv. Legacy) recién cosechados y almacenados en MAP, en polipropileno perforado, durante 21 días a 4, 8 y 15°C.

Compuesto	Abreviatura	Clase	Rt* (min)	[M-H] ⁻ (m/z)	MS2 and MS3
Glucoiberina (tr)**	GIB	alifático	3,6	422	
Glucorafanina	GRA	alifático	4,4	436	
4-hidroxiglucobrasicina	HGB	indólico	9,3	463	259
Glucobrasicina	GB	indólico	17,2	447	y 97
Gluconasturtina (tr)**	GST	indólico	18,9	422	
4-Metoxiglucobrasicina	MGB	indólico	20,1	477	
Neoglucobrasicina	NGB	indólico	23,1	477	

*Rt: tiempo de retención

**compuestos encontrados en concentraciones traza

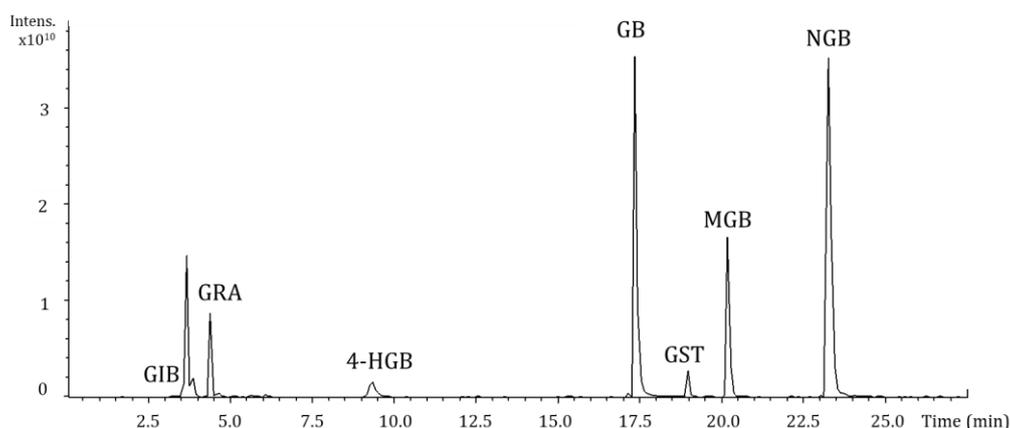


Figura 6. 5. Cromatograma a 227 nm de muestras de brócoli (*Brassica oleracea* var. *italica* cv. Legacy) recién cosechado.

Los siete compuestos se identificaron en todas las muestras, por lo que no existieron pérdidas totales de los GSL individuales a lo largo de 21 días almacenamiento en ninguna condición.

En cuanto al perfil de GSL, el compuesto predominante fue GB con un 52,6% del total, seguido por NGB y GRA con el 27,4% y 9,8% respectivamente. A diferencia de otros estudios, la GRA no fue el GSL predominante en el cultivar Legacy (Ciešlik et al., 2007; Jia et al., 2009; Jones et al., 2006; Oliviero et al., 2012; Song & Thornalley,

2007; G. Yuan et al., 2010). El perfil identificado en este trabajo coincide con el perfil reportado por Casajús et al. (2021) quienes también trabajaron con brócolis del cultivar Legacy. Sin embargo, Darré et al. (2017) también determinaron el perfil de GSL en brócolis de esta cultivar y, aunque el contenido de GSL totales fue similar, encontraron un mayor contenido de GSL alifáticos que de indólicos. Estos resultados dejan de manifiesto que existen variaciones respecto a la cantidad total de GSL y sus componentes individuales en el brócoli. Las diferencias genéticas entre cultivares juegan un papel fundamental con respecto a las características cualitativas y cuantitativas de los GSL. Además, factores agronómicos, el momento de cosecha y factores ambientales pueden afectar y cambiar el perfil de GSL dentro de un mismo cultivar (Jones et al., 2006; Pérez-Balibrea et al., 2011).

El contenido total de GSL en los floretes no se vio afectado significativamente durante los 21 días de almacenamiento a 4 y 8°C, presentando valores semejantes a las muestras del día 0. A pesar de que estas muestras estuvieron en distintas condiciones de temperatura y atmósfera interna, el contenido de GSL no fue significativamente diferente entre ellas (a excepción del día 14) (**Figura 6. 6 - a**). Este es un hallazgo que destacar, dado que se identifica un rango de temperaturas (4-8°C) y concentraciones internas de O₂ y CO₂ (1,2 – 9,1 kPa de O₂ y 11,1 – 16,8 kPa de CO₂) más amplio que los reportados hasta el momento para preservar el contenido de GSL en brócoli, y durante un período relativamente extenso de conservación (21 días).

Floretes almacenados a 15°C, a pesar de presentar una fuerte modificación de su atmósfera interior respecto al aire (~1% de O₂ y ~20% CO₂), presentaron una reducción del 26,6% en el contenido de GSL totales al día 14 (**Figura 6. 6 - a**). Este resultado podría indicar que el efecto de la temperatura de almacenamiento predomina frente al efecto de la atmósfera modificada. Dado que la pérdida de GSL durante la postcosecha está relacionada principalmente a la hidrólisis catalizada por la mirosinasa, la pérdida de GSL a altas temperaturas se explica por el mayor daño a nivel celular y consecuente contacto enzima-sustrato (Latté et al., 2011). Al mismo tiempo, los mecanismos de hidrólisis se ven acelerados a mayores temperaturas. Otros autores también han observado efectos significativos de las temperaturas de almacenamiento sobre el contenido de GSL. Por ejemplo, Jia et al. (2009) observaron

una disminución de GSL más pronunciada en floretes MAP almacenados a 20 °C que a 4 °C.

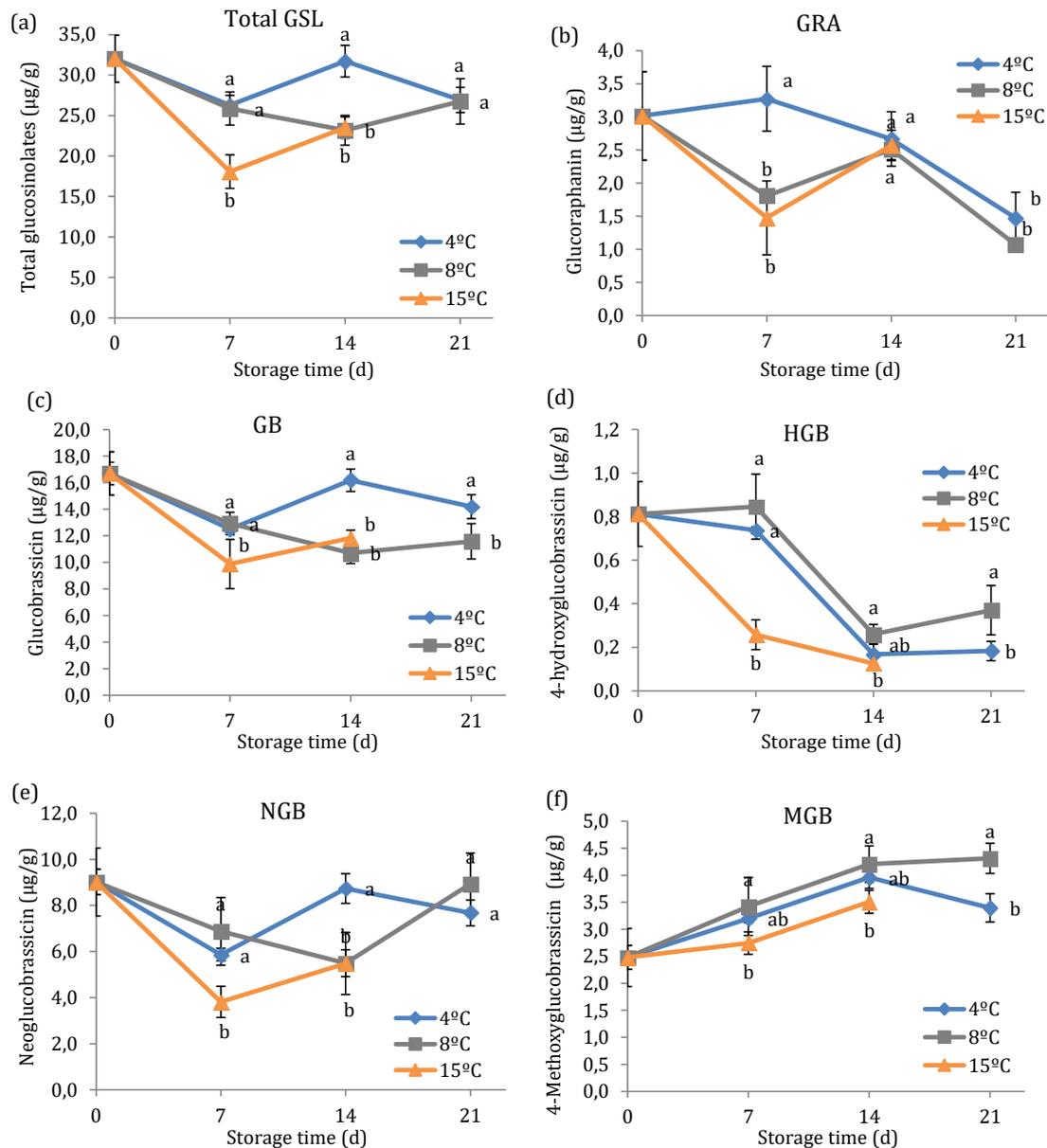


Figura 6. 6. Evolución de: (a) contenido total de glucosinolatos, (b) glucorafanina (GRA), (c) glucobrasicina (GB), (d) 4-hidroxiglucobrasicina (HGB), (e) neoglucobrasicina (NGB) y (f) 4-metoxiglucobrasicina (MGB) a lo largo del tiempo, en floretes de brócoli almacenados en MAP en polipropileno perforado, a 4, 8 y 15 °C. Las barras verticales representan la desviación estándar (n = 3) y letras diferentes indican diferencias significativas entre temperaturas de almacenamiento (dentro de un mismo día) según el Test de Tukey ($p < 0.05$).

En general, los estudios de almacenamiento de floretes de brócoli reportan una disminución del contenido de GSL con el tiempo. Esta disminución es menor en floretes MAP que en floretes almacenados al aire (Jia et al., 2009; Vallejo et al., 2003). Por ejemplo, Jia et al. (2009) observaron pérdidas significativas de GSL alifáticos e indólicos (26% y 15% respectivamente) en floretes almacenados bajo MAP pasiva durante 23 días a 4°C (cv. Youxiu). Fernández-León et al. (2013) observaron que los GSL totales se redujeron en un 24% en floretes MAP activa y almacenados a 5°C durante 12 días (cv. Parthenon). Vallejo et al. (2003) reportaron una pérdida de GSL del 71% en cabezas de brócoli MAP almacenadas 7 días a 1°C (cv. Marathon). Por otro lado, existen algunos reportes donde el contenido de GSL en floretes de brócoli se mantiene constante durante el almacenamiento entre 4 y 8°C, pero durante períodos de entre 7 y 10 días, y en condiciones de O₂ y de CO₂ drásticas (1% y 21%, respectivamente) que no son comercialmente viables (Jones et al., 2006; Schreiner et al., 2007). En este estudio se encontraron condiciones que permitieron preservar el contenido de GSL en floretes de brócoli durante 21 días, en atmósferas menos riesgosas en cuanto al desarrollo de anaerobiosis y preservación de la seguridad y calidad.

Si bien la temperatura es el factor predominante en la conservación en general, la atmósfera modificada mostró tener un rol relevante en la conservación de GSL. Que no se haya observado efecto de la temperatura entre 4 y 8°C, se atribuye a la mayor modificación de la atmósfera interna en los floretes almacenados a 8°C, que permitió mitigar los efectos de la temperatura. Aquí cabe mencionar que, en ensayos preliminares a temperaturas de almacenamiento entre 4 y 15°C (datos no informados), se observó que floretes de brócoli (cv. Legacy) sin envasar presentaron pérdidas de GSL totales de entre 24 y 48% en 14 días.

La conservación de GSL por efecto de las concentraciones de O₂ y CO₂ se atribuye a varios fenómenos. Por un lado, condiciones empobrecidas de O₂ y ricas en CO₂ enlentecen los procesos metabólicos y permiten preservar en mayor medida la integridad de los tejidos. La preservación de tejidos permite conservar el contenido de GSL al mantener en compartimentos diferentes enzima y sustrato evitando la hidrólisis de estos compuestos. Por otra parte, concentraciones de CO₂ superiores a 10% (como las alcanzadas en este estudio) han mostrado mejorar la conservación

de GSL debido a un posible efecto inhibidor de la actividad mirosinasa y por lo tanto una disminución de la hidrólisis de GSL (Jia et al., 2009; Xu et al., 2006, Dunford y Temelli, 1996). Por otra parte, existen estudios que reportan que el cambio de composición gaseosa genera estrés en el tejido vegetal induciendo mecanismos de biosíntesis de GSL (Fernández-León et al., 2013). La biosíntesis de *novo* podría compensar las pérdidas por hidrólisis logrando mantener constante el nivel de estos compuestos, como se observa en este estudio para floretes almacenados a 4 y 8°C.

La temperatura de almacenamiento tuvo un efecto significativo ($p < 0,05$) en la evolución de los GSL individuales. Floretes almacenados a 4°C preservaron en mayor medida el contenido de estos compuestos respecto a los floretes almacenados a 15°C.

El contenido de GRA se mantuvo constante durante 14 días de almacenamiento a 4°C. A 8 y 15°C se observó un descenso al día 7, y posterior incremento al día 14. No existieron diferencias significativas luego de 14 días de almacenamiento entre las distintas condiciones (**Figura 6. 6 - b**). Esto podría indicar que la mayor modificación de la atmósfera en las condiciones de 8 y 15°C podrían desencadenar mecanismos de biosíntesis. En la última semana, el contenido de GRA disminuyó un 58% en promedio, sin diferencias significativas entre temperaturas. Autores que trabajaron con floretes de brócoli bajo condiciones de MAP (1-10% de O₂, 5-14% de CO₂ y temperaturas de almacenamiento de 4-5°C) encontraron resultados similares (Fernández-León et al., 2013b; Jia et al., 2009): al inicio la GRA se mantiene constante, pero al final de un almacenamiento prolongado se produce una pérdida significativa. La pérdida hacia el final del período se podría explicar por un deterioro del tejido.

El contenido de GB disminuyó en los floretes almacenados a 8 y 15°C en un 32% en promedio (14 días), mientras que los floretes almacenados a 4°C conservaron este compuesto durante todo el período (**Figura 6. 6 - c**). El contenido de HGB descendió a lo largo del almacenamiento en todas las condiciones, pero de forma más pronunciada en floretes a 15°C (**Figura 6. 6 - d**). La evolución de HGB fue semejante entre floretes almacenados a 4 y 8°C, aunque al final del almacenamiento floretes almacenados a 4°C presentaron un contenido significativamente mayor. La reducción de NGB fue significativa en floretes almacenados a 15°C (52% en

promedio) (**Figura 6. 6 - e**). En floretes a 4 y 8°C se observó una reducción durante los primeros 7 y 14 días respectivamente, y posterior aumento alcanzando los niveles de NGB iniciales (día 0). Se observó un aumento en el contenido de MGB en todas las muestras. El incremento fue superior en floretes almacenados a 4°C (**Figura 6. 6 - f**). El aumento de MGB con el tiempo ha sido reportado en algunos otros trabajos, pero aún no se conocen con certeza los mecanismos implicados bajo este comportamiento (Rybarczyk-Plonska et al., 2016; Torres-Contreras et al., 2017). El incremento de GSL en brócoli se ha relacionado con la respuesta al estrés debido a daños físicos como cortes, o a cambios en las condiciones ambientales como reducción de O₂ e incremento de CO₂. En general, el incremento se ha observado principalmente en los GSL indólicos, que suelen presentar mayor porcentaje de retención respecto a los GSL alifáticos durante el almacenamiento. Esto se verificó en este trabajo, donde las pérdidas de GRA fueron superiores (51-64%) a las pérdidas de los GSL indólicos (12-13%). Respecto a esto, existen algunas hipótesis que indican que el estrés abiótico puede influir en la expresión de ciertos genes relacionados con la biosíntesis de glucosinolatos indólicos (Torres-Contreras et al., 2017). En los últimos años, se han explicado algunos mecanismos asociados a este comportamiento. Por ejemplo, la acumulación de GSL inducida por heridas podría estar asociada con la regulación positiva del gen BoCYP83B1, que está involucrado en la biosíntesis de glucosinolatos indólicos y aromáticos. Este gen es inducido por vías de transducción de señales desencadenadas por heridas, donde el ácido jasmónico funciona como molécula de señalización. Además, las heridas también podrían inducir factores de transcripción relacionados con la biosíntesis de glucosinolatos indólicos (Torres-Contreras et al., 2017).

6.1.2.7. Capacidad antioxidante (AOC)

La AOC de los floretes de brócoli se muestra en la **Tabla 6. 3**. Las diferencias entre los valores de AOC determinados por los métodos ABTS y ORAC se deben a los diferentes mecanismos de acción de cada uno de los métodos. Los valores de AOC obtenidos fueron comparables a otros valores reportados para brócoli (Fernández-León et al. 2013a; Fernández-León et al., 2013b; Floegel et al., 2011).

Tabla 6. 3. Evolución de la capacidad antioxidante ($\mu\text{mol g}^{-1}$) medida por los métodos ABTS y ORAC y del contenido de ácidos hidroxicinámicos (HCA) ($\mu\text{mol g}^{-1}$) en floretes de brócoli MAP, en polipropileno perforado, durante el almacenamiento a 4, 8 y 15°C. Los datos se expresan como la media \pm la desviación estándar ($n = 3$). Distintas letras dentro de la misma columna indican diferencias significativas según el test de Tukey ($p < 0,05$).

Temperatura (°C)	Tiempo (días)	ABTS ($\mu\text{mol g}^{-1}$)	ORAC ($\mu\text{mol g}^{-1}$)	HCA ($\mu\text{mol g}^{-1}$)
4	0	21,9 \pm 2,1 a	77,2 \pm 4,6 a	1,08 \pm 0,03 b
	7	24,1 \pm 2,1 a	105,6 \pm 2,1 b	nd
	14	28,4 \pm 3,2 a	84,0 \pm 5,4 a	1,30 \pm 0,05 a
	21	26,1 \pm 3,4 a	76,7 \pm 6,1 a	0,93 \pm 0,03 c
8	0	21,9 \pm 2,1 a	77,2 \pm 4,6 a	1,08 \pm 0,03 b
	7	31,2 \pm 1,4 b	93,1 \pm 7,0 ab	nd
	14	30,4 \pm 2,5 b	103,9 \pm 1,3 b	0,92 \pm 0,09 c
	21	30,0 \pm 1,0 b	101,9 \pm 8,9 b	0,85 \pm 0,02 c
15	0	21,9 \pm 2,1 a	77,2 \pm 4,6 a	1,08 \pm 0,03 b
	7	24,5 \pm 0,7 ab	90,4 \pm 7,1 b	nd
	14	28,3 \pm 1,7 b	109,6 \pm 7,5 b	0,62 \pm 0,05 d

nd: no determinado

Con el método de ABTS, se observó un aumento significativo en AOC en la primera semana de almacenamiento para floretes almacenados a 8 y 15°C. Luego, la AOC permaneció constante hasta el final del estudio. Los floretes almacenados a 4 °C mantuvieron el mismo valor de AOC durante todo el período de almacenamiento.

Con el método de ORAC se obtuvieron resultados similares. Si bien los floretes almacenados a 4°C presentaron un aumento de la AOC durante la primera semana de almacenamiento, la AOC disminuyó durante los días siguientes alcanzando el valor inicial. Para floretes almacenados a 8 y 15°C se observó la misma evolución, un incremento en la primera semana que se mantuvo hasta el final del período. Los floretes almacenados a 4°C presentaron un valor de AOC significativamente menor que floretes almacenados a 8 y 15°C durante todo el período de estudio ($p < 0,05$). El incremento en la AOC a mayores temperaturas puede atribuirse al estrés generado por la exposición a altas temperaturas y cambios drásticos en la composición de la atmósfera interna. Estos factores pueden inducir la síntesis de metabolitos con propiedades antioxidantes. Se ha reportado que la aplicación de estrés abiótico postcosecha puede inducir la acumulación de compuestos bioactivos en los tejidos vegetales (Jacobo-Velázquez & Cisneros-Zevallos, 2012). En el caso

específico del brócoli, se ha observado que la exposición al estrés podría inducir la activación de vías de biosíntesis de compuestos fenólicos (Torres-Contreras et al., 2017; Villarreal-García et al., 2016). Por ejemplo, se han reportado incrementos en el contenido de fenoles totales en brócolis MAP almacenados entre 20 y 22°C respecto a brócolis recién cosechados (Costa et al., 2006; Hasperué et al., 2015; Starzyńska et al., 2003; Villarreal-García et al., 2016). La senescencia se asocia a una mayor producción de especies reactivas de oxígeno, y esto podría inducir la síntesis de compuestos antioxidantes como respuesta del tejido para retrasar el envejecimiento (Hasperué et al., 2015).

En la literatura se encuentran resultados contradictorios con respecto a la evolución de la AOC a lo largo del almacenamiento para diferentes cultivares de brócoli. Para el cultivar Legacy se han reportado incrementos de la AOC con el tiempo, al igual que se observó en este estudio (Hasperué et al., 2016). En el cultivar Parthenon, se han reportado disminuciones significativas de este parámetro durante el almacenamiento tanto bajo atmósfera controlada como modificada (Fernández-León et al., 2013a; Fernández-León et al., 2013b). Estudios realizados en cabezas de brócoli cv. Marathon MAP, mostraron que la AOC se conserva durante 28 días (Serrano et al., 2006). Las diferencias genéticas entre cultivares parecen ser un factor determinante en la evolución del AOC en el brócoli durante el almacenamiento refrigerado. Además, se han observado variaciones de la respuesta al estrés causado por las condiciones de almacenamiento entre distintos cultivares (Villarreal-García et al., 2016). Los resultados encontrados en la literatura sobre la evolución del AOC durante el almacenamiento del brócoli muestran la necesidad de generar mayor conocimiento para poder seleccionar los cultivares y las condiciones de almacenamiento adecuados para mantener sus propiedades bioactivas durante la comercialización. En este estudio se determinaron condiciones de almacenamiento que permitieron conservar, e incluso incrementar, la AOC de floretes de brócoli (*Brassica oleracea* var. *italica* cv. Legacy) durante un período adecuado de comercialización.

6.1.2.8. Ácidos hidroxicinámicos (HCA)

En todas las muestras se identificaron: ácido sinápico (y derivados) y ácido clorogénico (y derivados), siendo los predominantes los del tipo sinápico (72% del total). Estos compuestos fueron afectados significativamente por la temperatura y tiempo de almacenamiento ($p < 0,001$) (**Tabla 6. 3**). Floretes almacenados a 4°C presentaron un incremento al día 14 (de 21%) y posterior descenso hacia el final del almacenamiento, siendo el porcentaje de pérdida total 14% (21 días). Floretes almacenados a 8 y 15°C presentaron un descenso significativo a lo largo del almacenamiento, con pérdidas totales de 21% (en 21 días) y 42% (en 14 días) respectivamente. Por lo tanto, el contenido de HAC estuvo afectado significativamente por la temperatura, donde mayores temperaturas de almacenamiento provocaron mayores pérdidas de estos compuestos.

Se hubiera esperado que existiera correlación entre la capacidad antioxidante y el contenido de HCA, pero no fue así. Por lo que podría inferirse que son otros compuestos, y no los HCA, los que contribuyen principalmente a la capacidad antioxidante de floretes de brócoli.

6.1.2.9. Evaluación sensorial

No se encontraron diferencias significativas en el color entre floretes almacenados a diferentes temperaturas ($p = 0,08$) (**Figura 6. 7 - a**). La tendencia fue levemente decreciente con el tiempo (pérdida de color verde), pero sin diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,45$). Estos resultados coinciden con las medidas de color instrumental.

La temperatura de almacenamiento tuvo un efecto significativo en el aroma característico y la apariencia externa de los floretes de brócoli (**Figura 6. 7 - b y c**). Floretes almacenados a 15°C presentaron un descenso pronunciado tanto del aroma característico como de la apariencia externa. A los 7 días presentaron puntajes aptos (por encima de los 3 puntos que fueron definidos como límite de comercialización), pero a los 14 días presentaron el mínimo puntaje asociado a una calidad inadmisibles para la comercialización y consumo. Aunque estos floretes estuvieron expuestos a niveles recomendados de O₂, la baja concentración de este gas combinada con la alta

temperatura de almacenamiento provocó el desarrollo de malos olores vinculados al metabolismo fermentativo (Jones et al., 2006). Brócolis almacenados a 4 y 8°C conservaron estos atributos de calidad a lo largo del período evaluado, sin diferencias significativas entre ellos. Por lo tanto, se pudo identificar un rango de temperaturas (4-8°C) y atmósferas internas (1,2 - 9,1 kPa de O₂ y 11,1- 16,8 CO₂) que permitieron preservar la calidad sensorial de floretes de brócoli durante 21 días, período adecuado para la correcta comercialización de este producto evitando pérdidas durante la cadena de suministro.

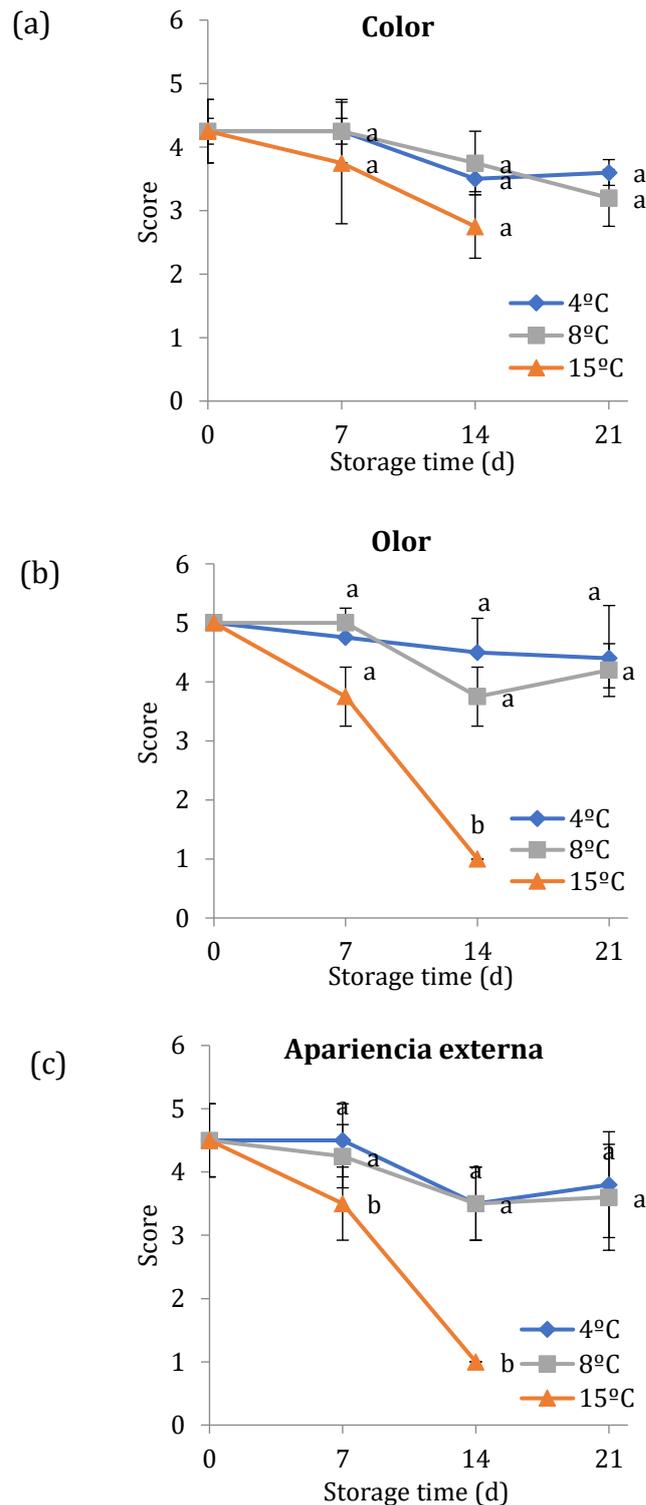


Figura 6. 7. Evolución de atributos sensoriales (puntaje de 1 a 5) de floretes de brócoli MAP en polipropileno perforado, durante el almacenamiento a 4, 8 y 15°C: (a) Color, (b) Olor (c) apariencia externa. Las barras verticales representan la desviación estándar ($n = 3$) y letras diferentes indican diferencias significativas entre temperaturas de almacenamiento (dentro del mismo día) según el test de Tukey ($p < 0,05$).

6.1.2.10. Análisis de componentes principales (PCA)

No se han encontrado reportes de la relación que existe entre los distintos parámetros de calidad del brócoli o floretes de brócoli, y tampoco sobre si existe correlación entre la calidad exterior y el contenido de compuestos bioactivos. Para generar información al respecto, se realizó un PCA (basado en la matriz de correlación) para obtener una representación gráfica y sencilla del conjunto de variables estudiadas y analizar su correlación.

Se obtuvo que los componentes principales 1 y 2 (PC1 y PC2) del PCA explicaron el 73,0 % de la variabilidad total de los datos (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**). Las variables pérdida de masa, color, olor, apariencia externa y contenido de HCA fueron bien representadas y correlacionadas con el PC1 (**Tabla 6. 5 y Figura 6. 8 - A**). Esto indica que existe correlación entre dichas variables y que evolucionaron de forma similar durante el almacenamiento. Dado que las variables se asocian con el proceso de deterioro, tiene sentido que exista correlación entre ellas. El PC1 se correlacionó positivamente con las variables que disminuyeron su valor a lo largo del tiempo (color, olor, apariencia externa y HCA) y negativamente con las variables que aumentaron su valor (pérdida de masa y capacidad antioxidante por ORAC). La dureza y actividad antioxidante por ABTS fueron mejor representadas por el PC2, por lo que no hubo correlación de estas variables con la pérdida de masa (ver 6.1.2.4. Textura), atributos sensoriales y contenido de HCA. Para el contenido de GSL, el PC1 explicó un 30% de la variabilidad de los datos y el PC3 un 42% (**Tabla 6. 5**). Analizando en los componentes 1 y 3, el contenido de GLS y HCA se correlacionó moderadamente con los atributos sensoriales, por lo que podría existir relación entre la calidad organoléptica y el potencial bioactivo. Estas variables se correlacionaron negativamente con la pérdida de masa y con la capacidad antioxidante por ORAC. En la **Figura 6. 8 - B** (representación de las muestras de brócoli en los componentes principales 1 y 2) se puede observar que muestras recién cosechadas se ubican hacia valores positivos del PC1 (mayores valores de atributos sensoriales y contenido de compuestos bioactivos) y negativos del PC2 (menores valores de dureza). A medida que aumenta el tiempo de almacenamiento las muestras se ubican a lo largo del PC1 en orden descendente y toman valores positivos en el PC2. En la representación se puede observar el efecto

de la temperatura sobre las características de los floretes. Se distingue que muestras almacenadas a 4°C se ubican hacia valores positivos del PC1, y que muestras almacenadas a mayores temperaturas se ubican hacia valores negativos. Además, se distinguen las muestras almacenadas durante 14 días a 15°C que presentan características muy distintas al resto, indicando el marcado deterioro de las mismas.

Tabla 6. 4. Valores propios de cada componente, porcentaje de varianza explicada por cada componente y varianza explicada acumulada.

Componente	Valor propio	Porcentaje de varianza	Porcentaje de varianza acumulada
PC1	4,93	54,83	48,83
PC2	1,64	18,19	73,02
PC3	1,15	12,81	85,83

Tabla 6. 5. Coseno cuadrado de las variables en cada componente.

Variable	PC1	PC2	PC3
ML	0,90	0	0,02
Dureza (Hardness)	0,01	0,85	0,01
Color	0,69	0	0,23
Olor (Odor)	0,91	0,06	0
Apariencia externa (Appearance)	0,87	0,03	0,07
GSL	0,30	0,11	0,42
HCA	0,64	0	0,15
ABTS	0,14	0,55	0,11
ORAC	0,48	0,03	0,14

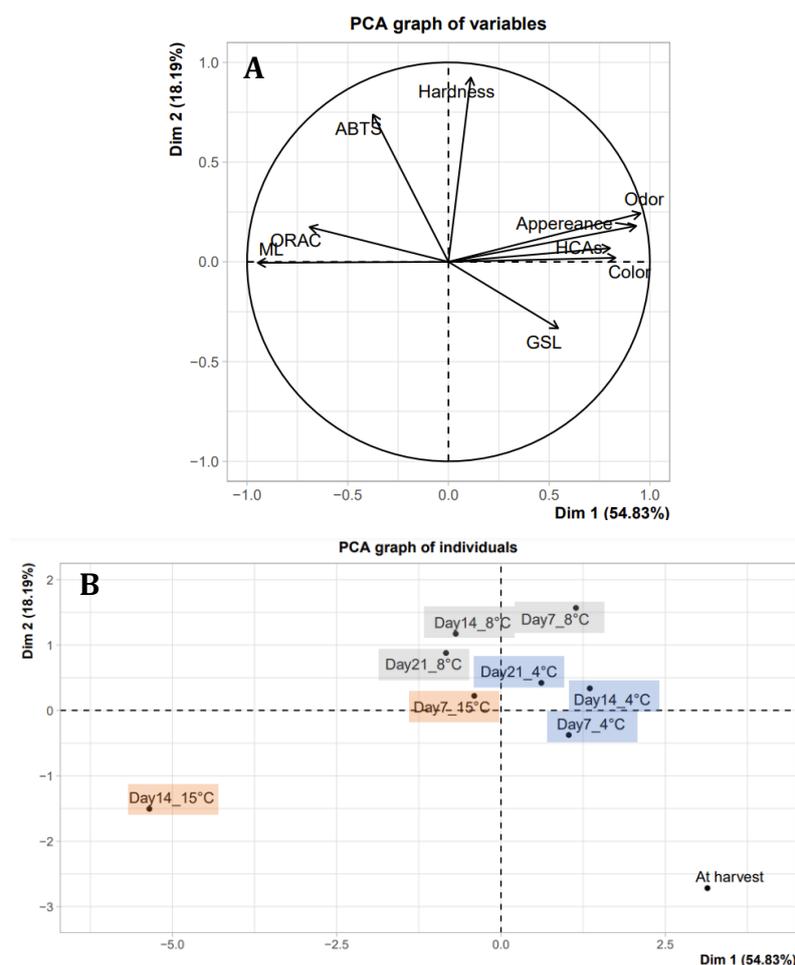


Figura 6. 8. Representación de los parámetros de calidad (A) y de muestras de floretes de brócoli MAP en polipropileno perforado, almacenadas por distintos tiempos a distintas temperaturas (4°C ■, 8°C ■ y 15°C ■) (B) en el primer y segundo componente del análisis de componentes principales.

6.1.3. Conclusiones parciales

Se determinaron rangos de temperatura de almacenamiento (4-8°C) y concentraciones de O₂ (1,2 - 9,1 kPa) y CO₂ (11,1 - 16,8 kPa) que permitieron extender la vida útil de floretes de brócoli hasta al menos 21 días, conservando su calidad externa y sus principales compuestos bioactivos.

La temperatura de almacenamiento tuvo un efecto significativo en la mayoría de los atributos de calidad de floretes de brócoli cv. Legacy envasados en atmósfera modificada. En las condiciones de envasado estudiadas, la temperatura de almacenamiento debe mantenerse próxima a 4°C para evitar riesgos de anaerobiosis. Esta temperatura permitió preservar durante 21 días la calidad

sensorial, color, masa, contenido total de glucosinolatos y actividad antioxidante de los floretes de brócoli. Floretes almacenados a 8°C mostraron una evolución similar del color, textura, contenido de glucosinolatos y atributos sensoriales. La capacidad antioxidante incluso fue superior en floretes almacenados a 8°C que a 4°C. Se infiere que la composición atmosférica alcanzada durante el almacenamiento a 8°C mitigó el efecto perjudicial de la temperatura sobre los parámetros de calidad. El envasado en polipropileno perforado y almacenamiento a 15°C provocó un detrimento acelerado de la calidad de los floretes de brócoli (vida útil inferior a 14 días), generando características sensoriales indeseables y pérdidas significativas en el contenido de glucosinolatos y ácidos hidroxicinámicos.

El análisis de componentes principales indicó que existe correlación entre la mayoría de los parámetros de calidad evaluados. El contenido de compuestos bioactivos presentó una correlación moderada con los parámetros de calidad externa de los floretes de brócoli.

6.2. Impacto del nivel de microperforación del film y de la temperatura de almacenamiento en el contenido de fitoquímicos y calidad externa de floretes de brócoli

6.2.1. Diseño experimental

Cabezas de brócoli (cv. Marathon) se obtuvieron y procesaron como se describe en el Capítulo 4 (Materiales y Métodos, sección 4.1). Los floretes se dividieron al azar en 3 grupos homogéneos, uno por cada film de envasado. Se evaluaron films de BOPP (polipropileno biorientado), con dos líneas de micro perforaciones láser y tres niveles de separación entre perforaciones: 15 mm (CAD15), 30 mm (CAD30) y 45 mm (CAD45) (ver 5.1.2.1.). Se confeccionaron 40 bolsas de 26 x 20 cm de cada uno de los films. Aproximadamente 150 ± 9 g de floretes de broccoli (4-5 unidades) se colocaron dentro de las bolsas y se termosellaron. Después del envasado, cada grupo (CAD15, CAD30 Y CAD45) se subdividió en dos grupos:

- Almacenamiento a 2°C
- Almacenamiento a 2°C y posterior aumento a 7°C durante los dos días previos al muestreo

Las muestras se almacenaron durante 21 días. Cada bolsa constituyó una unidad experimental. Los muestreos se realizaron los días 0, 7, 14 y 21, y se muestrearon 5 unidades experimentales por cada condición. Durante el almacenamiento se determinó: composición gaseosa del espacio cabeza, pérdida de masa, color, textura (compacidad del florete), apariencia externa, contenido de glucosinolatos y ácidos hidroxicinámicos. En la **Figura 6. 9** se muestra un esquema del diseño experimental descrito y la nomenclatura empleada para referirse a cada uno de los tratamientos estudiados.

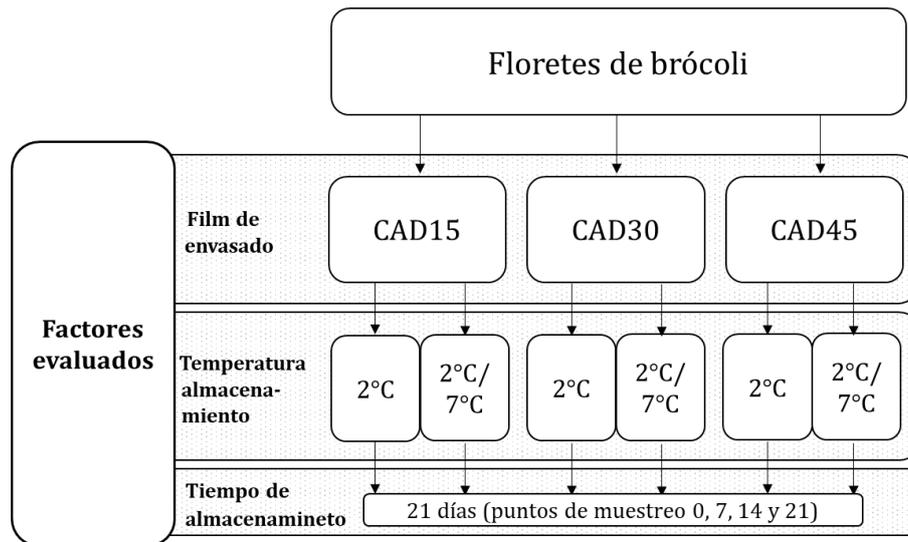


Figura 6. 9. Diagrama del diseño experimental para evaluar el efecto del nivel de perforación del film y temperatura de almacenamiento en el contenido de compuestos bioactivos y calidad externa de floretes de brócoli (cv. Marathon) envasados en atmósfera modificada.

Films de envasado: CAD15, CAD30 y CAD45 se refiere al nivel de perforación del film de BOPP (15 mm, 30 mm y 45 mm de distancia entre perforaciones, respectivamente).

Temperatura de almacenamiento: 2 °C) los floretes de brócoli se mantuvieron a 2 °C durante todo el almacenamiento. 2°C/7°C) los floretes de brócoli se mantuvieron a 2°C y se transfirieron a 7°C dos días antes del muestreo.

6.2.2. Resultados y discusión

6.2.2.1. Composición gaseosa del espacio cabeza

Todos los envases mostraron cambios significativos en la composición de O₂ y CO₂ a lo largo del almacenamiento (**Figura 6. 10**) ($p < 0,001$). Además, se observó un efecto significativo del nivel de perforación del film y de la temperatura de almacenamiento en la evolución de estas variables ($p < 0,001$).

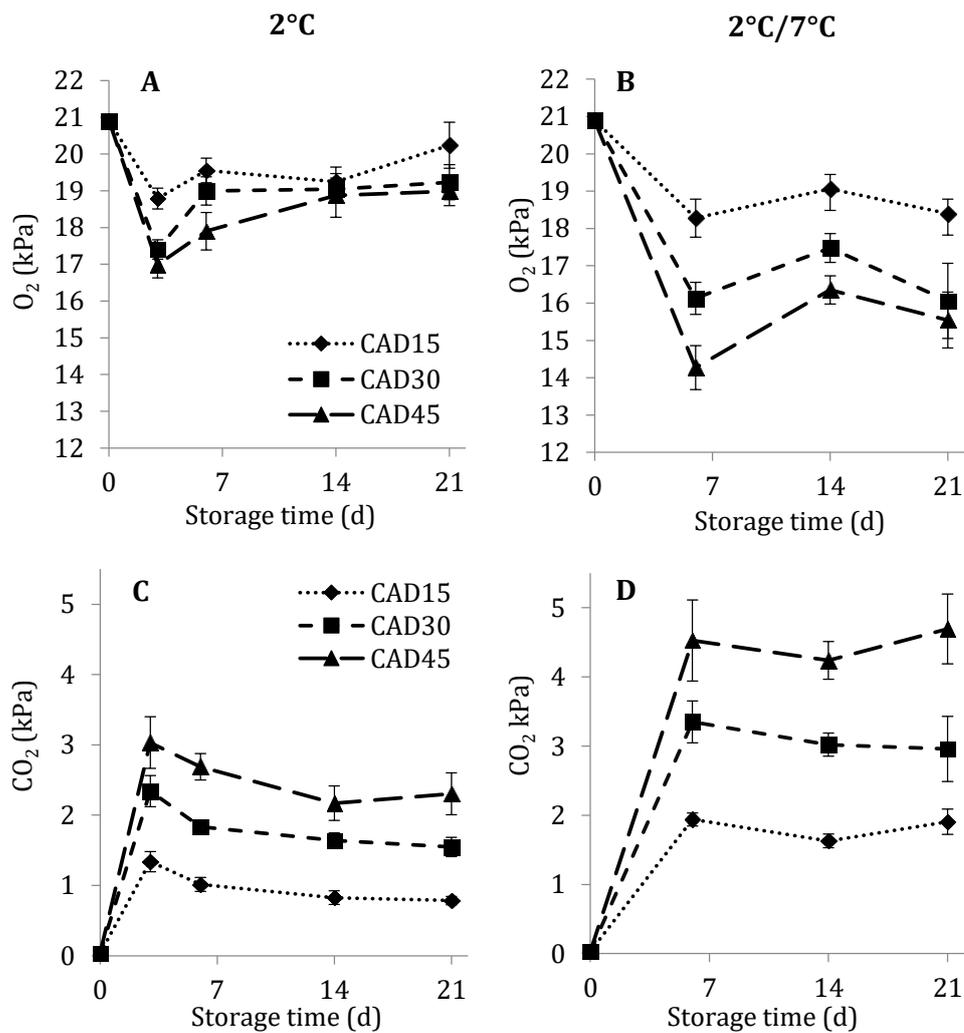


Figura 6. 10. Evolución de la composición gaseosa dentro del envase (O₂ and CO₂) de floretes de brócoli envasados en films con diferentes niveles de microperforación (CAD15 ···◆···, CAD30 - ■ -, CAD45 —▲—) a lo largo del almacenamiento a 2 °C (A y C) y a 2°C/7°C (B y D). Las barras verticales representan la desviación estándar (n = 5).

La reducción de O₂ e incremento de CO₂ en MAP dependen principalmente de la tasa respiratoria del producto y de la tasa de transmisión a los gases del film de envasado. En el caso particular del MAP utilizando films microperforados, la tasa de transmisión de O₂ y CO₂ del film depende principalmente del área perforada (González-Buesa et al., 2013), ya que el flujo difusivo de los gases a través de las perforaciones tiene mayor peso que el flujo difusivo a través del film (Belay et al., 2016; González-Buesa & Salvador, 2022). Incluso existen modelos empíricos que relacionan el área total de las perforaciones con la tasa de transmisión al O₂ y al CO₂, independiente de las propiedades de transferencia del film (González-Buesa et al.,

2009b). Esto explica las diferencias observadas en la evolución de O₂ y CO₂ y su correlación con el número de perforaciones del envase.

A 2°C, los niveles de CO₂ alcanzados el día 7 fueron $1,01 \pm 0,04$; $1,83 \pm 0,03$ y $2,69 \pm 0,08$ kPa para CAD15, CAD30 y CAD45 respectivamente. Las diferencias se mantuvieron a lo largo del almacenamiento ($p < 0,0001$). Respecto a la concentración de O₂, las muestras CAD15 y CAD30 no mostraron diferencias significativas al día 7 ($19,3 \pm 0,32$ kPa en promedio), y CAD45 presentó una concentración significativamente menor ($17,9 \pm 0,39$ kPa). Al día 21, las muestras CAD30 y CAD45 no presentaron diferencias significativas ($19,1 \pm 0,33$ kPa en promedio) mientras que CAD15 mostró el mayor valor de O₂ ($20,4 \pm 0,49$ kPa).

El incremento de la temperatura de almacenamiento provocó mayores cambios en la composición gaseosa dentro de los envases respecto a aquellos que se mantuvieron a 2°C ($p < 0,01$). Este comportamiento es debido al incremento de la tasa respiratoria provocado por el aumento de la temperatura (Fonseca et al., 2002). Las diferencias en la composición gaseosa entre films fueron más marcadas en floretes almacenados a 2°C y posteriormente transferidos a 7°C ($p < 0,001$) (**Figura 6. 10-B y D**). En estas condiciones de temperatura, las muestras CAD15 presentaron la mayor concentración de O₂ y menor de CO₂ ($18,3 \pm 0,40$ kPa y $1,9 \pm 0,04$ kPa, respectivamente, al día 7) y las muestras CAD45 mostraron la menor concentración de O₂ y mayor de CO₂ ($14,3 \pm 0,45$ kPa y $4,5 \pm 0,26$ kPa, respectivamente, al día 7). Floretes envasados en CAD30 mostraron niveles intermedios de O₂ y CO₂ ($16,1 \pm 0,33$ kPa y $3,3 \pm 0,13$ kPa, respectivamente, al día 7). La diferencia en la composición atmosférica entre films se mantuvo hasta el final del almacenamiento ($p < 0,001$). Una evolución de gases similar fue reportada por Lucera et al. (2011) para floretes de brócoli envasados en polipropileno microperforado (20 micro perforaciones de 70 µm de diámetro) y almacenados a 5°C, quienes observaron un descenso paulatino del O₂ y un valor de equilibrio de aproximadamente 16 kPa.

Este estudio demostró que el MAP con films microperforados fue efectivo en prevenir el desarrollo de anaerobiosis durante el incremento de la temperatura de almacenamiento de floretes de brócoli (en ningún caso la concentración de O₂ fue menor a 14 kPa y la de CO₂ mayor a 5 kPa). Durante el almacenamiento a 2°C, la modificación de la atmosfera fue significativa pero moderada. En floretes trasferidos

a 7°C, los envasados en CAD45 alcanzaron concentraciones de O₂ y CO₂ próximas a los valores recomendados para la extensión de la vida útil de brócoli. Las condiciones ensayadas en este estudio previnieron el riesgo de desarrollo de anaerobiosis durante cadenas de suministro que pudieran alcanzar valores próximos a los 7°C. Es necesario evaluar si los films microperforados también pueden prevenir la generación de anoxia y alcanzar adecuados niveles de O₂ y CO₂ en condiciones de almacenamiento más severas.

6.2.2.2. Pérdida de masa

Como se puede esperar, la pérdida de masa (ML) aumentó a lo largo del almacenamiento en todas las muestras ($p < 0,05$). Sin embargo, fue menor al 0,5% durante todo el período estudiado, independientemente del tipo de film y temperatura de almacenamiento (**Tabla 6. 6**). El incremento de temperatura, desde 2°C a 7°C, no tuvo un efecto significativo en la ML, aunque los floretes trasferidos a 7°C tendieron a presentar una ML superior respecto a los mantenidos a 2°C. En nivel de perforaciones del envase tampoco tuvo un efecto significativo en la ML, aunque CAD45 y CAD15 tendieron a presentar los menores y mayores valores respectivamente.

La combinación de una baja temperatura de almacenamiento (2°C) con el MAP en films micro perforados resultó efectiva en prevenir la deshidratación de floretes de brócoli. En este estudio, independientemente del nivel de perforación del film y del incremento de temperatura a 7°C, la pérdida de masa fue inferior a 0,5 % no siendo un parámetro limitante de la vida útil. Por lo tanto, las condiciones de envasado evaluadas (BOPP micro perforado) permitieron preservar este importante atributo de calidad durante al menos 21 días, incluso durante el almacenamiento con incremento de temperatura.

Tabla 6. 6. Pérdida de masa (%) de floretes de brócoli envasados en films con diferentes niveles de microperforación (CAD15, CAD30, CAD45) durante el almacenamiento a 2°C y 2°C/7°C. Los datos se expresan como media \pm desviación estándar. Valores con la misma letra significa que no existen diferencias significativas según el test de Tukey ($p < 0,05$).

Film	Tiempo (d)	Pérdida de masa (%)			
		2°C		2/7°C	
CAD15	0	0,0 \pm 0,0	a	0,0 \pm 0,0	a
	7	0,15 \pm 0,09	abc	0,18 \pm 0,1	bcdef
	14	0,30 \pm 0,07	bcdef	0,26 \pm 0,07	defg
	21	0,36 \pm 0,04	efg	0,44 \pm 0,2	h
CAD30	0	0,0 \pm 0,0	a	0,0 \pm 0,0	a
	7	0,08 \pm 0,04	ab	0,12 \pm 0,04	abcd
	14	0,18 \pm 0,09	bcdef	0,23 \pm 0,04	cdefg
	21	0,28 \pm 0,09	efg	0,33 \pm 0,09	gh
CAD45	0	0,0 \pm 0,0	a	0,0 \pm 0,0	a
	7	0,08 \pm 0,02	ab	0,09 \pm 0,02	abc
	14	0,16 \pm 0,1	bcde	0,18 \pm 0,02	bcdefg
	21	0,26 \pm 0,02	defg	0,31 \pm 0,07	fgh

6.2.2.3. Color

En las condiciones del ensayo, el nivel de perforación del film y la temperatura de almacenamiento no tuvieron un impacto significativo en el color de los floretes ($p > 0,05$): L^* ($38,0 \pm 1,9$), C^*_{ab} ($12,2 \pm 1,9$) y h_{ab} ($133,2 \pm 1,8$) permanecieron sin cambios a lo largo del almacenamiento y en el mismo valor que los brócolis recién cosechados. En la **Figura 6. 11** se observa que no existieron cambios apreciables en el color a lo largo del almacenamiento.

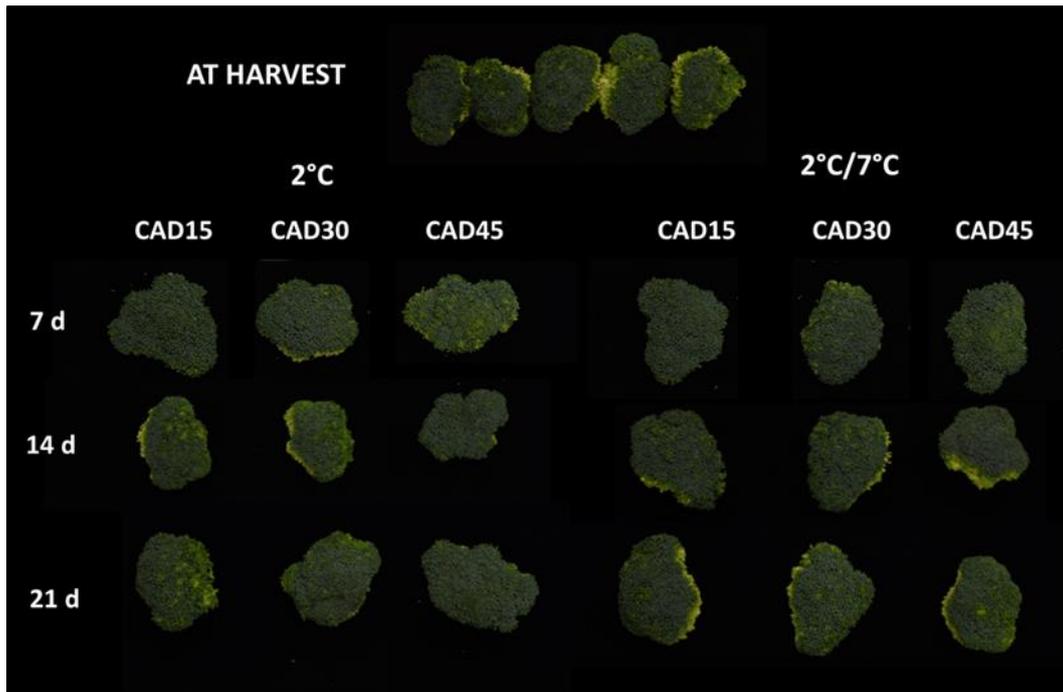


Figura 6. 11. Evolución de la calidad visual de floretes de brócoli envasados en film con diferentes niveles de microperforaciones (CAD15, CAD30, CAD45) y almacenados en dos condiciones de temperatura (2°C y 2°C/7°C) durante 21 días.

Los cambios de color en floretes de brócoli MAP dependen de las concentraciones de O_2 y CO_2 a las que estén expuestos (Schouten et al., 2009). Que no haya existido efecto de la composición gaseosa en el color se explica por la baja temperatura de almacenamiento (2°C). La temperatura es el factor predominante en la degradación del color, y a temperaturas bajas el efecto de la atmósfera es poco significativo (Schouten et al., 2009). Dos días a 7°C tampoco mostró tener efecto significativo en el color. Varios autores han reportado que los brócolis retienen su color en concentraciones de O_2 bajas (1-10 kPa) y altas de CO_2 (5-10 kPa) (Fernández-León et al., 2013; Jia et al., 2009; Schouten, et al., 2009; Serna-Escolano et al., 2021). La aplicación de MAP usando films convencionales continuos (o perforados, pero con baja tasa de transferencia al O_2) alcanzan estas composiciones gaseosas e inhiben la pérdida de color (Fernández-León, Fernández-León, Lozano, Ayuso, Amodio, et al., 2013), como muestran los resultados de la sección 6.1. Generalmente, estas condiciones estrictas de composición gaseosa no son alcanzadas al emplearse films microperforados, debido a su mayor permeabilidad. Este estudio demostró que no son necesarios niveles tan bajos de O_2 ni tan elevados de CO_2 para mantener el color

de floretes de brócolis durante el almacenamiento refrigerado. Además, el incremento de la temperatura (por dos días) no afectó el color. Por lo tanto, el MAP empleando films microperforados mostró ser una tecnología efectiva para la preservación de este importante parámetro de calidad en combinación con el almacenamiento refrigerado.

6.2.2.4. Textura

En este ensayo, el test de textura se realizó de forma de evaluar la compacidad (firmeza a la presión) de los floretes de brócoli (ver Capítulo 4, sección 4.7.2).

Los floretes de brócoli mostraron un descenso de la firmeza a lo largo del tiempo ($p < 0,0001$) independientemente del film y temperatura de almacenamiento (**Figura 6. 12**). Como fue indicado en la sección 6.1., en vegetales MAP la temperatura de almacenamiento es el factor más relevante que afecta parámetros de calidad como la textura (Fonseca et al., 2000). Sin embargo, en las condiciones de este estudio, no se observaron diferencias significativas en la evolución de la firmeza entre floretes mantenidos a 2°C y floretes transferidos a 7°C durante dos días ($p = 0,7236$). Por otro lado, se obtuvieron diferencias significativas en la firmeza entre floretes envasados en distintos films ($p = 0,0004$). Los floretes envasados en CAD15 mostraron un rápido descenso en la primera semana, y permanecieron sin cambios hasta el final del almacenamiento. Al día 7, floretes en CAD30 y CAD45 mostraron mayor firmeza respecto a las muestras CAD15. En los días 14 y 21, las muestras CAD45 mostraron mayores valores de firmeza respecto a las muestras CAD15 y CAD30, que no mostraron diferencias significativas entre si (a ambas temperaturas).

El efecto del MAP en mantener la firmeza de hortalizas usualmente se relaciona con el control de la pérdida de masa, y varios trabajos han encontrado correlación entre estos dos parámetros (Belay et al., 2016; Nimitkeatkai et al., 2022). A pesar de que no se encontraron diferencias significativas en la pérdida de masa, floretes envasados en CAD15 tendieron a perder mayor masa y que los envasados CAD45. Por lo tanto, la evolución de la firmeza podría estar vinculada con la pérdida de masa. Por otra parte, la evolución de la firmeza también puede estar asociada a la actividad de enzimas involucradas en los procesos bioquímicos de deterioro de la

estructura celular, que se puede reducir al disminuir los niveles de O₂ y aumentar los de CO₂ (Fagundes et al., 2015; Nimitkeatkai et al., 2022). Los resultados obtenidos en este estudio coinciden con estos reportes, donde floretes envasados en CAD45 retuvieron en mayor media la firmeza y también fueron los que presentaron mayor modificación de la atmósfera interior. Es importante notar que las diferencias en la firmeza entre floretes de brócoli envasados en distintos films no tuvieron un impacto relevante en la apariencia externa (ver 6.2.2.5. *Apariencia externa*). Este resultado puede validarse con la **Figura 6. 11**, donde todas las flores se ven cerradas, compactas, con apariencia firme.

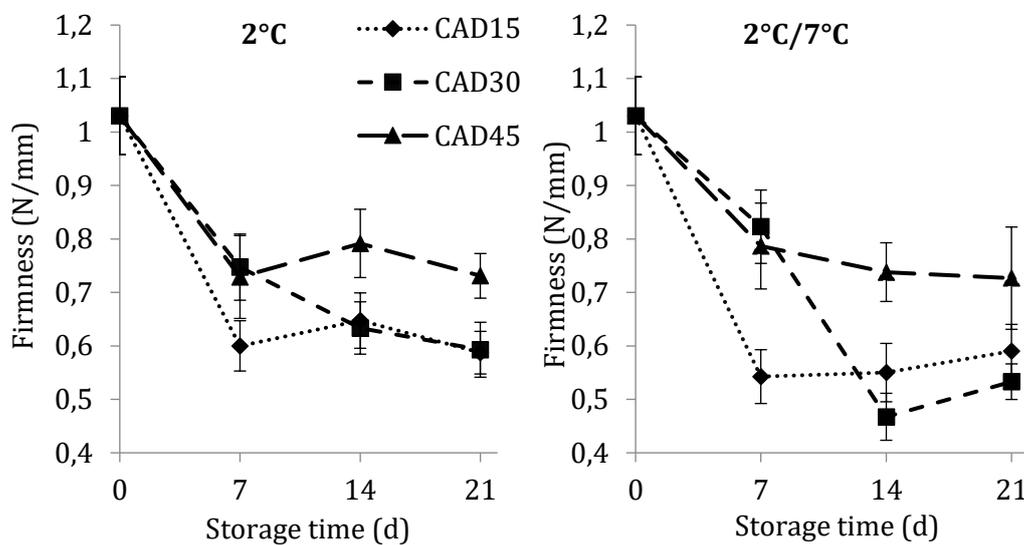


Figura 6. 12. Evolución de la firmeza de floretes de brócoli envasados en películas de BOPP con diferente nivel de microperforación (CAD15 $\cdots\blacklozenge\cdots$, CAD30 $- \blacksquare -$, CAD45 $\rightarrow\blacktriangle\leftarrow$) durante el almacenamiento a 2°C y 2°C/7°C. Las barras verticales representan la desviación estándar (n = 5).

6.2.2.5. Apariencia externa

En todas las condiciones, los floretes de brócoli mostraron una disminución del puntaje de apariencia externa a lo largo del tiempo, indicando una disminución en la calidad sensorial (**Tabla 6. 7**) ($p < 0,001$). Sin embargo, todas las muestras mostraron valores por encima del límite de comercialización (3 puntos) durante todo el período de almacenamiento y a ambas condiciones de temperatura. El nivel de perforación del film no tuvo un efecto significativo en la evolución de la

apariciencia ($p = 0,3087$). Para los floretes de brócoli envasados en CAD30 y CAD45, no se encontraron diferencias significativas entre las temperaturas de almacenamiento, aunque los floretes de brócoli almacenados a $2^{\circ}\text{C}/7^{\circ}\text{C}$ tendieron a mostrar una puntuación de apariencia externa más baja en comparación con las muestras almacenadas a 2°C . Se encontró un efecto significativo de la temperatura en floretes de brócoli envasados en CAD15 ($4,3 \pm 0,3$ y $3,6 \pm 0,5$ para almacenamiento de brócoli a 2°C y $2^{\circ}\text{C}/7^{\circ}\text{C}$, respectivamente). Por lo tanto, se infiere que las películas con niveles de perforación más bajos (CAD30 y CAD45) ayudaron a mitigar el efecto negativo del aumento de la temperatura en la apariencia externa del brócoli.

En la **Figura 6. 11** se observa que la apariencia externa se conservó durante 21 días de almacenamiento en todas las condiciones estudiadas. Por lo tanto, la tecnología MAP empleando films microperforados contribuyó con éxito a preservar la apariencia externa de los floretes de brócoli, incluso durante el incremento de temperatura.

Tabla 6. 7. Apariencia externa global (puntaje de 1-5) de floretes de brócoli envasados en films con diferentes niveles de microperforación (CAD15, CAD30, CAD45) durante el almacenamiento a 2°C y $2^{\circ}\text{C}/7^{\circ}\text{C}$. Los datos se expresan como media \pm desviación estándar. Valores con la misma letra significa que no existen diferencias significativas según el test de Tukey ($p < 0,05$).

Film	Tiempo (d)	Apariencia externa (1-5)			
		2°C		$2^{\circ}\text{C}/7^{\circ}\text{C}$	
CAD15	0	$5,0 \pm 0,0$	a	$5,0 \pm 0,0$	a
	7	$4,7 \pm 0,7$	ab	$4,4 \pm 0,7$	bcdef
	14	$4,3 \pm 0,7$	efg	$4,3 \pm 0,4$	defg
	21	$4,3 \pm 0,7$	efg	$3,6 \pm 1$	h
CAD30	0	$5,0 \pm 0,0$	a	$5,0 \pm 0,0$	a
	7	$4,4 \pm 0,7$	abc	$4,5 \pm 0,7$	bcde
	14	$4,5 \pm 0,4$	bcde	$4,3 \pm 0,4$	defg
	21	$4,0 \pm 0,9$	gh	$3,8 \pm 0,9$	hi
CAD45	0	$5,0 \pm 0,0$	a	$5,0 \pm 0,0$	a
	7	$4,7 \pm 0,7$	abc	$4,3 \pm 0,7$	defg
	14	$4,6 \pm 0,4$	bcd	$4,4 \pm 0,4$	cdefg
	21	$4,1 \pm 0,4$	fgh	$3,9 \pm 0,9$	hi

6.2.2.6. Contenido total de glucosinolatos (GSL)

Se detectaron GSL de dos clases químicas, uno alifático: glucorafanina (GRA) y tres indólicos: glucobrasicina (GB), neoglucobrasicina (NGB) y 4-metoxiglucobrasicina (MGB). El GSL predominante fue la GRA con un 41,2% del total, seguido por la NGB, GB y MGB con 32,7%, 19,5% y 6,2% respectivamente. A pesar de que el componente predominante fue del tipo alifático, el grupo predominante de compuestos fue el indólico con un 58% del total de GSL. Este perfil se asemeja a reportes de perfiles de brócolis del mismo cultivar (Marathon) (Pérez-Balibrea et al., 2011; Vallejo et al., 2003b) y a otros estudios que han reportado a la GRA como el GSL predominante y a la NGB y GB como los GSL mayoritarios dentro del grupo de los indólicos (Jia et al., 2009; Jones et al., 2006; Rybarczyk-plonska et al., 2016; Vallejo et al., 2003b; G. Yuan et al., 2010). Diferente fue el perfil determinado en la sección 6.1.2.6. para brócolis del cultivar Lecagy (con predominancia de GB y NGB), confirmando que el perfil de glucosinolatos depende del cultivar.

No se observaron cambios en el perfil de GSL durante el almacenamiento en ninguna condición. Resultados semejantes fueron obtenidos por Vallejo et al. (2003) quienes estudiaron el efecto del transporte refrigerado en el contenido de GSL en cabezas de brócoli (cv. Marathon) e identificaron GRA, GB, NGB y MGB en todas las muestras hasta el final del período de estudio.

En todas las muestras, se observó un incremento del contenido total de GSL durante la primera semana de almacenamiento. Esto es debido al estrés abiótico producto de los daños en el tejido durante el procesamiento (corte), que lleva a un incremento de las biosíntesis de GSL durante los primeros días de almacenamiento (Torres-Contreras et al., 2017).

No hubo un efecto significativo del film sobre el contenido total de GSL durante el almacenamiento constante a 2°C (**Figura 6. 13, A**). Dado que la temperatura de almacenamiento se mantuvo baja, modificaciones leves de la atmósfera no tuvieron impacto significativo en el contenido de estos compuestos. Sin embargo, el film tuvo un efecto significativo al incrementarse la temperatura de almacenamiento (**Figura 6. 13, B**). Floretes envasados en CAD45 mostraron mayor contenido de GSL totales en comparación con floretes envasados en CAD15 y CAD30, los cuales no mostraron

diferencias entre ellos. Al final del almacenamiento, las muestras de CAD15 y CAD30 mostraron el mismo contenido de GSL que el brócoli recién cosechado, y las muestras de CAD45 mostraron un contenido significativamente mayor. El efecto del film de envasado sobre los GSL al aumentar la temperatura concuerda con los resultados de la sección 6.1., donde se concluyó que la modificación de la atmósfera ayuda a mitigar las pérdidas de GSL al incrementarse la temperatura de almacenamiento (Paulsen et al., 2018). Por otro lado, CAD45 preservó en mayor medida la firmeza, lo que podría implicar una menor degradación de tejidos y por lo tanto menor hidrólisis de estos compuestos (Casajús et al., 2020).

En conclusión, el MAP utilizando films microperforados combinado con refrigeración mostró preservar el contenido total de GSL de floretes de brócoli durante 21 días de almacenamiento, e incluso el contenido aumentó al mantener la temperatura de almacenamiento constante a 2°C. Este es un hallazgo a destacar, ya que hasta el momento los reportes informan conservación de GSL para floretes de brócoli MAP con modificaciones más drásticas de la atmósfera interior (entre 1-5 kPa para O₂ y 10-15 kPa para CO₂) (Jia et al., 2009; Paulsen et al., 2018; Schouten et al., 2009). Las bajas concentraciones de O₂ y las altas concentraciones de CO₂ reportadas como beneficiosas para conservar GSL en floretes de brócoli son riesgosas ya que fluctuaciones de temperatura durante la cadena de suministro podrían generar rápidamente condiciones de anoxia (como se observó en 6.1), lo que conduce al detrimento prematuro del producto. En este estudio se identificaron condiciones de almacenamiento refrigerado (2°C y 2°C/7°C) y modificaciones moderadas de O₂ y CO₂ (14-20 kPa y 1-5 kPa, respectivamente) que conservan el contenido de los principales compuestos bioactivos de floretes de brócoli y que evitan el riesgo de anoxia.

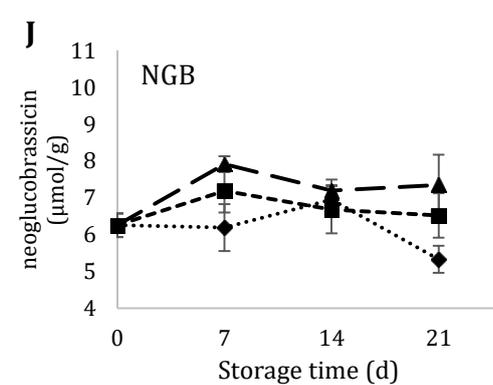
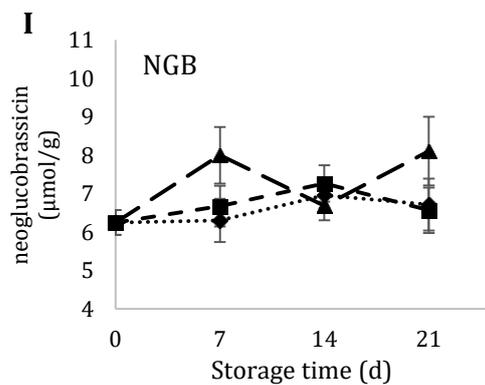
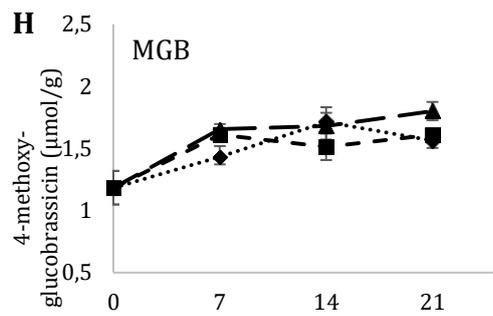
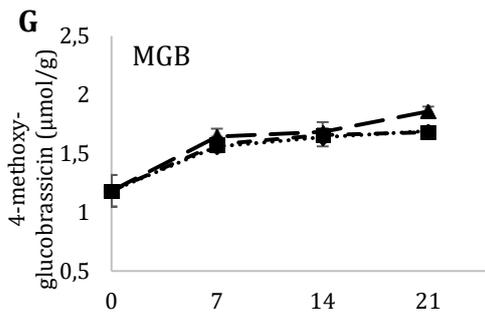
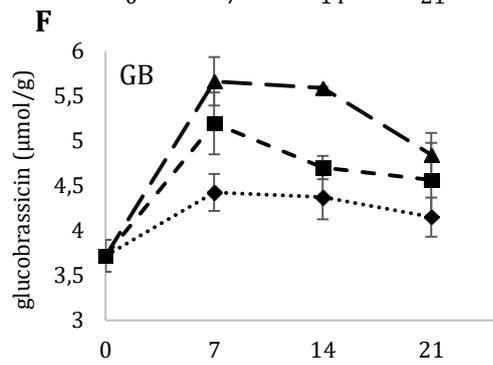
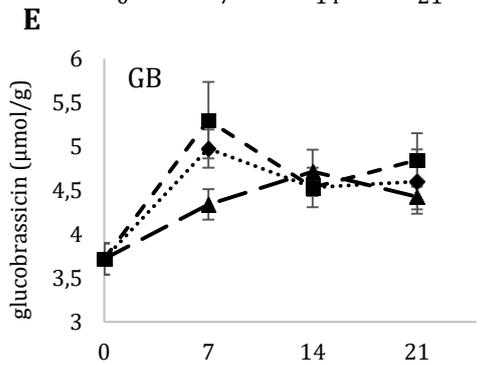
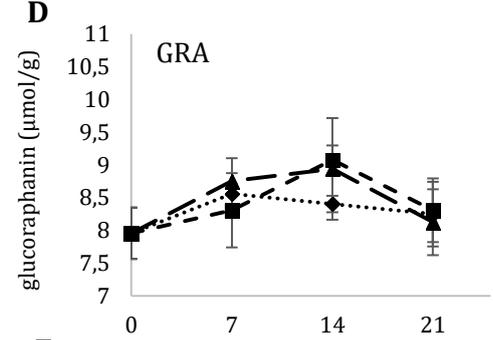
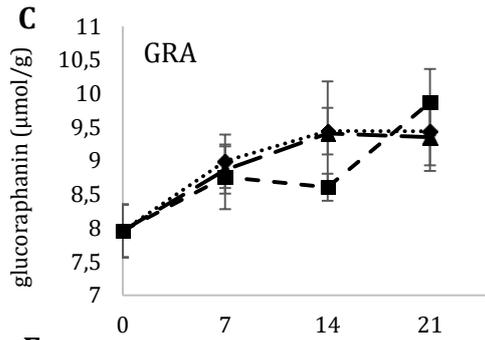
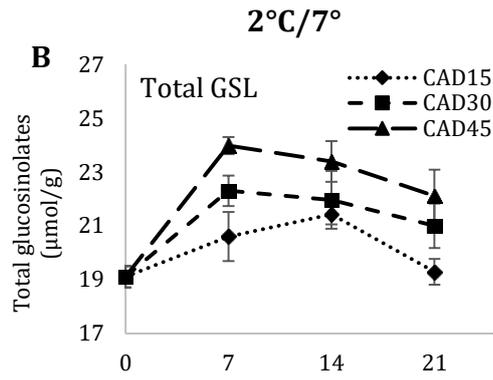
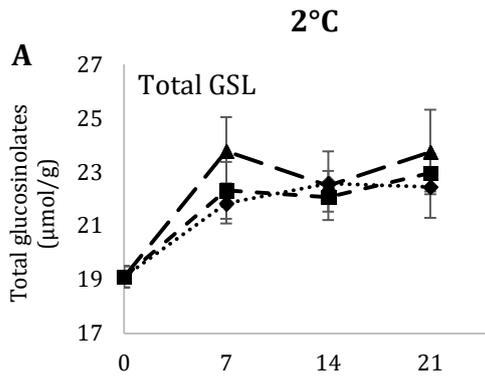


Figura 6. 13. Evolución de: contenido total de glucosinolatos (A-B), GRA (C-D), GB (E-F), MGB (G-H) y NGB (I-J) de floretes de brócoli envasados en films de BOPP con diferentes niveles de microperforación (CAD15 $\cdots\blacklozenge\cdots$, CAD30 $- \blacksquare -$, CAD45 $\blacktriangleleft\blacktriangleright$) almacenados a 2°C y 2°C/7°C. Las barras verticales representan la desviación estándar (n = 3).

6.2.2.7. Contenido de glucosinolatos individuales

Todas las condiciones de envasado y almacenamiento permitieron conservar el contenido de GRA (**Figura 6. 13**, C-D). En el caso de muestras mantenidas a 2°C, GRA mostró una tendencia a aumentar durante el almacenamiento, independientemente del film de envasado (**Figura 6. 13**, C). Estos resultados coinciden con lo observado por Winkler et al. (2007), quienes encontraron niveles estables de GRA en cabezas de brócoli (cv. Marathon) envasadas en polietileno después de un almacenamiento de 3 días a 8°C con almacenamiento previo a 1-4°C. Además, Rybarczyk-Plonska et al. (2016) encontraron resultados similares, reportando que cabezas de brócoli (cv. Marathon) pre almacenadas durante 7 días a 0°C y luego almacenadas durante 3 días a 10°C presentaron un contenido de GRA más alto que en la cosecha. En esos estudios no se informa la composición atmosférica a la que se expusieron las cabezas de brócoli. Sin embargo, los resultados de la sección anterior (6.1), al igual que otros estudios en floretes de brócoli bajo MAP (1-10 kPa O₂ y 10-20 kPa CO₂), muestran que al comienzo del almacenamiento GRA permanece constante, y se observa pérdidas significativas hacia el final (a 4 - 8°C para 12 - 23 días) (Fernández-León, Fernández-León, Lozano, Ayuso, Amodio, et al., 2013; Jia et al., 2009; Paulsen et al., 2018). Esto indica que mantener el contenido de GRA en floretes de brócoli requiere una selección cuidadosa del film de envasado y temperatura de almacenamiento, entre otras consideraciones (como la selección del cultivar, por ejemplo). El MAP con films microperforados y las temperaturas de almacenamiento aplicadas en este estudio permitieron preservar el contenido de GRA, que es uno de los GSL más valorados debido a que es precursor del sulforafano, compuesto altamente reconocido por sus efectos beneficiosos en enfermedades neurodegenerativas y cardiovasculares.

El contenido de GB mostró una evolución similar al contenido de GSL totales (aumentó en la primera semana y luego se mantuvo constante o disminuyó a los

valores iniciales) (**Figura 6. 13**, E-F). El efecto del film se observó en brócolis transferidos a 7°C. En esta condición, el contenido de GB fue de $(4,42 \pm 0,36)$, $(5,19 \pm 0,60)$ y $(5,66 \pm 0,45)$ $\mu\text{mol g}^{-1}$ para brócolis envasados en CAD15, CAD30 y CAD45, respectivamente (día 7). CAD45 mostró un mayor contenido de GB en comparación con CAD15 durante todo el período de almacenamiento (a 2°C/7°C).

El contenido de MGB aumentó en todas las condiciones, independientemente del film de envasado (**Figura 6. 13**, G-H). Un aumento en el contenido de MGB también fue observado en floretes MAP en las condiciones experimentales de la sección 6.1 (ver 6.1.2.6). Al final del almacenamiento, el contenido de MGB en brócolis envasados en CAD45 fue significativamente mayor ($1,80 \pm 0,07$ $\mu\text{mol g}^{-1}$ y $1,86 \pm 0,13$ $\mu\text{mol g}^{-1}$ para 2°C y 2°C/7°C, respectivamente) con respecto a los floretes envasados en CAD15 ($1,69 \pm 0,06$ $\mu\text{mol g}^{-1}$ y $1,56 \pm 0,10$ $\mu\text{mol g}^{-1}$) y CAD30 ($1,68 \pm 0,01$ $\mu\text{mol g}^{-1}$ y $1,61 \pm 0,08$ $\mu\text{mol g}^{-1}$). Para todas las condiciones, el contenido de NGB se mantuvo constante durante el almacenamiento. A pesar de que no se identificó un impacto significativo entre brócolis envasados en diferentes films, las muestras CAD45 y CAD15 tendieron a tener el contenido de NGB más alto y más bajo, respectivamente (**Figura 6. 13**, I-J). El incremento en el contenido de GSL indólicos durante el almacenamiento ha sido reportado en la literatura (Jia et al., 2009; Rybarczyk-plonska et al., 2016). Recientemente, se ha observado que la expresión de genes asociados con la biosíntesis de glucosinolatos indólicos aumenta durante el almacenamiento postcosecha (Casajús et al., 2021). Además, la degradación de proteínas aumenta durante la senescencia y se acumulan aminoácidos libres, que son precursores en la biosíntesis de GSL. Estos fenómenos podrían ser la causa del aumento de GSL indólicos. Estos procesos están mediados por enzimas y dependen del metabolismo vegetal; en consecuencia, la temperatura de almacenamiento y la concentración de O₂ y CO₂ tendrían un impacto en el contenido de GSL indólicos, como se observa en los resultados de este estudio.

En conclusión, los resultados indican que el almacenamiento refrigerado combinado con una ligera modificación de la atmósfera fue efectivo para preservar el contenido de GSL individuales y totales. Además, el film de envasado tuvo un efecto significativo en la evolución de estos compuestos, especialmente cuando la

temperatura de almacenamiento se incrementa (7°C). Floretes envasados en el film con menor nivel de perforación (CAD45) mostraron el mayor contenido de GSL.

6.2.2.8. Ácidos hidroxicinámicos (HCA)

El grupo de HCA predominante en las muestras de brócoli fue el ácido sinápico y sus derivados. El perfil fue semejante al determinado en la sección 6.1 para el cultivar Legacy. El contenido de HCA se incrementó a lo largo del tiempo en todas las condiciones estudiadas (**Tabla 6. 8**). En la sección 6.1 se observó la evolución contraria (ver 6.1.2.7), descenso de estos compuestos que fue mayor a mayores temperaturas de almacenamiento. Como las experiencias se llevaron a cabo con brócolis de diferentes cultivares no es posible hacer una inferencia directa, pero se podría pensar que el almacenamiento a temperatura de 2°C permitió controlar la degradación de HCA. La acumulación de HCA indica predominancia de mecanismos de síntesis frente a los de degradación. Se ha demostrado que los mecanismos de síntesis se pueden inducir por estrés, sobre todo por el provocado por heridas (cortes), que activa la ruta metabólica de los fenilpropanoides al regular la expresión génica de enzimas críticas de esta vía (Villarreal-García et al., 2016). Los resultados obtenidos coinciden con los hallazgos de Guan et al. (2020), quienes detectaron marcado aumento del contenido de ácido sinápico en floretes de brócolis durante el almacenamiento, y explican este incremento debido a que el ácido sinápico es requerido en la biosíntesis de lignina para mejorar la resistencia al estrés abiótico.

Por otro lado, varios estudios reportan aumento de la capacidad antioxidante durante el almacenamiento, lo que podría estar correlacionado con la actividad de los HCA y de acuerdo con el aumento observado en este experimento (Costa et al., 2006; Villarreal-García et al., 2016). Sin embargo, cabe mencionar que en el experimento de la sección 6.1 no se obtuvo correlación entre la capacidad antioxidante y el contenido de HCA.

El análisis estadístico no mostró diferencias en el contenido de HCA entre floretes de brócoli en diferentes films o temperaturas de almacenamiento ($p > 0,05$). Por lo tanto, el MAP usando films microperforados permitió preservar, e incluso aumentar, el contenido de HCA de los floretes de brócoli durante el almacenamiento a 2°C y

durante el incremento de temperatura a 7°C durante 2 días, independientemente del nivel de perforación del film utilizado.

Tabla 6. 8. Contenido de ácidos hidroxicinámicos (HCA) ($\mu\text{mol g}^{-1}$) de floretes de brócoli MAP en films con diferentes niveles de microperforación (CAD15, CAD30, CAD45) durante el almacenamiento a 2°C y 2°C/7°C. Los datos se expresan como media \pm desviación estándar ($n = 3$). Valores con la misma letra significa que no existen diferencias significativas según el test de Tukey ($p < 0,05$).

Film	Tiempo (d)	HCA ($\mu\text{mol g}^{-1}$)			
		2°C		2/7°C	
CAD15	0	1,41 \pm 0,35	efg	1,41 \pm 0,35	efg
	7	1,81 \pm 0,57	bcdefg	1,59 \pm 0,19	cdefg
	14	1,88 \pm 0,26	abcde	1,57 \pm 0,33	defg
	21	2,34 \pm 0,19	ab	2,14 \pm 0,19	abcd
CAD30	0	1,41 \pm 0,35	efg	1,41 \pm 0,35	efg
	7	2,26 \pm 0,21	ab	1,95 \pm 0,22	abcde
	14	1,37 \pm 0,36	efg	1,66 \pm 0,33	cdefg
	21	2,08 \pm 0,17	abcd	2,41 \pm 0,41	a
CAD45	0	1,41 \pm 0,35	efg	1,41 \pm 0,35	efg
	7	1,87 \pm 0,36	abcdef	2,16 \pm 0,21	abc
	14	1,24 \pm 0,34	g	1,29 \pm 0,14	fg
	21	2,33 \pm 0,45	ab	1,88 \pm 0,19	abcde

6.2.3. Conclusiones parciales

En este estudio se identificaron concentraciones moderadas de O₂ (14–20 kPa) y CO₂ (0,9–5 kPa), que combinadas con el almacenamiento refrigerado (2°C) conservaron el contenido de compuestos bioactivos y calidad externa de floretes de brócoli durante 21 días, incluso durante 2 días a 7°C. Además, el uso de films microperforados evitó el desarrollo de anoxia, principal problema durante la comercialización de este producto.

El nivel de perforación de la película afectó la firmeza y el contenido de glucosinolatos, especialmente frente al aumento de la temperatura de almacenamiento. Floretes de brócoli envasados con la película de menor nivel de perforación (CAD45) mostraron mayores valores de firmeza y contenido de glucosinolatos, indicando que la selección del número de perforaciones es un

aspecto importante a tener en cuenta en el diseño de envases para productos IV gama.

6.3. Evaluación de films microperforados para la preservación de fitoquímicos y calidad externa de floretes de brócoli durante el almacenamiento a temperaturas por encima de las recomendadas

6.3.1. Diseño experimental

Cabezas de brócoli (cv. Legacy) se obtuvieron y procesaron como se describe en el Capítulo 4 (Materiales y Métodos, sección 4.1). Los floretes se dividieron al azar en 4 grupos homogéneos, uno por cada film de envasado: CAD15, CAD30, CAD45 (que corresponden a los films de BOPP microperforados de la experiencia en la sección 6.2) y un grupo Control (floretes de brócoli envasaron en bolsas de PP macroperforado, sin modificación de la atmósfera). Aproximadamente 150 ± 9 g de floretes de broccoli (4-5 unidades) se colocaron dentro de las bolsas y se termosellaron. Cada condición de envasado se estudió a dos temperaturas: 6°C y 12°C. Los muestreos se realizaron los días 0, 7, 14 y 18, y se muestrearon 3 unidades experimentales por cada condición. Durante el almacenamiento se determinó: composición gaseosa del espacio cabeza, pérdida de masa, color, textura (firmeza del tallo), apariencia externa, contenido de glucosinolatos y ácidos hidroxicinámicos. En la **Figura 6. 14** se muestra un esquema del diseño experimental descrito y la nomenclatura empleada para referirse a cada uno de los tratamientos estudiados.

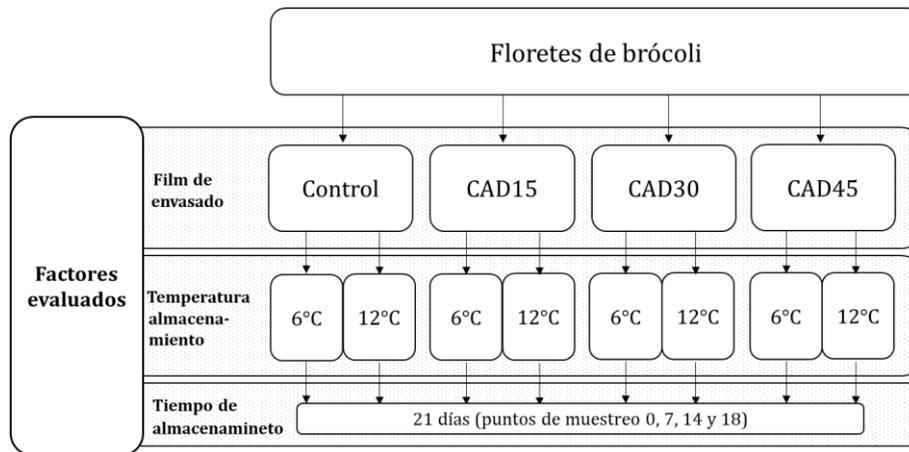


Figura 6. 14. Diagrama del diseño experimental para evaluar el efecto del nivel de perforación del film y temperatura de almacenamiento en el contenido de compuestos bioactivos y calidad externa de floretes de brócoli (cv. Legacy) envasados en atmósfera modificada.

Films de envasado: CAD15, CAD30 y CAD45 se refiere al nivel de perforación del film de BOPP (15 mm, 30 mm y 45 mm de distancia entre perforaciones, respectivamente). Temperatura de almacenamiento: 6 °C y 12°C.

6.3.2. Resultados y discusión

6.3.2.1. Composición gaseosa del espacio cabeza

Como se podría esperar, se observó un descenso de O₂ e incremento de CO₂ en el espacio cabeza de los envases a lo largo del almacenamiento. Al igual que en la sección anterior (6.2), el número de microperforaciones tuvo un efecto significativo ($p < 0,001$) en la composición del espacio cabeza (**Figura 6. 15**). Muestras CAD45 (menor nivel de perforación) presentaron un cambio significativamente mayor de la composición gaseosa, seguido por las muestras CAD30 y CAD15, respectivamente. Como ya se ha mencionado, la evolución gaseosa del espacio cabeza depende de la tasa de transmisión de gases del film, y esto explica la evolución de O₂ y CO₂ observada y su correlación con los distintos niveles de perforación de los films.

A pesar del almacenamiento a temperaturas relativamente altas (las normativas exigen $< 4^{\circ}\text{C}$), no se observaron concentraciones de gases que puedan inducir el metabolismo anaerobio. En la condición más desfavorable (12°C) las concentraciones mínimas de O₂ y máximas de CO₂ fueron de $13,1 \pm 0,7$ kPa y $8,7 \pm 0,7$ kPa respectivamente (CAD45 al día 10). Esto indica que la tecnología MAP

empleando films microperforados debe ser especialmente considerada para evitar la generación de anaerobiosis en cadenas de suministro con problemas en el control de temperatura. Además, esta tecnología podría evitar la generación de anoxia y pronto deterioro durante la manipulación del consumidor, donde el producto no suele mantenerse en las condiciones de temperaturas diseñadas y recomendadas. En la sección 6.1., donde se empleó PP con una perforación, se vio como el MAP a temperaturas de 8 y 15°C generó concentraciones de O₂ y CO₂ riesgosas, que en el caso de 15°C provocaron el deterioro prematuro del producto.

Floretes almacenados a 6°C presentaron menor variación de la composición gaseosa respecto al aire en comparación a los floretes almacenados a 12°C (para el mismo nivel de perforación del film). Esto es el comportamiento esperable, ya que la tasa respiratoria se ve incrementada con la temperatura y las concentraciones de equilibrio dentro de los envases disminuyen para el O₂ y aumentan para el CO₂.

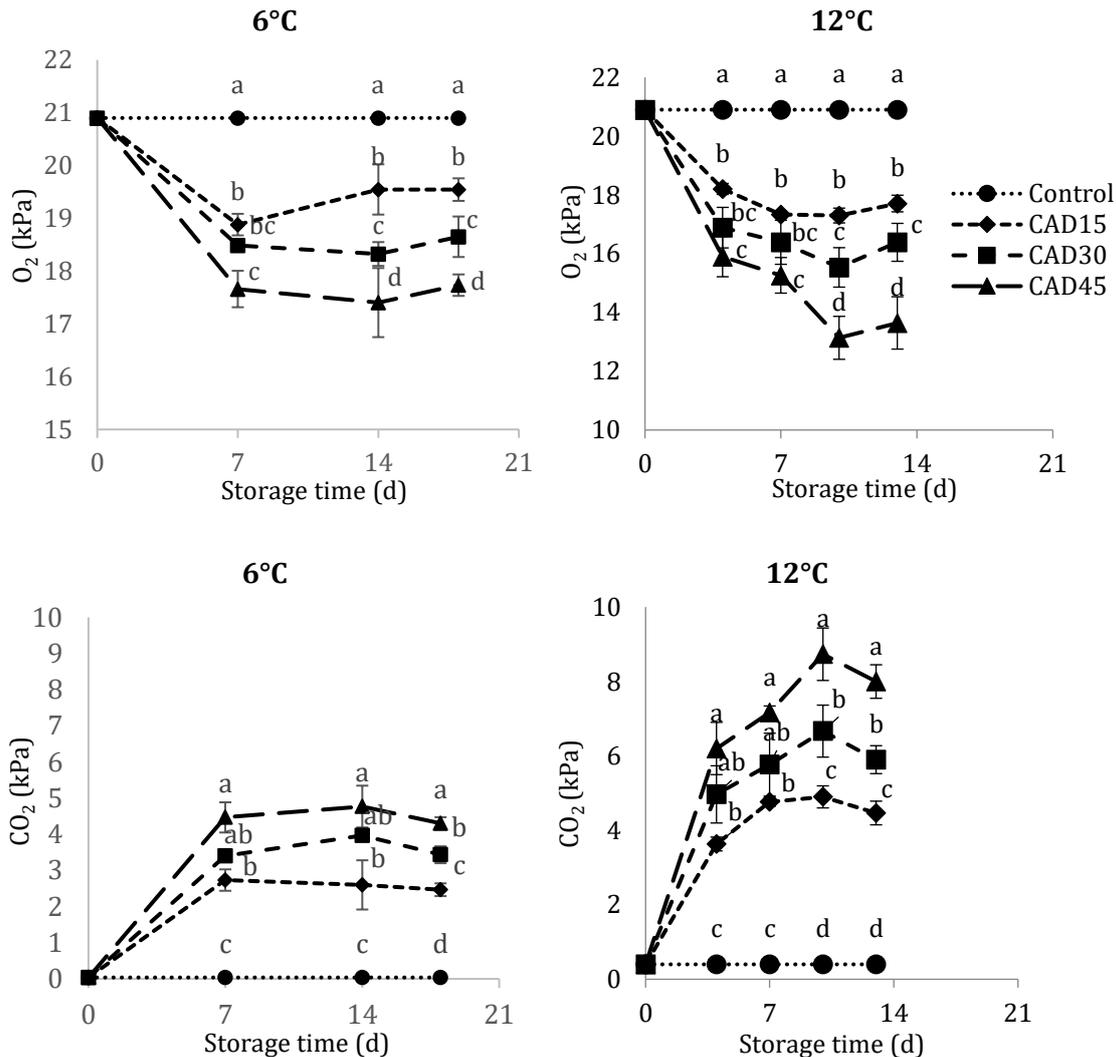


Figura 6. 15. Evolución de la composición gaseosa del especio cabeza de floretes de brócoli MAP, en films de BOPP con diferentes niveles de perforación: Control $\cdots\bullet\cdots$, CAD15 $-\diamond-$, CAD30 $-\square-$, CAD45 \blacktriangle , durante el almacenamiento a 6°C y 12°C. Las barras verticales representan la desviación estándar ($n = 3$). Letras distintas implica que existen diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los films dentro del mismo día de almacenamiento.

6.3.2.2. Pérdida de masa

Los floretes Control presentaron una pronunciada pérdida de masa (ML) durante el almacenamiento, y significativamente superior a las muestras MAP ($p < 0,0001$) (Figura 6. 16). La vida útil de floretes Control fue menor a 14 días a 6°C (ML de $6,3 \pm 0,3$ %) y menor a 10 días a 12°C (ML de $6,1 \pm 0,3$ %) (tomando como límite de vida útil 6%). La mayor ML que se observa en floretes almacenados a 12°C respecto a los almacenados a 6°C se explica por la mayor tasa respiratoria de los floretes

almacenados a mayor temperatura. Para floretes MAP, la ML no fue un factor limitante de la vida útil. Todas las muestras, independientemente del nivel de perforación y temperatura de almacenamiento, presentaron porcentajes de ML menores al 3% luego de 21 días (entre $1,4 \pm 0,2$ % y $2,8 \pm 0,1$ %). Resultados semejantes se obtuvieron en secciones anteriores (6.1 y 6.2), concluyéndose que el envasado en atmósfera modificada es clave para controlar la pérdida de masa y extender la vida útil.

Como ya ha sido explicado, en el MAP la humedad relativa (RH) que se establece dentro del envase es un factor relevante en el control de la pérdida de masa, que queda determinado principalmente por la tasa de transmisión al vapor de agua del film y la tasa de transpiración del producto. En la **Figura 6. 17** se muestra la evolución de la RH dentro de los envases. En todos los casos, se observa que la RH de equilibrio se alcanza a las pocas horas de envasar el producto. Los Controles presentaron una RH de equilibrio de entre 95 – 96 %, y los envases microperforados del 99 % en promedio. La diferencia en las RH podría explicar la mayor ML en los floretes Control respecto a los MAP a ambas temperaturas. No se observaron diferencias significativas en la RH entre los distintos niveles de perforación.

En conclusión, la tecnología MAP empleando films microperforados permitió que floretes de brócoli expuestos a temperaturas de almacenamiento elevadas mantuvieran niveles de ML adecuados durante un período de comercialización razonable.

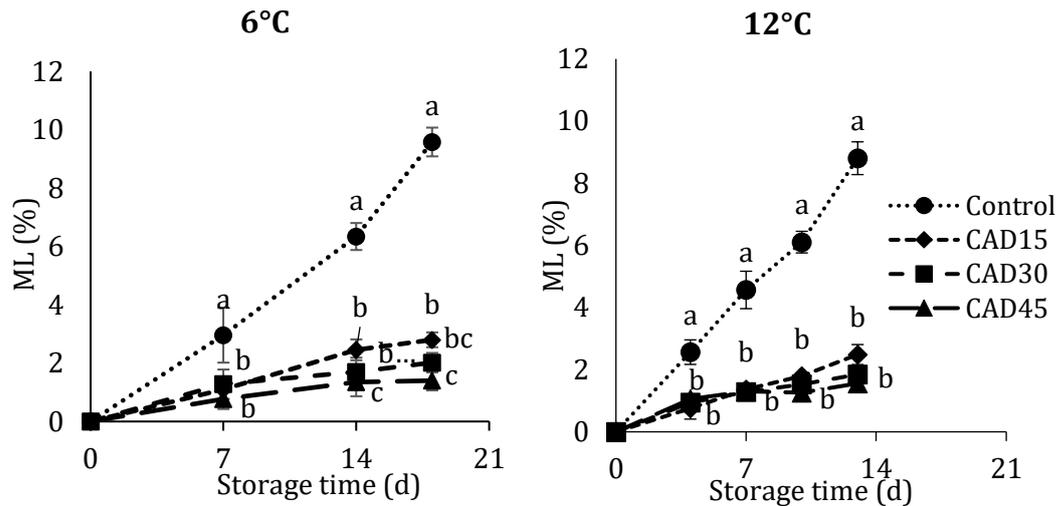


Figura 6. 16. Pérdida de masa de floretes de brócoli MAP, en films de BOPP con diferentes niveles de perforación: Control $\cdots\bullet\cdots$, CAD15 $-\blacklozenge-$, CAD30 $-■-$, CAD45 $-▲-$, durante el almacenamiento a 6°C y 12°C. Las barras verticales representan la desviación estándar ($n = 3$). Letras distintas implica que existen diferencias significativas entre los films dentro del mismo día de almacenamiento ($p < 0,05$).

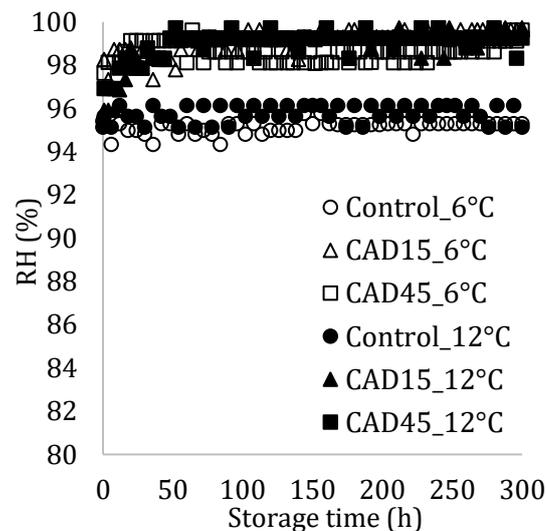


Figura 6. 17. Evolución de la humedad relativa (RH) dentro de los envases durante el almacenamiento a 6 y 12°C de floretes de brócoli MAP, en BOPP microperforado con diferentes niveles de perforación (Control, CAD15 y CAD45).

6.3.2.3. Tasa respiratoria

Durante el almacenamiento a 6°C, no se encontraron diferencias significativas en la tasa respiratoria de floretes envasados en diferentes films (**Tabla 6. 9**). Esto indica que las concentraciones de O_2 y CO_2 alcanzadas no tuvieron un impacto significativo

en los mecanismos vinculados a la obtención de energía del tejido. En el almacenamiento a 12°C, se obtuvieron diferencias significativas entre films. El día 7, los floretes Control tendieron a presentar mayor tasa respiratoria respecto a los MAP. Esto podría indicar que el efecto de la atmosfera alcanzada en las muestras MAP es significativo y podría enlentecer los procesos metabólicos a temperaturas altas (12°C). Al día 10 de almacenamiento esta tendencia se revirtió, siendo los floretes Control los que presentaron menor tasa respiratoria. Esto podría deberse a que, en este punto del almacenamiento, los floretes Control presentan un estado de senescencia avanzado respecto a los floretes MAP, próximos al fin de la vida útil donde la tasa respiratoria se reduce debido a la muerte celular. Un comportamiento similar fue observado en la sección 6.1, donde floretes en estado de senescencia avanzado presentaron una reducción de la tasa respiratoria.

Tabla 6. 9. Tasa respiratoria medida en consumo de O₂ (RRO₂) de floretes de brócoli sin envasar y MAP en BOPP con diferentes niveles de microperforación, durante el almacenamiento a 6 y 12°C. Los resultados se expresan como media \pm desviación estándar (n=3). Letras minúsculas diferentes indican que existen diferencias significativas entre diferentes films envasado (dentro de un mismo día) según Test de Tukey (p < 0,05). Letras mayúsculas diferentes indican que existen diferencias significativas entre días de almacenamiento (dentro del mismo film de envasado) según Test de Tukey (p < 0,05).

6°C				12°C			
Día	Film	RRO ₂ (mL/kg h)		Día	Film	RRO ₂ (mL/kg h)	
0		74,2 \pm 5,2	A	0		79,8 \pm 3,2	A
7	Control	57,3 \pm 0,2	a, A	7	Control	93,1 \pm 2,8	a, A
	CAD15	55,5 \pm 0,2	a, A		CAD15	85,5 \pm 6,6	ab, A
	CAD30	56,7 \pm 1,2	a, A		CAD30	72,9 \pm 1,6	b, A
	CAD45	58,0 \pm 2,8	a, A		CAD45	80,1 \pm 5,1	ab, A
14	Control	32,8 \pm 0,4	a, B	10	Control	59,0 \pm 3,2	b, B
	CAD15	33,1 \pm 8,1	a, B		CAD15	80,9 \pm 5,6	a, A
	CAD30	35,4 \pm 1,2	a, B		CAD30	70,5 \pm 1,8	ab, A
	CAD45	37,6 \pm 0,6	a, B		CAD45	75,0 \pm 7,0	a, A
18	Control	27,5 \pm 0,5	a, C	14	Control	43,8 \pm 6,7	a, C
	CAD15	30,7 \pm 5,2	a, B		CAD15	49,0 \pm 5,0	a, B
	CAD30	35,1 \pm 1,3	a, B		CAD30	56,7 \pm 3,9	a, B
	CAD45	36,9 \pm 0,3	a, B		CAD45	55,5 \pm 1,0	a, B

6.3.2.4. Color

Al final del período de almacenamiento, los floretes Control presentaron cambios significativos en todos los parámetros colorimétricos respecto al producto recién cosechado: aumento de L^* , aumento de C^*_{ab} y disminución de h_{ab} (**Figura 6. 18**). Estos cambios indican un aumento en la claridad (el producto refleja más luz), saturación del color y evolución hacia tonos amarillos, todo ellos vinculados a la pérdida de calidad y senescencia. Los cambios en el color fueron menos drásticos para floretes MAP, por lo que el envasado en films microperforados permitió preservar mejor el color durante el almacenamiento a temperaturas altas (6-12°C).

El nivel de microperforaciones tuvo un efecto significativo en la evolución del color, tanto a 6°C como a 12°C. A 6°C, los floretes MAP almacenados por 18 días no presentaron diferencias significativas en el parámetro L^* respecto al brócoli recién cosechado, pero si presentaron un aumento C^*_{ab} y disminución de h_{ab} . Estos cambios fueron significativamente mayores en las muestras CAD15 que en las CAD45. Resultados análogos se obtuvieron en los floretes almacenados a 12°C. En este caso, el parámetro L^* aumentó en floretes envasados en CAD15 respecto a los recién cosechados (las muestras CAD30 y CAD45 no presentaron cambios en el valor de L^*). Además, floretes envasados en CAD15 presentaron mayores valores de C^*_{ab} y menores de h_{ab} , lo que implica mayores coloraciones amarillas respecto a las muestras CAD45. Por lo tanto, se infiere que la composición gaseosa (que se correlaciona con el número de perforaciones del film) tuvo un efecto significativo en el cambio de color de floretes de brócoli. Floretes expuestos a menores concentraciones de O_2 y mayores de CO_2 mostraron preservar el color en mayor medida respecto a los expuestos a mayores concentraciones de O_2 y menores de CO_2 , encontrándose correlación entre estas variables (ver **Tabla 6. 10**).

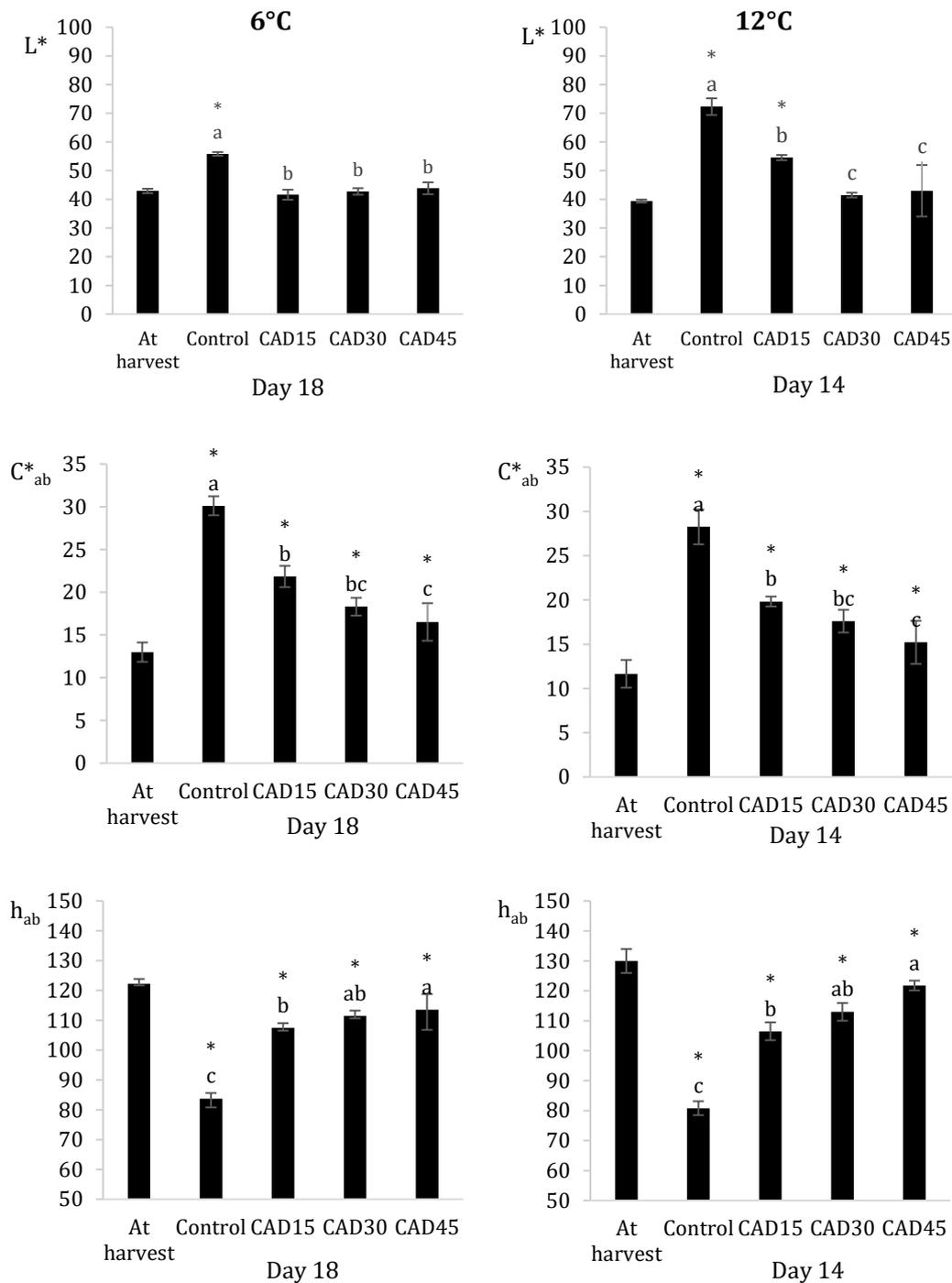


Figura 6. 18. Parámetros colorimétricos (L^* , C_{ab} , h_{ab}) de floretes de brócoli el día de la cosecha ("At harvest") y MAP en BOPP microperforado el último día de muestreo: día 18 para floretes almacenados a 6°C y día 14 para floretes almacenados a 12°C. Las barras verticales representan la desviación estándar ($n=3$). Letras distintas indican que existen diferencias significativas entre distintos films de envasado (CAD15, CAD30, CAD45) según el Test de Tukey ($p < 0,05$). "*" indican que existen diferencias significativas entre muestras envasadas y el producto el día de la cosecha (Test de Dunnett, $\alpha = 0,05$).

Tabla 6. 10. Coeficientes de correlación de Pearson entre la concentración de O₂ y CO₂ dentro de los envases y parámetros colorimétricos de floretes de brócoli. Coeficientes en negrita y subrayados indican p-valores < 0,05.

	CO ₂	L*	C _{ab}	h _{ab}
O ₂	<u>-0.986</u>	0,599	0,854	<u>-0.853</u>
CO ₂		-0,677	<u>-0.916</u>	<u>0.915</u>

Por lo tanto, se infiere que el cambio de color de floretes de brócoli depende de las condiciones gaseosas y está vinculado, de alguna manera, a los procesos metabólicos de obtención de energía. Estos resultados coinciden con lo reportado por Schouten et al. (2009), quienes estudiaron el efecto de la composición gaseosa en el color de brócoli almacenado en atmósferas controladas. Estos investigadores concluyeron que existe un efecto significativo de la composición gaseosa en la evolución del color, y explican que la composición de gases podría afectar las constantes cinéticas de las reacciones de descomposición de clorofilas (Schouten et al., 2009). El efecto de la atmósfera en el color, y el vínculo con la degradación de clorofilas, también ha sido observado para el kale. Kales expuestos a menores concentraciones de O₂ y mayores de CO₂ (2-7 kPa y 8-10 kPa, respectivamente) presentaron mayores valores de h_{ab} (conservaron el color verde) y contenido de clorofilas que kales expuestos al aire (Boerzhijn et al., 2020).

Lo importante a destacar en este estudio es que diferencias relativamente pequeñas de O₂ y CO₂ (entre 1,8 y 4,1 kPa) mostraron un efecto significativo en la evolución del color. Los reportes sobre la incidencia de la composición gaseosa en el color de brócoli son con diferencias superiores a 6 kPa de O₂ o CO₂ entre condiciones (Fernández-León, Fernández-León, Lozano, Ayuso, Amodio, et al., 2013; Jia et al., 2009; Schouten, Zhang, Verschoor, et al., 2009; Serrano et al., 2006). A partir de los resultados obtenidos se podría inferir que, a temperaturas de almacenamiento entre 6 y 12°C, los procesos vinculados a la degradación del color en floretes de brócoli son sensibles a pequeñas variaciones en las concentraciones de O₂ y CO₂. Por otro lado, la mayoría de los estudios reportan conservación del color a concentraciones bajas de O₂, de entre 2 – 10 kPa (Fernández-León, Fernández-León, Lozano, Ayuso, Amodio, et al., 2013; Jia et al., 2009; Schouten, Zhang, Verschoor, et al., 2009), que coinciden con los resultados presentados en la sección 6.1. En este estudio, a pesar de que la modificación de la atmósfera fue moderada, se observó efecto significativo

en el color. Por lo tanto, a temperaturas de almacenamiento entre 6 y 12°C, modificaciones moderadas de la atmósfera respecto al aire permitieron controlar el amarilleo de floretes de brócoli. Esto evidencia que MAP empleando films microperforados es efectivo en la conservación del color y que la elección del número de perforaciones es un aspecto relevante a tener en cuenta para preservar este parámetro de calidad.

Los resultados obtenidos mediante el color instrumental reflejan lo percibido mediante la apreciación visual. En la **Figura 6. 19** se pueden distinguir diferencias en el desarrollo del amarilleo según las condiciones de envasado. A partir del día 14, los floretes Control presentaron la mayor parte de la superficie amarilla, siendo inaceptables comercialmente. En el caso de los floretes MAP, durante los primeros días de almacenamiento no se observan diferencias apreciables en el color de los floretes. Sin embargo, hacia el final del almacenamiento pueden observarse diferencias en el color según el film de envasado, donde los floretes en CAD45 preservan en mayor medida el color verde.

		6°C				12°C		
Days	Films	0	7	14	18	0	7	14
		Control						
CAD15								
CAD30								
CAD45								

Figura 6. 19. Registro fotográfico de floretes de brócoli sin envasar (Control) y MAP en BOPP con diferentes niveles de perforación (CAD15, CAD30 y CAD45), durante el almacenamiento a 6 y 12°C.

6.3.2.5. Apariencia externa

Se observó un efecto significativo del nivel de perforación en la apariencia externa de floretes de brócoli (**Figura 6. 20**). Floretes envasados en CAD45 presentaron puntajes significativamente mayores respecto a floretes envasados en CAD15, lo que indica una mejor conservación de la apariencia externa de las muestras CAD45 a lo largo del almacenamiento. En el estudio de la sección 6.2 no se observó efecto significativo del nivel de perforación en la apariencia externa, por lo que se podría pensar que este factor presenta impacto significativo a temperaturas de almacenamiento superiores a 6°C. Sin embargo, hay que tener en cuenta que el cultivar de estudio en cada experiencia fue diferente por lo que no es posible hacer inferencias directamente.

Tanto a 6°C como a 12°C, los floretes Control alcanzaron o sobrepasaron el valor límite de comercialización (3 puntos) a los 7 días. Mayor temperatura de almacenamiento aceleró el deterioro de la apariencia externa del producto. A 12°C los floretes MAP presentaron una vida útil inferior a 14 días, mientras que a 6°C los floretes MAP presentaron una vida útil de al menos 14 días.

Los puntajes de apariencia externa se correlacionaron moderadamente con los componentes de color C^*_{ab} ($r = -0,859$) y h_{ab} ($r = 0,821$) y con las concentraciones de O_2 ($r = 0,883$) y CO_2 ($r = 0,848$) dentro del envase ($p < 0,05$). Esto permite inferir que existe relación entre los parámetros colorimétricos y la apariencia externa, y que estas variables están asociadas a procesos de senescencia afectados por las concentraciones de O_2 y CO_2 . A pesar de que las modificaciones de la atmósfera fueron moderadas, el efecto en la apariencia externa fue significativo. Esto se atribuye a que el efecto de la atmósfera se vuelve más significativo cuando el producto se expone a temperaturas altas.

De los resultados obtenidos hasta el momento, se podría inferir que para la preservación de la apariencia externa es suficiente modificaciones leves de la atmósfera si el almacenamiento se realiza a temperaturas bajas (sección 6.2.) y que la modificación de la atmósfera cobra importancia y se requieren modificaciones más pronunciadas si el almacenamiento es a temperaturas altas.

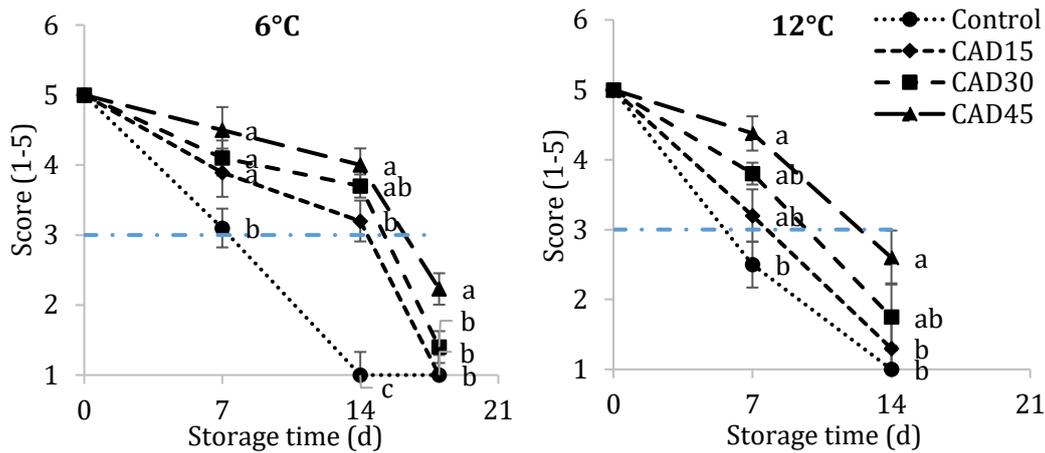


Figura 6. 20. Evolución de la apariencia externa de floretes de brócoli en distintos sistemas de envasado (Control $\cdots\bullet\cdots$, CAD15 $--\blacklozenge--$, CAD30 $--\blacksquare--$, CAD45 $\text{---}\blacktriangle\text{---}$) durante el almacenamiento a 6 y 12°C. Las barras verticales representan la desviación estándar (n=3). Letras distintas indican que existen diferencias significativas entre sistemas de envasado según el Test de Tukey ($p < 0,05$). La línea azul punteada indica el límite a partir del cual el producto se considera no apto para su comercialización.

6.3.2.6. Textura

Se observó un incremento significativo de la dureza del tallo a lo largo del almacenamiento (**Figura 6. 21**). El aumento fue significativamente mayor en los floretes Control respecto a los MAP ($p < 0,001$). En términos generales, no se observó efecto del nivel de perforación del film en la firmeza, a excepción de algunos puntos (día 18 a 6°C y día 4 a 12°C) donde las muestras CAD15 presentaron mayor dureza del tallo que las CAD45. Brócolis almacenados a 12°C presentaron un incremento mayor de la dureza en el tallo respecto a los almacenados a 6°C. Estos resultados son similares a los obtenidos en la sección 6.1, donde también se observó un incremento de la dureza a lo largo del tiempo. Como ha sido mencionado, el aumento de la dureza del tallo se ha vinculado a la pérdida de agua celular (Serrano et al., 2006; Toivonen & Brummell, 2008b). Los datos de dureza y pérdida de masa no mostraron una correlación clara ($r = 0,551$; $p=0,009$), pero la tendencia fue semejante a la observada en la sección 6.1 (ver 6.1.2.4.).

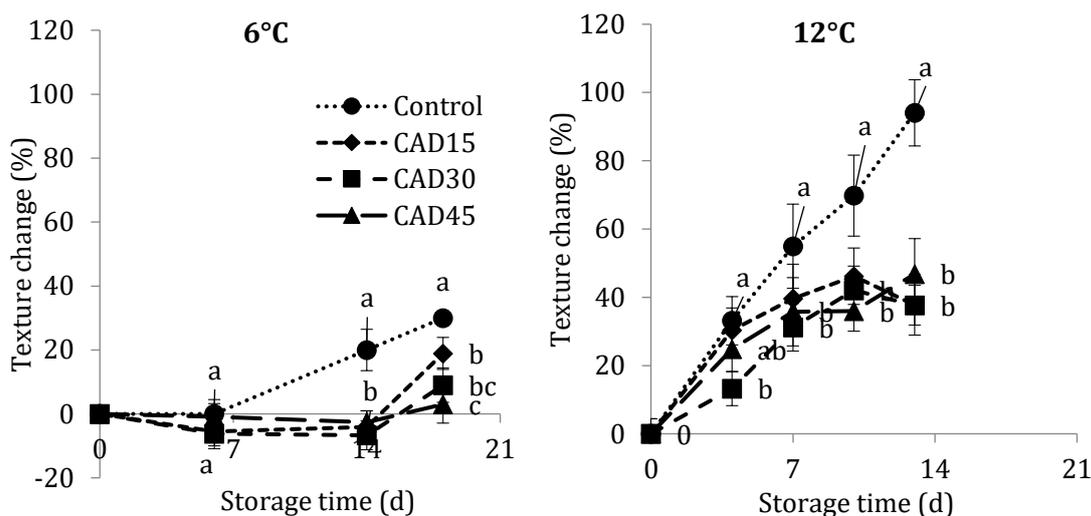


Figura 6. 21. Cambio en la firmeza del tallo de floretes de brócoli sin envasar (Control●.....) y MAP en BOPP con distintos niveles de microperforación (CAD15 ---◆---, CAD30 -■-, CAD45 —▲—) durante el almacenamiento a 6 y 12°C. Las barras verticales representan la desviación estándar (n=3). Letras distintas indican que existen diferencias significativas entre sistemas de envasado según el Test de Tukey ($p < 0,05$).

6.3.2.6. Contenido de glucosinolatos (GSL)

El contenido total de GSL en los floretes fue de $27,1 \pm 1,3 \mu\text{mol g}^{-1}$. Se identificaron cuatro GSL; uno alifático: glucorafanina (GRA) y 3 indólicos: neoglucobrasicina (NGB) (que fue el GSL predominante con 66-69% del total), glucobrasicina (GB) y metoxiglucobrasicina (MGB). El perfil de GSL fue semejante al obtenido en la sección 6.1 para brócolis del cultivar Legacy y coincide con reportes en brócoli del mismo cultivar cultivados en la región (Casajús et al., 2021). Por lo tanto, se infiere que el cultivar Legacy se caracteriza por predominancia de GSL indólicos, principalmente GB y NGB. Hidroxiglucobrasicina (HGB) no fue identificada en este lote de brócolis a diferencia del lote de la sección 6.1, en la que se encontró pero en baja proporción (2,5%).

El contenido de GSL totales e individuales disminuyó significativamente durante el almacenamiento. Floretes almacenados a 12°C presentaron mayores pérdidas de GSL (entre 56-89%) respecto a los almacenados a 6°C (entre 20-27%) (**Figura 6. 22**). Estos resultados coinciden con el efecto de la temperatura observado en la sección 6.1, donde para floretes MAP en PP perforado la pérdida de GSL fue mayor a 15°C que a 4°C y a 8°C. Se encontraron diferencias significativas en la evolución de

GSL totales e individuales según el nivel de perforación del film (**Figura 6. 22**), indicando que existe efecto de la composición gaseosa en la evolución de estos compuestos bioactivos. Esto está en línea con lo encontrado en la sección anterior (6.2), donde se observó un efecto de la atmósfera en la evolución de GSL al incrementarse la temperatura de almacenamiento de 2°C a 7°C. Además, también está de acuerdo con lo observado en la sección 6.1, donde se encontró que la modificación de la atmósfera mitigó las pérdidas de GSL durante el almacenamiento a temperaturas altas. Integrando las experiencias realizadas hasta el momento, también se observa que las pérdidas de GSL cuantificadas en esta experiencia son superiores a las cuantificadas en la sección 6.1 durante el almacenamiento de floretes MAP en PP a 15°C (donde se cuantificaron pérdidas del 27%). Podría inferirse que la mayor modificación de la atmósfera generada en el envasado en PP respecto al envasado en films microperforados sea responsable de la mayor conservación de GSL observada en dicha experiencia (sección 6.1).

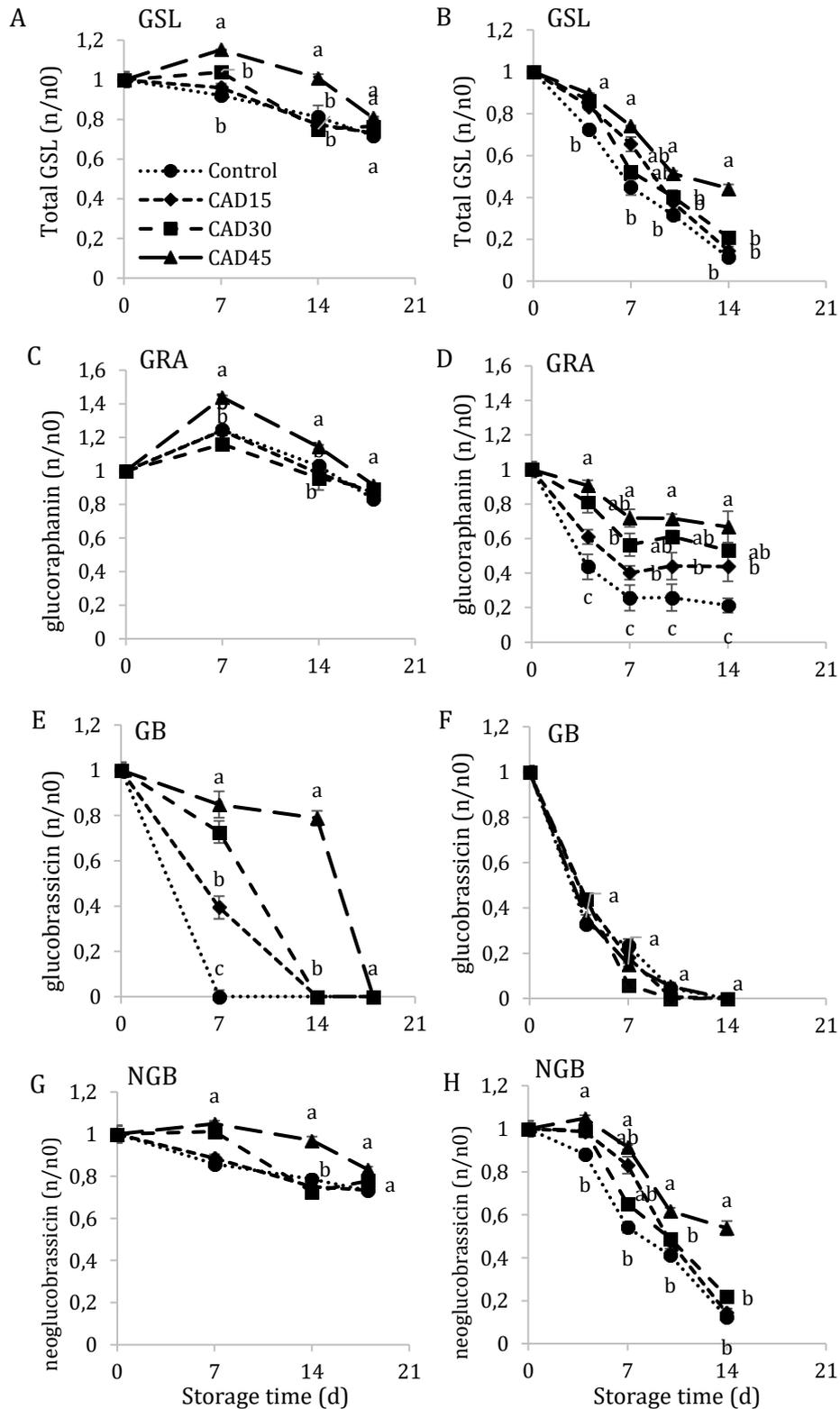


Figura 6. 22. Evolución del contenido de glucosinolatos de floretes de brócoli envasados en films con diferentes niveles de micro perforación (Control $\cdots\bullet\cdots$, CAD15 $-\diamond-$, CAD30 $-\square-$, CAD45 \blacktriangle) almacenados a 6°C y 12°C. Los datos se presentan normalizados respecto al día 0 (n0: concentración del componente al día 0). Las barras verticales representan la desviación estándar (n = 3). Letras distintas indican que existen diferencias significativas entre films según el Test de Tukey (p < 0,05).

Los datos adquiridos en esta experiencia se trataron de asociar a una cinética de degradación, con el objetivo de determinar el efecto de la composición gaseosa del espacio cabeza en la evolución de GSL en floretes de brócoli. Los cambios en la concentración de GSL a lo largo del tiempo se modelaron usando una función dependiente de la concentración de GSL (Ec. 1):

$$\mp \frac{dQ}{dt} = k * Q^n \quad \text{Ec.1}$$

donde Q es la concentración de GSL, t es el tiempo, k es un coeficiente y n es el orden de reacción. Para ajustar los cambios de concentración de GSL en función del tiempo en las diferentes condiciones de estudio, los datos experimentales se ajustaron a las ecuaciones 2, 3 y 4 para orden 0, 1 y 2 respectivamente:

$$Q = Q_0 \pm k * t \quad n = 0 \quad \text{Ec.2}$$

$$Q = Q_0 * e^{\mp k * t} \quad n = 1 \quad \text{Ec.3}$$

$$Q = \frac{1}{1/Q_0 \mp k * t} \quad n = 2 \quad \text{Ec.4}$$

donde Q_0 es la concentración de GSL en el tiempo cero (día de la cosecha). En la **Tabla 6. 11** se muestra el coeficiente k, significación y coeficiente de determinación del modelo de mejor ajuste. Es importante mencionar que son escasos los estudios que analizan la evolución de GSL durante el almacenamiento con este enfoque. Los estudios reportados con este tipo de análisis se han aplicado a degradación térmica (Oerlemans et al., 2006; Oliviero et al., 2012).

Tabla 6. 11. Coeficientes *k* estimados para el modelo de orden cero para la degradación de glucosinolatos totales en floretes de brócoli almacenados en diferentes sistemas de envasado.

Temperatura	Film	Atmósfera equilibrio promedio (O ₂ - CO ₂)	Tendencia con el tiempo	p-valor	<i>k</i> (μmol d ⁻¹)	Intervalo confianza (al 95%)	R ²
6°C	Control	20,9 - 0,04	decrece	0,0004	0,408	± 0,072	0,988
	CAD15	19,5 - 2,5	decrece	0,003	0,408	± 0,142	0,958
	CAD30	18,5 - 3,7	se mantiene y decrece	> 0,05			
	CAD45	17,6 - 4,5	aumenta y decrece	> 0,05			
12°C	Control	20,9 - 0,04	decrece	< 0,0001	1,812	± 0,196	0,990
	CAD15	17,5 - 4,7	decrece	< 0,0001	1,583	± 0,211	0,988
	CAD30	16,0 - 6,3	decrece	< 0,0001	1,558	± 0,238	0,983
	CAD45	13,4 - 8,4	decrece	0,0001	1,108	± 0,199	0,977

En todas las condiciones de este ensayo, el modelo con mejor ajuste para el cambio de GSL totales en el tiempo fue el de orden cero (con coeficientes de determinación entre 0,958 y 0,990). Por lo tanto, la degradación no fue dependiente de la concentración de GSL, sino que fueron otros los factores predominantes. A 6°C, solo los sistemas de envasado Control y CAD15 se ajustaron al modelo y no se encontraron diferencias significativas en los valores de *k* (Tabla 6. 11). A 12°C los valores de *k* fueron significativamente mayores respecto a los determinados a 6°C, lo que indica dependencia de *k* con la temperatura, como era esperable. Además, hubo diferencias significativas entre los coeficientes según el sistema de envasado, donde el valor de *k* en el sistema Control fue el mayor (1,812 ± 0,196 μmol d⁻¹) y en el sistema CAD45 fue el menor (1,108 ± 0,199 μmol d⁻¹). Esto sugiere que, además de la dependencia del coeficiente *k* con la temperatura, también existe dependencia con las concentraciones de O₂ y CO₂ del espacio cabeza.

Mediante este enfoque también se analizó el cambio de los GSL individuales con el tiempo. Se analizó NGB y GRA como GSL representativos de los grupos indólico y alifático respectivamente (Tabla 6. 12 y Tabla 6. 13). Para la NGB los resultados del análisis fueron semejantes a los de los GSL totales, lo que concuerda con que la NGB fue el GSL predominante (composición molar mayor al 65%). En las mismas condiciones de envasado, el valor de *k* a 12°C fue significativamente mayor respecto al valor de *k* a 6°C. A 12°C, los sistemas Control y CAD45 presentaron el mayor y

menor valor de k respectivamente, con diferencias significativas entre ellos, pero no con el resto de las condiciones de envasado. Por otra parte, el cambio en el contenido de GRA ajustó mejor a una cinética de orden 2 (**Tabla 6. 13**), lo que sugiere un mecanismo diferente en la degradación respecto a los GSL indólicos, dependiente de la concentración del compuesto. El valor de k fue significativamente mayor en el sistema Control que en los sistemas MAP, lo que indica dependencia con la composición gaseosa.

Tabla 6. 12. Coeficientes k estimados para el modelo de orden cero para la degradación de neglucobrasicina en floretes de brócoli almacenados en diferentes sistemas de envasado.

Temperatura	Film	Atmósfera equilibrio promedio (O ₂ - CO ₂)	Tendencia con el tiempo	p-valor	k (μmol d ⁻¹)	Intervalo confianza (al 95%)	R ²
6°C	Control	20,9 - 0,04	decrece	0,0004	0,279	±0,049	0,984
	CAD15	19,5 - 2,5	decrece	0,0003	0,288	±0,048	0,988
	CAD30	18,5 - 3,7	se mantiene y decrece	> 0,05			
	CAD45	17,6 - 4,5	se mantiene y decrece	> 0,05			
12°C	Control	20,9 - 0,04	decrece	< 0,0001	1,128	± 0,182	0,982
	CAD15	17,5 - 4,7	decrece	0,003	0,955	± 0,412	0,912
	CAD30	16,0 - 6,3	decrece	0,007	0,956	± 0,289	0,951
	CAD45	13,4 - 8,4	decrece	0,008	0,553	± 0,312	0,869

Tabla 6. 13. Coeficientes k estimados para el modelo de orden dos para la degradación de glucorafanina en floretes de brócoli almacenados en diferentes sistemas de envasado.

Temperatura	Film	Atmósfera equilibrio promedio (O ₂ - CO ₂)	Tendencia con el tiempo	p-valor	k (μmol ⁻¹ d ⁻¹)	Intervalo confianza (al 95%)	R ²
6°C	Control	20,9 - 0,04	aumenta y decrece	> 0,05			
	CAD15	19,5 - 2,5	aumenta y decrece	> 0,05			
	CAD30	18,5 - 3,7	aumenta y decrece	> 0,05			
	CAD45	17,6 - 4,5	aumenta y decrece	> 0,05			
12°C	Control	20,9 - 0,04	decrece	0,0003	0,115	± 0,027	0,995
	CAD15	17,5 - 4,7	decrece	0,004	0,050	± 0,024	0,954
	CAD30	16,0 - 6,3	decrece	0,001	0,025	± 0,009	0,957
	CAD45	13,4 - 8,4	decrece	0,0008	0,014	± 0,004	0,960

En este análisis preliminar, la velocidad de degradación de GSL totales e indólicos ajustó mejor a una cinética de orden 0, sugiriendo que la velocidad de degradación es independiente de la concentración. Además, se encontró que los coeficientes k tienen una dependencia con la temperatura y con la composición gaseosa (brócolis expuestos a menores concentraciones O_2 y mayores de CO_2 presentaron valores inferiores del coeficiente k respecto a floretes almacenados sin modificación de la atmósfera). La degradación de GSL alifáticos ajustó mejor a una reacción de orden 2 sugiriendo que depende de la concentración del compuesto, y el coeficiente k también mostró dependencia con la composición gaseosa.

6.3.2.7. Ácidos hidroxicinámicos (HCA)

El grupo de HCA predominante en las muestras de brócoli fue el ácido sinápico y sus derivados, lo que coincide con las caracterizaciones de las secciones anteriores (6.1 y 6.2). A 6°C, las muestras CAD30 y CAD45 (films con menores niveles de perforación) no presentaron cambios en el contenido de HCA durante el almacenamiento. Sin embargo, las muestras Control y CAD15 mostraron un descenso leve pero significativo (**Figura 6. 23**). Muestras almacenadas a 12°C mostraron un incremento en el contenido de HCA durante los primeros días de almacenamiento, seguido por un descenso a partir del día 7. El descenso fue drástico en las muestras Control y CAD15, donde al día 14 no se identificaron HCA. Al final del almacenamiento, floretes almacenados en CAD45 presentaron un contenido de HCA mayor respecto a los floretes recién cosechados. La pronunciada pérdida de HCA en las muestras Control y CAD15 puede explicarse por una mayor oxidación de estos compuestos y metabolismos acelerados por estar expuestos a mayores concentraciones de O_2 respecto a CAD30 y CAD45 (Fernández-León, Fernández-León, Lozano, Ayuso, Amodio, et al., 2013). Por lo tanto, el nivel de perforación del film es un factor relevante que impacta en la conservación de estos compuestos durante el almacenamiento a temperaturas elevadas. Por otra parte, los resultados obtenidos hasta el momento muestran que la temperatura es un factor clave en la conservación de HCA. En el almacenamiento a temperaturas bajas, es posible que predominen los mecanismos de síntesis e incremente el contenido de estos compuestos (6.2). Cuando las temperaturas de almacenamiento aumentan,

comienzan a predominar los mecanismos de degradación y la atmosfera tiene un impacto significativo en mitigar este efecto.

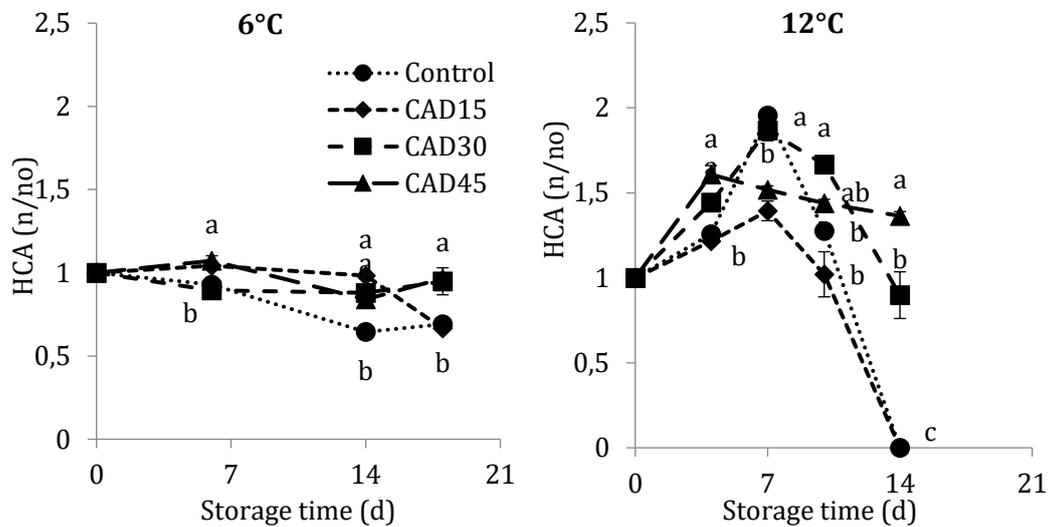


Figura 6. 23. Evolución del contenido de ácidos hidroxicinámicos (HCA) de floretes de brócoli envasados en films con diferentes niveles de micro perforación (Control $\cdots\bullet\cdots$, CAD15 $--\blacklozenge--$, CAD30 $-■-$, CAD45 $—\blacktriangle—$) almacenados a 6°C y 12°C. Los datos se presentan normalizados respecto al día 0 (n0: concentración del componente al día 0). Las barras verticales representan la desviación estándar (n = 3). Letras distintas indican que existen diferencias significativas entre films según el Test de Tukey (p < 0,05).

6.3.2.8. Análisis de componentes principales (PCA)

Se realizó un PCA (basado en la matriz de correlación) para analizar la correlación entre los parámetros de calidad. Se obtuvo que los componentes principales 1 y 2 (PC1 y PC2) del PCA explicaron el 82,9% de la variabilidad total de los datos (**Tabla 6. 14**). Semejante a los resultados de la sección 6.1, la mayoría de las variables fueron bien representadas y correlacionadas con el PC1, indicando que existe correlación entre ellas y que evolucionan de forma similar a lo largo del almacenamiento (**Tabla 6. 15**, **Figura 6. 24**). El contenido de HCA fue mejor representado por el PC2, y no mostró correlación alta con el resto de las variables. El contenido de GSL se correlacionó moderadamente con parámetros de la calidad externa como dureza, apariencia externa, parámetros colorimétricos y pérdida de masa. Resultados similares se obtuvieron en 6.1., donde se había observado correlación moderada entre contenido de GSL y atributos sensoriales. Un resultado

a destacar es la significativa correlación entre el contenido de GSL y la dureza ($r = -0,844$, $p < 0,0001$), que podría validar la hipótesis de que cambios en la textura están relacionados a la descompartimentación y consecuente contacto de la enzima con su sustrato, llevando a la hidrólisis de los GSL (Casajús et al., 2020).

Tabla 6. 14. Valores propios de cada componente, porcentaje de varianza explicada por cada componente y varianza explicada acumulada.

Componente	Valor propio	Porcentaje de varianza	Porcentaje de varianza acumulada
PC1	5,48	68,55	68,55
PC2	1,15	14,34	82,90
PC3	0,60	7,50	90,40

Tabla 6. 15. Coseno cuadrado de las variables en cada componente.

Variable	PC1	PC2	PC3
Apariencia externa (Appereance)	0,71	0	0
L* (L)	0,80	0,02	0
C* _{ab} (C)	0,88	0,02	0,05
h _{ab} (h)	0,90	0,02	0,04
ML	0,81	0,01	0,08
Dureza (Hardness)	0,61	0,30	0,01
GSL	0,54	0,29	0,15
HCA	0,24	0,49	0,26

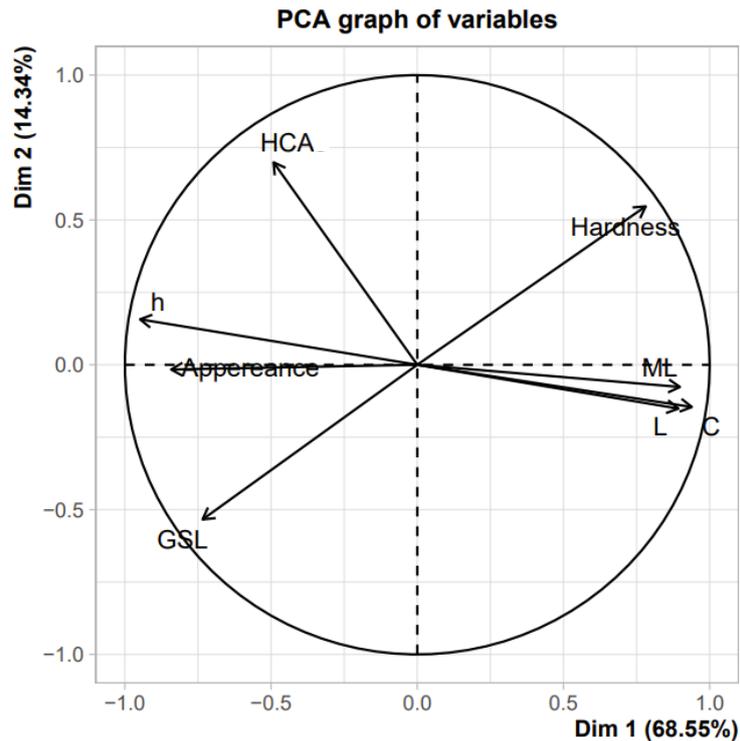


Figura 6. 24. Representación de parámetros de calidad de floretes de en el primer y segundo componente del análisis de componentes principales. Análisis realizado con datos obtenidos durante el almacenamiento de floretes sin envasar y MAP en BOPP microperforado (en distintos niveles) y almacenados a 6 y 12°C.

6.3.3. Conclusiones parciales

Los resultados demuestran que el MAP empleando films microperforados es una tecnología idónea para extender la vida útil de floretes de brócoli mínimamente procesados y conservar en mayor medida su valor bioactivo a temperaturas de almacenamiento por encima de las recomendadas ($> 4^{\circ}\text{C}$). Además, evitó el riesgo y generación de anoxia durante el almacenamiento.

La selección del nivel de perforación del film resultó un aspecto relevante a tener en cuenta para la conservación de la calidad del brócoli durante el almacenamiento entre 6 y 12°C. Brócolis envasados en films con menor nivel de perforación (expuestos a menores niveles de O_2 y mayores de CO_2) mostraron mayor conservación del color, apariencia externa, firmeza y contenido de glucosinolatos y ácidos hidroxycinámicos en comparación con brócolis envasados en films con mayor número de perforaciones.

Por primera vez, se realizó un análisis con un enfoque cinético para la evolución de glucosinolatos durante el almacenamiento. Se identificó que tanto la temperatura como la composición atmosférica tuvieron un efecto en la degradación de glucosinolatos. Por lo tanto, la correcta selección del nivel de perforaciones del film, en función de la temperatura de la cadena de suministro, resulta determinante para la conservación del valor bioactivo de floretes de brócoli.

El análisis de componentes principales indicó que existe correlación entre la mayoría de los parámetros de calidad evaluados, destacándose la alta correlación entre el color, pérdida de masa y apariencia externa, y entre dureza y contenido de glucosinolatos.

Las condiciones identificadas son factibles de aplicar por industrias de procesamiento mínimo, y permiten prolongar la vida útil y preservar la calidad de floretes de brócoli, contribuyendo a reducir las pérdidas postcosecha y a la obtención de productos con gran potencial bioactivo.

CAPÍTULO 7.

TEMA 2.

*Uso de bioplásticos para el envasado
de brócoli*

7. 1. Uso de un film compostable de PLA/PBAT como alternativa ecológica para el envasado individual de cabezas de brócoli

7.1.1. Diseño experimental

Se utilizaron cabezas de brócoli (cv. Marathon) provistas por productores de Murcia, España (Grupo Lucas). Cabezas libres de defectos (de peso promedio $296,5 \pm 0,4$ g) fueron recolectadas, enfriadas hasta 1°C y transportadas a la Universidad Miguel Hernández (Orihuela, España) para ser procesadas y analizadas inmediatamente. Tres lotes de 50 cabezas de brócoli cada uno se separaron de la siguiente forma:

- **No film:** cabezas de brócoli sin envasar (grupo control)
- **Nature Fresh®:** cabezas de brócoli envasadas en film Nature Fresh®
- **LLDPE:** cabezas de brócoli envasadas en film de polietileno lineal de baja densidad

Las características y propiedades de los films fueron descritas en el capítulo 5.

Los 3 lotes se almacenaron a 2°C . Cada cabeza de brócoli constituyó una unidad experimental. Se muestrearon ocho cabezas de brócoli diferentes en cada punto de muestreo (0, 7, 14, 21, 28 y 35 días) para cada condición de envasado. Cinco muestras se evaluaron inmediatamente para determinar pérdida de masa, composición gaseosa del espacio cabeza, textura, color, apariencia externa, carotenoides y contenido de clorofila. Tres muestras fueron congeladas y liofilizadas para el análisis de glucosinolatos y fenoles. En la **Figura 7. 1** se muestra un esquema del diseño experimental y fotos de las cabezas de brócoli en cada sistema de envasado.

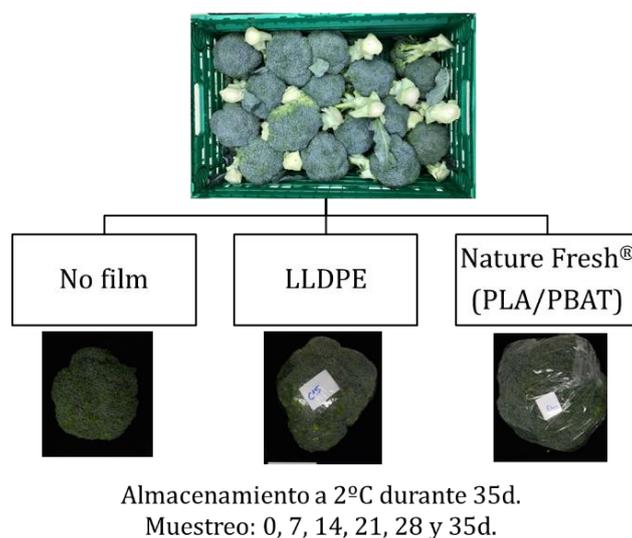


Figura 7. 1. Esquema del diseño experimental para evaluar el efecto de films de envasado (No film: sin envasar; LLDPE: polietileno lineal de baja densidad; Nature Fresh®: ácido poliláctico y tereftalato adipato de polibutileno) en la calidad externa y compuestos bioactivos de cabezas de brócoli (cv. Marathon) durante el almacenamiento a 2°C.

7.1.2. Resultados y discusión

7.1.2.1. Composición del espacio cabeza

Las cabezas de brócoli envasadas mostraron una disminución significativa de la concentración de O₂ y aumento de la concentración de CO₂ en el espacio cabeza, en la primera semana de almacenamiento ($p < 0,001$) (**Figura 7. 2, a-b**). Se observó una evolución de O₂ y CO₂ semejante en ambos films de envasado, no existiendo diferencias significativas en la composición de gases entre ellos. Esto se explica debido a que ambos materiales presentan valores de OTR y CTR del mismo orden (**Tabla 5.1**). Las cabezas de brócoli envasadas en LLDPE mostraron una tendencia a alcanzar concentraciones inferiores de O₂ y superiores de CO₂ respecto al brócoli en Nature Fresh®, lo que es consistente con varios estudios que reportan que la permeabilidad al O₂ y CO₂ de los films de PLA/PBAT son similares o superiores en comparación con los films tradicionales (LDPE y BOPP) (Briassoulis & Giannoulis, 2018; Li et al., 2018; Zhang et al., 2019).

A partir de los días 7 y 14 se observó un aumento gradual de O₂ y disminución de CO₂, respectivamente. Esta evolución, que tiende a la composición del aire, podría

deberse al sistema de envasado con envoltura autoadhesiva. El sello autoadhesivo podría deteriorarse con el tiempo (por ejemplo, debido a la condensación de agua) disminuyendo la resistencia al flujo de O_2 y CO_2 a través del film (Jacobsson et al., 2004; Caleb et al., 2016). En este sentido, sería conveniente mejorar el sellado para lograr una adecuada atmósfera de equilibrio en el espacio cabeza.

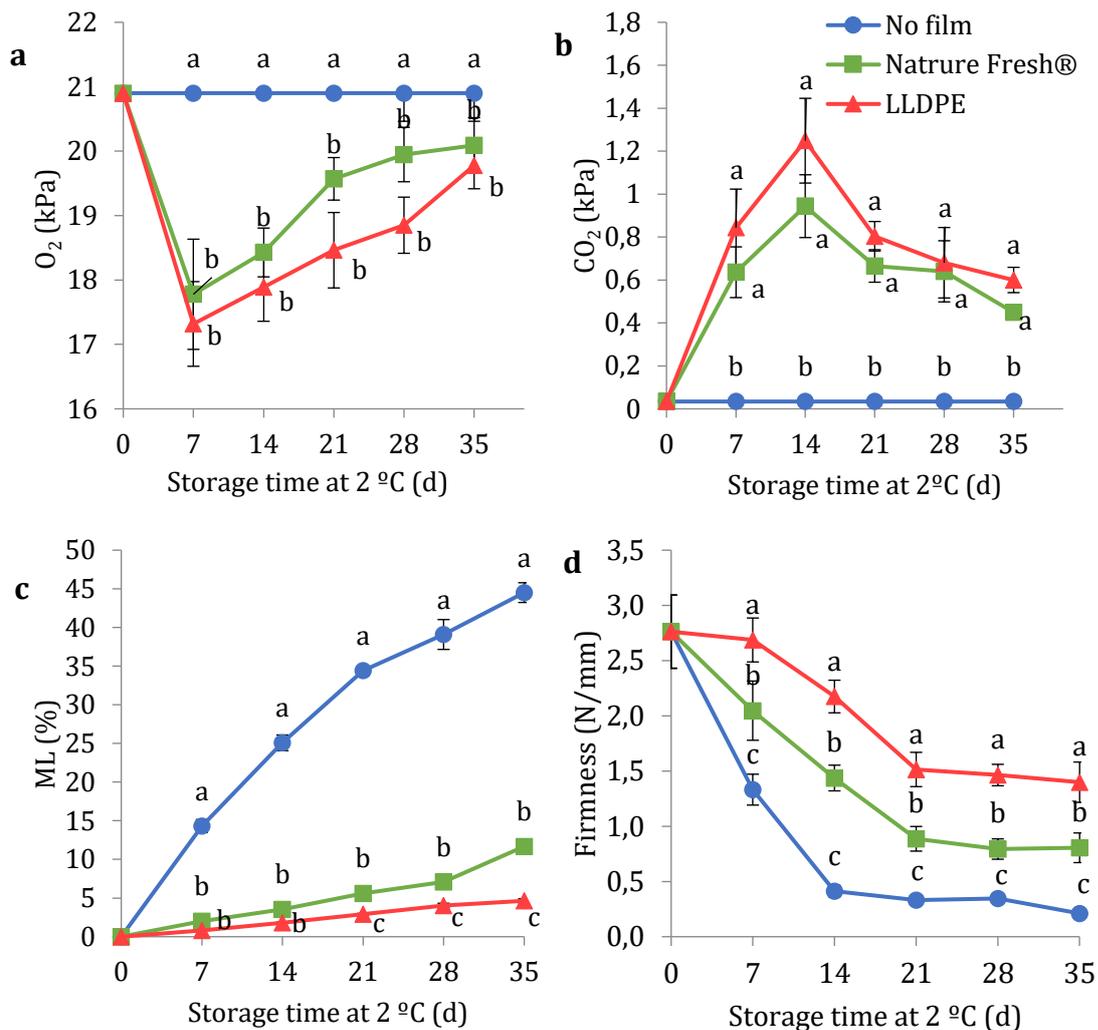


Figura 7. 2. Efecto de la condición de envasado en: a) composición de O_2 en el espacio cabeza b) composición de CO_2 en el espacio cabeza, c) pérdida de masa (ML) y d) firmeza de cabezas de brócoli durante el almacenamiento a 2 °C. Se representan los valores medios ($n=5$) y la desviación estándar (barras verticales). Letras distintas indican diferencias significativas entre condiciones de envasado dentro de un mismo día ($p < 0,05$). Condiciones de envasado: no film (—●—), Nature Fresh® (—■—) and LLDPE (—▲—).

7.1.2.2. Pérdida de masa (ML)

Todas las muestras presentaron un aumento significativo de la ML durante el almacenamiento ($p < 0,001$) (**Figura 7. 2, c**). Las cabezas de brócoli sin envasar mostraron una ML significativamente mayor en comparación con las cabezas de brócoli envasadas ($p < 0,001$), con valores de ML por encima de los límites de comercialización (6%) al día 7 de almacenamiento ($14,3 \pm 0,8 \%$). Una evolución semejante en cabezas de brócoli del mismo cultivar almacenadas a 1°C fue reportada previamente por (Serrano et al., 2006). Durante las dos primeras semanas de almacenamiento, los brócolis envasados en LLDPE y Nature Fresh® mostraron niveles de ML aceptables (2,6% en promedio) sin diferencias significativas entre ellos. Se obtuvieron diferencias significativas a partir del día 21, donde brócolis envasados en Nature Fresh® mostraron una ML mayor ($5,6 \pm 0,6 \%$) respecto a los envasados en LLDPE ($2,9 \pm 0,1 \%$). Este resultado concuerda con la menor tasa de transmisión al vapor de agua de la película LLDPE, lo que reduce la pérdida de agua del producto por aumento de la humedad relativa en el interior del envase. Al final del almacenamiento las muestras presentaron valores de ML de $44,5 \pm 1,3 \%$, $11,7 \pm 0,4 \%$ y $4,6 \pm 0,3 \%$ para muestras sin envasar, Nature Fresh® y LLDPE, respectivamente. Resultados análogos fueron informados por Zhang et al. (2019) para el maracuyá, quienes observaron que la ML del maracuyá sin envasar fue significativamente superior respecto a los envasados, y que los envasados en PE y PLA/PBAT mostraron una evolución similar durante 21 días de almacenamiento a 20°C .

Los resultados confirman que la deshidratación es un factor limitante crítico en la vida útil de las cabezas de brócoli y que el envasado ofrece una solución clave en la conservación de este parámetro de calidad, al limitar la transferencia de agua del producto hacia la atmósfera exterior (Jia et al., 2009; Serrano et al., 2006). En términos de ML (considerando como límite de comerciabilidad 6%), la película Nature Fresh® permitió extender la vida útil de las cabezas de brócoli (al menos 21 días) en comparación con las sin envasar (menos de 7 días), pero la redujo en comparación con el brócoli envasado en LLDPE (más de 35 días).

7.1.2.3. Firmeza

Se realizó un test de compresión para evaluar la firmeza/compacidad (firmeza a la presión) de las cabezas de brócoli, que es una de las características más valoradas por los consumidores (Hussain et al., 2021; Jacobsson et al., 2004).

Las cabezas de brócoli mostraron una pérdida significativa de la firmeza durante el almacenamiento, independientemente de la condición de envasado ($p < 0,001$). Además, se encontró un efecto significativo del sistema de envasado sobre la firmeza ($p < 0,0001$) (**Figura 7. 2., d**). Brócolis sin envasar mostraron la mayor pérdida de firmeza, que disminuyó en un 52 % al día 7 y en 85 % al día 14. Luego permanecieron sin variaciones significativas hasta el final del almacenamiento. Brócolis envasados mostraron una disminución en la firmeza hasta el día 21, que luego se mantuvo constante hasta el final del almacenamiento. Brócolis en Nature Fresh® presentaron valores de firmeza significativamente más bajos en comparación con brócolis en LLDPE. Al día 21 (límite de la vida útil de Nature Fresh® debido a la pérdida de masa), la firmeza disminuyó un 68 % en muestras Nature Fresh® y un 45 % en muestras LLDPE. Los datos de firmeza y pérdida de masa mostraron un coeficiente de correlación de Pearson de -0,795 ($p = 0,0002$) indicando que existe correlación entre estas variables. Resultados similares fueron reportados por Fernández-León et al. (2013) en cabezas de brócoli durante el almacenamiento en atmósfera controlada, quienes también encontraron correlación entre los valores de pérdida de peso y firmeza del brócoli.

En este estudio, el fenómeno predominante durante el almacenamiento del brócoli fue la pérdida de agua que está directamente relacionada con la pérdida de turgencia y compacidad. Los cambios de compacidad durante el almacenamiento también pueden observarse en la **Figura 7. 3**, donde en los brócolis sin envasar las flores individuales están abiertas y los floretes se separan del tallo con apariencia laxa. Sin embargo, en los brócolis envasados, tanto en Nature Fresh® como en LLDPE, las flores individuales permanecen cerradas y apretadas entre sí, y los floretes compactos con apariencia firme. Según el registro fotográfico y los resultados de la evaluación de la apariencia externa, aunque Nature Fresh® presentó una mayor pérdida de firmeza en comparación con LLDPE, la misma no impactó de forma significativa en la apariencia externa del producto.

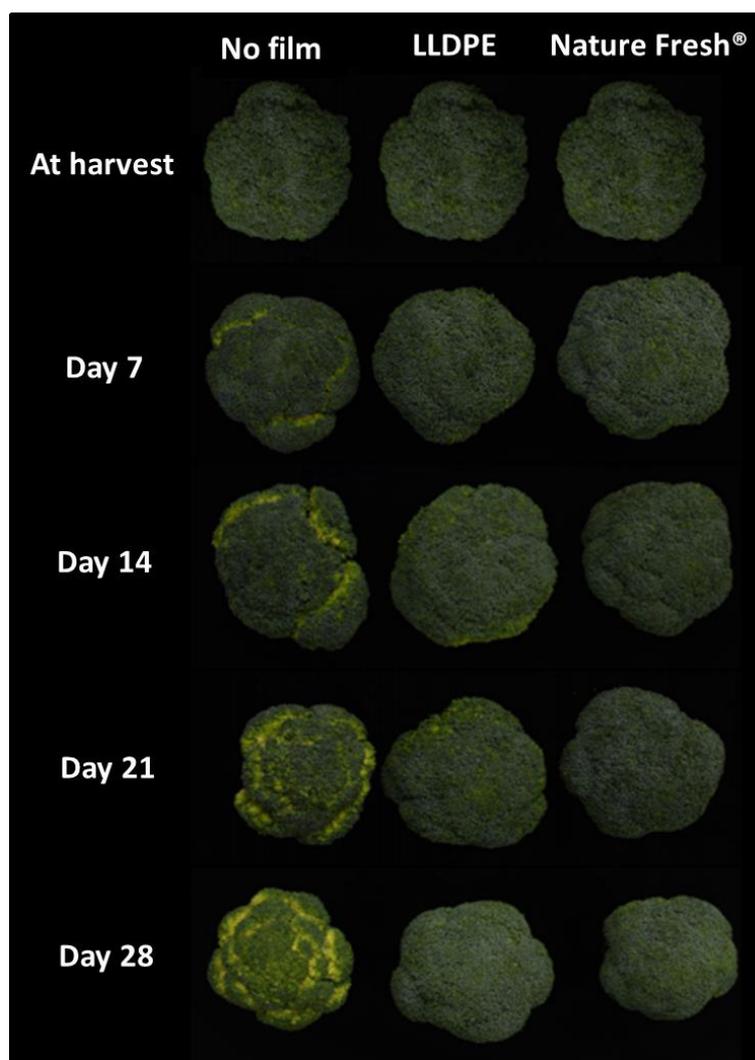


Figura 7. 3. Evolución de la calidad visual de brócoli sin envasar (No film), brócoli envasado en film Nature Fresh® y brócoli envasado en LLDPE durante el almacenamiento a 2°C.

7.1.2.4. Color

El efecto del envasado sobre la evolución del color coincide con los resultados obtenidos en las secciones anteriores para floretes de brócoli, donde el envasado resultó clave en la conservación de este importante parámetro de calidad.

El sistema de envasado tuvo un efecto significativo ($p < 0,05$) sobre la luminosidad (L^*), la intensidad/saturación del color (C^*_{ab}) y el tono de color (h_{ab}) de las cabezas de brócoli a lo largo del almacenamiento (**Figura 7. 4., a-c**). Brócolis sin envasar presentaron un marcado amarillamiento. L^* y C^*_{ab} aumentaron con el tiempo de ($41,0 \pm 0,2$) a ($46,5 \pm 0,3$) y de ($11,4 \pm 0,5$) a ($23,2 \pm 0,4$) respectivamente, y h_{ab}

disminuyó significativamente de $(135,0 \pm 0,3)$ a $(117,5 \pm 0,2)$ indicando un cambio de tonalidades verdes a amarillas. No se encontraron diferencias significativas en el color de brócolis envasados en Nature Fresh® y LLDPE (**Figura 7. 4, a-c**). El envasado permitió preservar los parámetros L^* y C^*_{ab} a lo largo del almacenamiento, y h_{ab} disminuyó levemente (hasta 131,8 en promedio). Estos resultados pueden visualizarse en la **Figura 7. 3**, donde es clara la evolución hacia tonos amarillos en brócolis sin envasar, mientras que brócolis envasados mantienen el color verde inicial. El film Nature Fresh® mostró la misma eficacia que el LLDPE para retrasar el proceso de amarilleo. Esto concuerda con que la composición del espacio cabeza en ambos sistemas de envasado fue semejante, y los procesos de degradación del color son influenciados en gran medida por la composición de O_2 y CO_2 de la atmósfera, como también fue observado para floretes de brócoli (sección 6.3) (Caleb et al., 2016; Fernández-León, et al., 2013; Jia et al., 2009; Serrano et al., 2006).

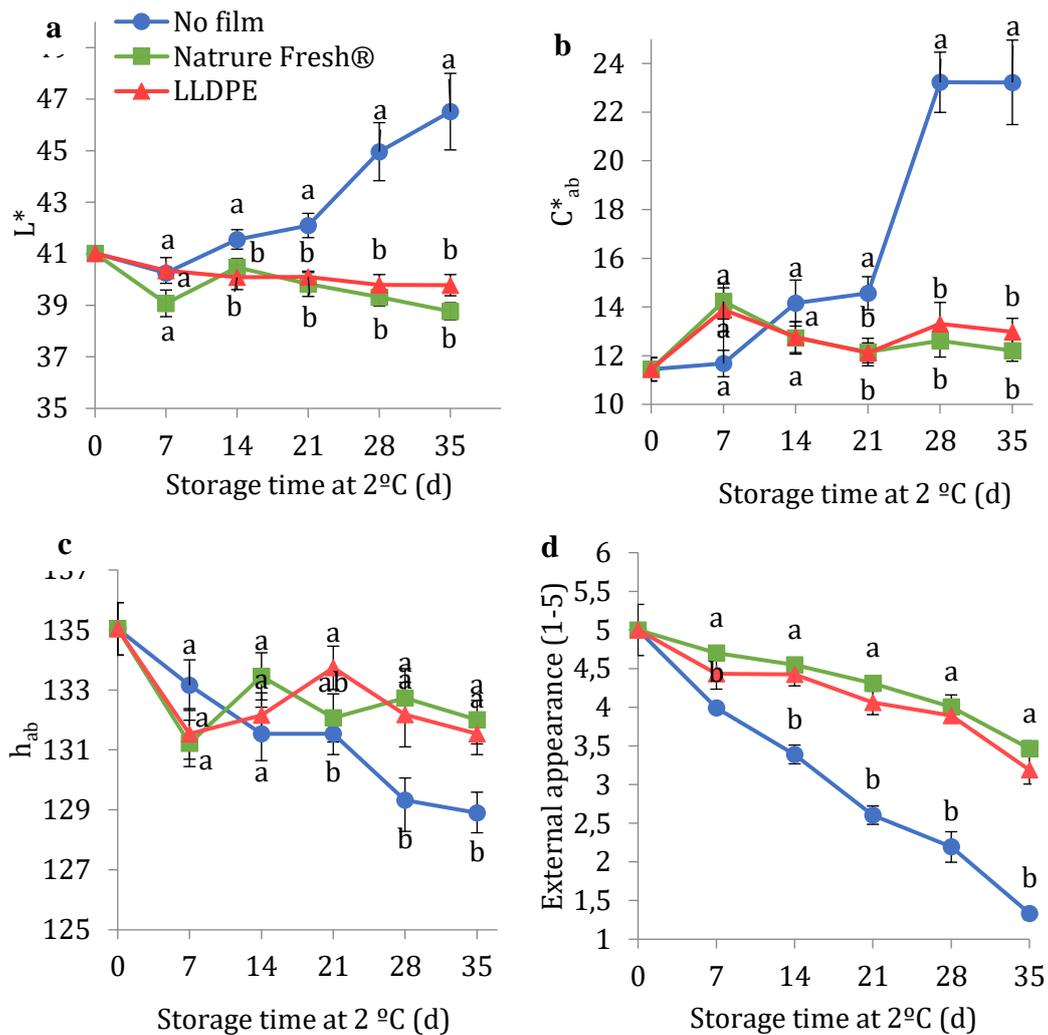


Figura 7. 4. Efecto de la condición de envasado en: a) L^* , b) C^*_{ab} , c) h_{ab} , y d) apariencia externa de las cabezas de brócoli durante el almacenamiento a 2°C. Se representan los valores medios ($n=5$) y la desviación estándar (barras verticales). Letras distintas indican diferencias significativas entre condiciones de envasado dentro de un mismo día ($p < 0,05$). Condiciones de envasado: no film (—●—), Nature Fresh® (—■—) y LLDPE (—▲—).

7.1.2.5. Apariencia externa

Todas las muestras mostraron un descenso significativo del puntaje de apariencia externa durante el almacenamiento ($p < 0,05$), lo que indica un detrimento de la calidad organoléptica (**Figura 7. 4, d**). Cabezas de brócoli sin envasar presentaron una puntuación significativamente inferior en comparación con las cabezas envasadas, alcanzando valores por debajo de la puntuación límite de comerciabilidad al día 21. No se encontraron diferencias entre brócolis envasados en Nature Fresh® y LLDPE ($p > 0,05$). Además, este parámetro de calidad no resultó

limitante de la vida útil en ninguna de las condiciones de envasado, dado que el puntaje se mantuvo por encima del límite de comerciabilidad durante todo el almacenamiento. Nuevamente, en la **Figura 7. 3** se pueden observar los cambios en la calidad visual a lo largo del tiempo, donde brócolis sin envasar mostraron un marcado amarilleo y pérdida de compacidad, mientras que brócolis envasados retuvieron el color y la apariencia firme. La apariencia externa presentó correlaciones significativas con la ML ($r = 0,945$; $p < 0,0001$), firmeza ($r = -0,882$; $p = 0,0003$), C^*_{ab} ($r = 0,915$; $p = 0,0001$) y h_{ab} ($r = -0,960$; $p < 0,0001$), lo que indica que todos estos parámetros contribuyen significativamente a la apariencia externa.

Es importante destacar que las cabezas de brócoli envasadas en Nature Fresh® no mostraron diferencias en la apariencia externa en comparación con las envasadas en LLDPE, a pesar de la mayor reducción de peso y firmeza.

7.1.2.6. Contenido de glucosinolatos (GSL)

Se identificaron cuatro GSL en las muestras de brócoli analizadas, uno alifático: glucorafanina (GRA) y tres indólicos: glucobrasicina (GB), 4-metoxiglucobrasicina (MGB) y neoglucobrasicina (NGB). El glucosinolato predominante fue GRA, que representó el 48,2 % de los GSL totales, seguido por GB, NGB y MGB con 26,3 %, 20,8 % y 4,7 %, respectivamente. Este perfil coincide con el determinado en floretes de brócoli de este cultivar (cv. Marathon) en la sección 6.2.

El contenido de GSL fue estable durante los 35 días de almacenamiento a 2°C, independiente del tipo de envase e incluso en cabezas expuestas al aire (**Figura 7. 5, a**). Esto coincide con trabajos que reportan conservación de GSL durante el almacenamiento a 1-4°C de cabezas de brócoli, aunque los períodos de almacenamiento estudiados son más cortos (máximo 21 días) (Fernández-León et al., 2013; Rybarczyk-Plonska et al., 2016; Song & Thornalley, 2007; Rangkadilok et al., 2002). Sin embargo, otros autores han reportado un descenso significativo del contenido de GSL en cabezas de brócoli almacenadas entre 1°C y 20°C (Jones et al., 2006; Rodrigues & Rosa, 1999; Vallejo et al., 2003b). En cabezas de brócoli del mismo cultivar (Marathon), Vallejo et al. (2003) reportaron pérdidas de hasta un 71% y 40% para GSL indólicos y alifáticos respectivamente, luego de 7 días de

almacenamiento a 1°C. Nuestros resultados no están de acuerdo con estos reportes, e indican que el contenido de GSL durante el almacenamiento a bajas temperaturas es estable, mientras el producto no esté en un estado avanzado de deterioro.

Brócolis envasados en LLDPE mostraron un incremento significativo del contenido de GSL totales a lo largo del almacenamiento, desde $15,17 \pm 1,65 \mu\text{mol/g}$ (día 0) a $23,80 \pm 1,20 \mu\text{mol/g}$ (día 35). Brocolis en Nature Fresh® también presentaron una tendencia creciente, desde $15,17 \pm 1,65 \mu\text{mol/g}$ a $19,62 \pm 1,43 \mu\text{mol/g}$ (día 35), pero el incremento no fue estadísticamente significativo. En consecuencia, el incremento del contenido de GSL durante el almacenamiento podría estar vinculado a la aplicación del MAP. Esto coincide con los resultados obtenidos en la sección 6.2., donde floretes de brócoli MAP (del mismo cultivar) almacenados a 2°C presentaron un incremento en el contenido de GSL totales con el tiempo. Los resultados están alineados con reportes donde el incremento de GSL ha sido asociado a una respuesta al estrés causada por la modificación de la atmosfera circundante, entre otros factores (Rybarczyk-plonska et al., 2016; Torres-Contreras et al., 2017).

Hasta el día 21, no existieron diferencias significativas en el contenido GSL totales entre brócolis en diferentes sistemas de envasado (excepto el día 7 donde Nature Fresh® presentó un valor más alto en comparación con las muestras sin envasar y LLDPE) (**Figura 7. 5, a**). Los resultados coinciden con los obtenidos en la sección 6.2 para floretes de brócoli, donde moderadas modificaciones de la atmósfera no tuvieron impacto en la conservación de GSL a 2°C. A los días 28 y 35, brócolis en LLDPE mostraron un mayor contenido de GSL en comparación con los envasados en Nature Fresh® y sin envasar. La menor firmeza de estas muestras podría explicar este resultado, ya que la degradación y descompartimentación del tejido hace que mirosinasa y GSL entren en contacto aumentando la hidrólisis de estos compuestos. Sin embargo, no se encontró correlación entre los datos de firmeza y contenido de GSL que respalde esta hipótesis.

Se observó un cambio en el perfil de GSL a lo largo del tiempo para todas las condiciones de envasado (**Figura 7. 5, b-e**), probablemente por los diferentes mecanismos de síntesis y degradación de cada grupo de compuestos en respuesta a los factores externos (como se vio en la sección 6.2). Independientemente de la condición de envasado, se observó un incremento del contenido de GSL indólicos a

lo largo del tiempo. Resultados semejantes fueron observados para floretes de brócoli almacenados a 2°C (sección 6.2). Si se compara el día de la cosecha (día 0) con el día 35, el mayor incremento lo presentaron las cabezas MAP, las cuales presentaron un incremento significativo de GB, MGB y NGB. El contenido de GRA permaneció constante en brócolis sin envasar y en los envasados en Nature Fresh® ($p > 0,05$), observándose una tendencia decreciente. Brócolis en LLDPE mostraron un descenso significativo al día 7 y 14, seguido de un incremento en los días 21 y 28 donde se alcanzó el contenido inicial de GRA. La evolución del perfil de GSL es consistente a lo largo de esta Tesis, donde se observa incremento de GSL indólicos mientras que la GRA muestra estabilidad o degradación durante el almacenamiento. La síntesis de *novo* de GSL como respuesta al estrés se ha vinculado principalmente a los mecanismos de síntesis de GSL indólicos, lo que coincide con el incremento de GB, NGB y MGB identificados en estos estudios (Jones et al., 2006; Verkerk et al., 2001).

Varios trabajos informan que las atmósferas controladas y modificadas ayudan a preservar el contenido de GSL de cabezas de brócoli durante el almacenamiento (Fernández-León et al., 2013; Jones et al., 2006). Sin embargo, la mayor parte de la literatura recomienda modificaciones drásticas de la atmósfera (concentraciones de O₂ inferiores al 10% y de CO₂ superiores al 5%) (Fernandez-León et al., 2013). Este estudio sugiere que durante el almacenamiento a bajas temperaturas (2°C) no se requiere modificación de la atmósfera para la conservación de GSL en cabezas de brócoli. También sugiere que ligeras modificaciones de la atmósfera, como las generadas al envasar las cabezas de brócoli en Nature Fresh® y LLDPE, aumentaron el contenido total de GSL.

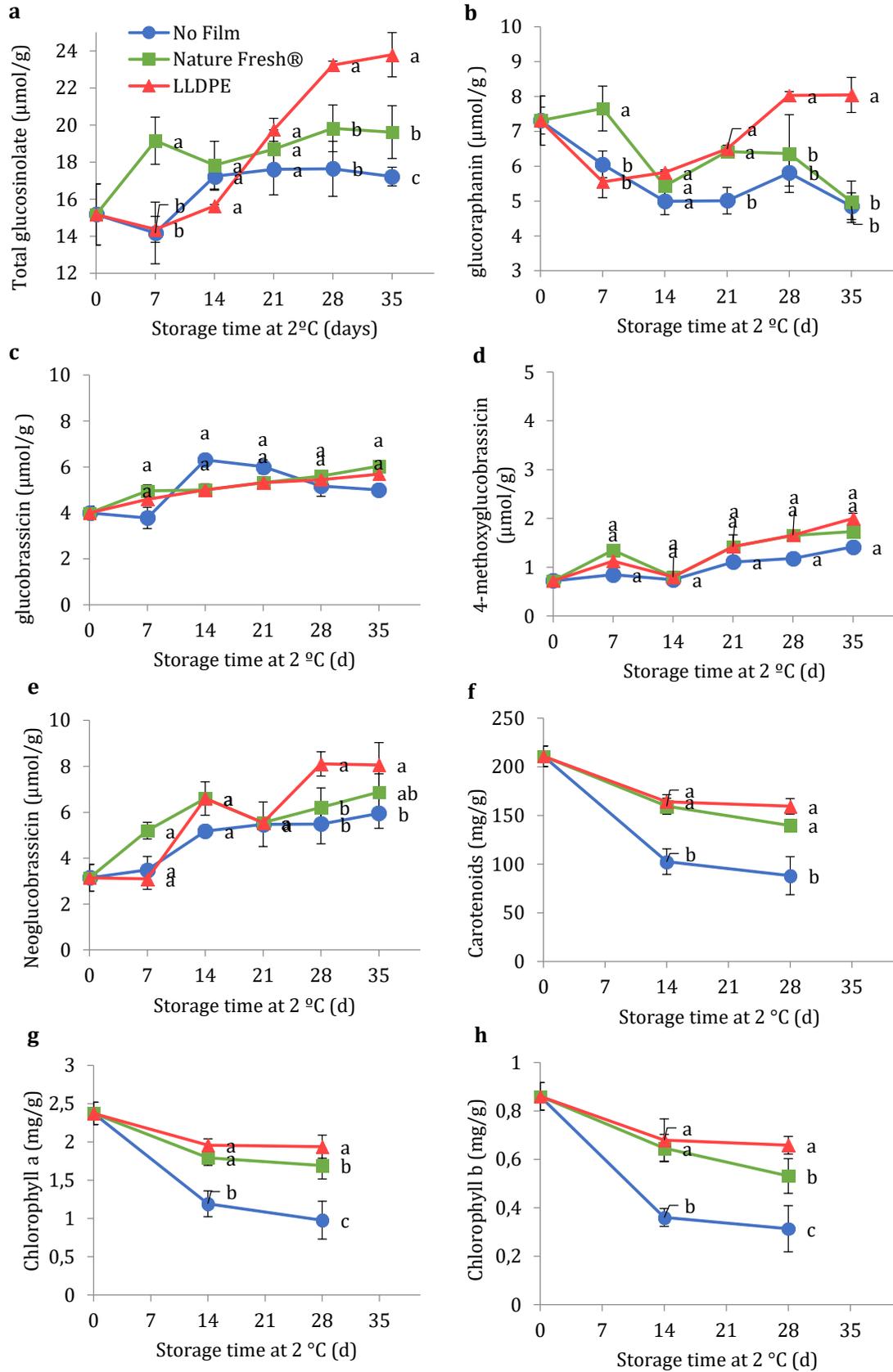


Figura 7. 5. Efecto de la condición de envasado en la evolución de glucosinolatos y pigmentos de cabezas de brócoli durante el almacenamiento a 2°C. a) glucosinolatos totales b) glucorafanina c) glucobrassicina, d) 4-metoxylucobrassicina, e)

neoglucobrasicina f) carotenoides g) clorofila a h) clorofila b. Se representan los valores medios ($n = 3$) y la desviación estándar (barras verticales). Letras distintas indican que existen diferencias significativas entre sistemas de envasado dentro del mismo día según el Test de Tukey ($p < 0,05$). Condiciones de envasado: no film (—●—), Nature Fresh® (—■—) and LLDPE (—▲—).

7.1.2.7. *Ácidos hidroxicinámicos (HCA)*

Los ácidos sinápicos y sus derivados fueron el grupo predominante de HCA identificados en las cabezas de brócoli (caracterización que coincide con las secciones anteriores). La evolución de estos compuestos a lo largo del tiempo fue la misma para todas las condiciones de envasado, sin diferencias significativas entre ellas. El contenido de HCA se mantuvo constante hasta el día 14, a partir de donde se observó un aumento desde $1,89 \pm 0,16 \mu\text{mol/g}$ a $3,58 \pm 0,19 \mu\text{mol/g}$. Luego, el contenido de HCA se mantuvo sin cambios hasta el final del almacenamiento. Los resultados coinciden con los obtenidos en la sección 6.2, por lo que se podría concluir que temperaturas óptimas de almacenamiento permiten conservar e incluso incrementar el contenido de estos compuestos, independientemente del sistema de envasado. La acumulación de estos compuestos podría deberse a la inducción de la biosíntesis por estrés abiótico (Villarreal-García et al., 2016) o por la producción de especies reactivas de oxígeno durante el proceso de senescencia (Hasperué et al., 2015).

7.1.2.8. *Contenido de clorofilas y carotenoides*

La evolución del contenido de clorofilas y carotenoides fue similar, existiendo fuerte correlación entre estas variables (**Figura 7. 5, f-h**). Fernandez-León et al. (2013) también observaron una evolución estadísticamente equivalente entre carotenoides, clorofila a y clorofila b a lo largo del almacenamiento de brócoli.

En todas las muestras, el contenido de clorofilas disminuyó significativamente ($p < 0,05$) durante el almacenamiento (**Figura 7. 5, g-h**). Resultados similares fueron obtenidos por Yamauchi et al. (1997) para floretes de brócoli, quienes reportaron un descenso del contenido de clorofila a y b durante el almacenamiento (4 días a 15°C) independientemente si se modificaba la atmósfera o no. En este estudio,

existió efecto del envasado y brócolis MAP preservaron mejor el contenido de clorofilas que brócolis sin envasar ($p < 0,05$). Este resultado concuerda con lo reportado en otros trabajos, donde se observaron menores descensos de clorofila en brócoli cuando se aplicó la tecnología de MAP que cuando no se aplicó (Büchert et al., 2011; Caleb et al., 2016; Serrano et al., 2006; Zhang et al., 2021). Se sabe que tanto la modificación de la atmósfera y la humedad relativa que se logran al envasar son factores que inciden en la retención del color, y son los que explican la mayor retención de pigmentos. Al día 35, las muestras de LLDPE presentaron mayor contenido de clorofila a y b ($2,57 \pm 0,17$ mg/g de clorofila total) respecto a las muestras Nature Fresh® ($2,20 \pm 0,13$ mg/g de clorofila total). Posiblemente, las diferencias en la humedad relativa entre las condiciones de envasado (debido a la tasa de transmisión del vapor de agua) podrían explicar la mayor retención de clorofila de las muestras de LLDPE (Caleb et al., 2016). Además, el contenido de clorofila a y b se correlacionaron significativamente con la ML ($r = -0,925$ y $-0,896$), firmeza ($r = 0,955$ y $0,972$), C^*_{ab} ($r = -0,803$ y $-0,760$), h_{ab} ($r = 0,879$ y $0,846$) y apariencia externa ($r = -0,941$ y $-0,933$) (ver **Figura 7S. 1**, en el material suplementario). Por lo tanto, el contenido de clorofila estuvo directamente relacionado a los procesos de senescencia de las cabezas de brócoli.

El contenido de carotenoides disminuyó tanto en las muestras sin envasar como en las envasadas. La disminución fue significativamente mayor en el brócoli sin envasar (de $210,9 \pm 3,3$ a $88,1 \pm 6,1$ mg/g) en comparación con Nature Fresh® (a $139,8 \pm 2,0$ mg/g) y LLDPE (a $159,4 \pm 2,5$ mg/g). Resultados similares fueron reportados por Fernández-León et al. (2013), quienes observaron una reducción en el contenido de β -caroteno durante el almacenamiento, que fue más pronunciado en brócolis sin envasar que en los MAP. No se encontraron diferencias significativas en el contenido de carotenoides entre cabezas envasadas en Nature Fresh® y LLDPE, por lo que ambos films fueron igualmente eficaces en reducir las pérdidas de carotenoides.

7.1.2.9. Análisis de componentes principales (PCA)

Los componentes principales 1 y 2 (PC1 y PC2) del PCA explicaron el 78,8 % de la variabilidad de los datos. La mayoría de las variables estuvieron bien representadas

y correlacionadas con el PC1, excepto el contenido de GSL que fue mejor representado por el PC2 (**Figura 7. 6**). Al igual que los resultados en floretes de brócoli, la mayoría de las variables estuvieron correlacionadas con un mismo componente indicando correlación entre dichas variables y que se encuentran vinculadas a procesos de senescencia. El PC1 se correlacionó positivamente con las variables que disminuyeron su valor a lo largo del almacenamiento: firmeza, apariencia externa, h_{ab} , y contenido de clorofilas y carotenoides. A su vez, estas variables se correlacionaron negativamente con aquellas que presentaron un aumento a lo largo del almacenamiento: ML, L^* , C^*_{ab} y contenido HCA. El contenido de GSL mostró una calidad de representación media en los componentes principales 1 y 2 y no mostró correlación significativa con ninguna de las variables estudiadas (**Figura 7S. 1.**)

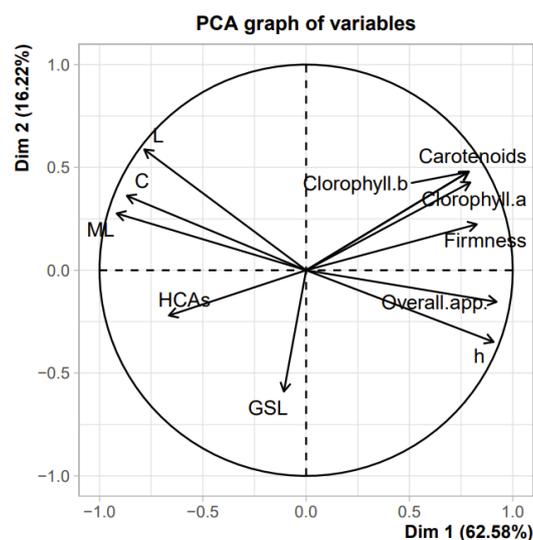


Figura 7. 6. Representación de diferentes parámetros de calidad de cabezas de brócoli almacenadas a 2°C en diferentes sistemas de envasado (sin envasar, Nature Fresh® y LLDPE), en el primer y segundo componente del análisis de componentes principales.

En la **Figura 7. 7** se representan las muestras en los PC1 y PC2 del PCA. Los brócolis recién cosechados se distinguen del grupo de muestras almacenadas, ubicándose hacia valores positivos tanto en el PC1 como en el PC2. Se puede observar que brócolis envasados en NatureFresh® y LLDPE muestran características similares.

Estas muestras se agrupan mayormente hacia valores positivos del PC1, indicando valores relativamente altos de apariencia externa, h_{ab} , firmeza, carotenoides y clorofilas. A medida que aumenta el tiempo de almacenamiento las muestras se ubican hacia valores menores del PC1 y PC2. Por otro lado, se distinguen significativamente las muestras sin envasar, que se ubican a lo largo de PC1 en orden descendente según el tiempo de almacenamiento, caracterizándose por valores mayores de ML, L^* y C^*_{ab} .

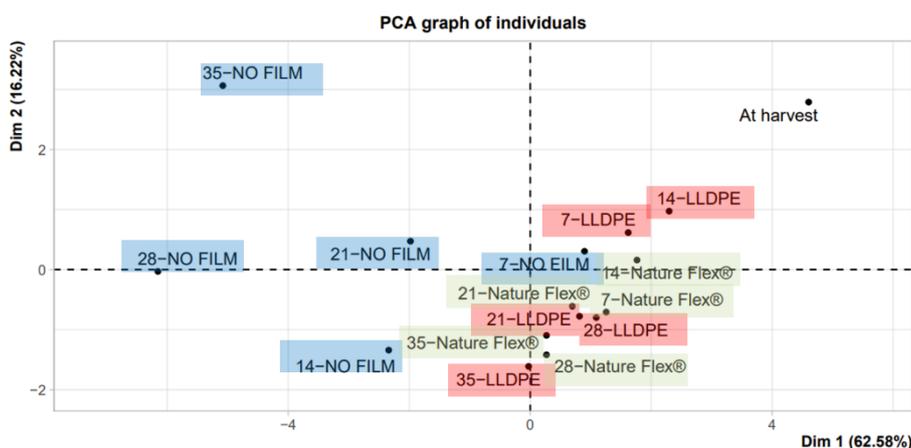


Figura 7. 7. Representación de muestras de brócoli en distintos sistemas de envasado (sin film ■, NatureFlex® ■ y LLDPE ■) con distinto tiempo de almacenamiento, en el primer y segundo componente del análisis de componentes principales.

7.1.3. Conclusiones parciales

Se evaluó la idoneidad de un nuevo film biodegradable basado en PLA y PBAT (Nature Fresh®), para su aplicación en el envasado de cabezas de brócoli. El envasado fue crucial para prolongar la vida útil de este producto. Brócolis envasados en Nature Fresh® y LLDPE mostraron una evolución similar en la composición de la atmósfera interna, color, contenido de ácidos hidroxicinámicos, carotenoides y apariencia externa durante el almacenamiento postcosecha a 2°C. La evolución de la pérdida de masa y la firmeza del brócoli fueron las principales diferencias entre los films. Sin embargo, la mayor pérdida de masa y firmeza del brócoli envasado en Nature Fresh® no tuvo un impacto significativo en la calidad visual del producto. El envasado en Nature Fresh® permitió preservar en gran medida el contenido de compuestos bioactivos y extender la vida útil de cabezas de brócoli al menos 21 días

(limitada por la pérdida de masa), período adecuado de comercialización. Por lo tanto, este film podría ser una alternativa viable de empaque para la comercialización de brócoli, contribuyendo a reducir pérdidas postcosecha y a la reducción de residuos plásticos. Se deben considerar estudios adicionales para determinar la idoneidad del film Nature Fresh® a otras temperaturas de almacenamiento.

7.1.4. Material suplementario

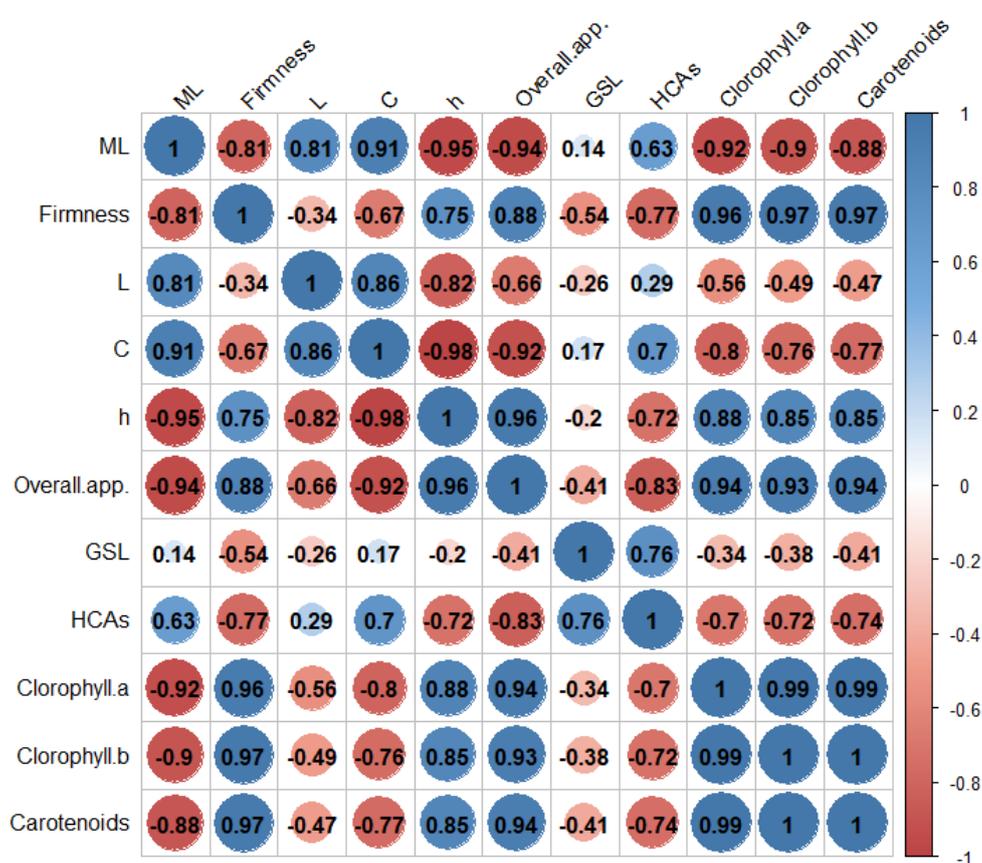


Figura 7S. 1. Mapa de calor de correlación de Pearson para los parámetros de calidad evaluados en cabezas de brócoli (cv. Marathon) a lo largo del almacenamiento postcosecha.

7.2. Film a base de celulosa para el envasado en atmósfera modificada: Efecto sobre el contenido de fitoquímicos y calidad externa de floretes de brócoli

7.2.1. Diseño experimental

Cabezas de brócoli (cv. Legacy) se obtuvieron y procesaron como se describe en Materiales y Métodos (4.1). Los floretes se dividieron al azar en 3 grupos homogéneos, uno por cada sistema de envasado:

- **Control:** Sin modificación de la atmósfera, envasados en bolsas de PP macro perforadas (diámetro de la perforación = 1000 μm ; 2,25 perforaciones/ cm^2).
- **PP_mp:** Bolsas de BOPP de 17 x 20,5 cm (30 μm de espesor) con dos líneas de micro perforaciones (de 100 μm de diámetro) y 45 mm de separación entre perforaciones. Las características del film son las descritas para el BOPP-CAD45 en el capítulo 5 (5.1.2.1.).
- **NatureFlex:** Bolsas a base de celulosa, de 17 x 20,5 cm (23,3 μm de espesor), comercializadas bajo el nombre de NatureFlex™ NVS23 (Futamura Group, Reino Unido). Las características del film fueron descritas en el capítulo 5 (5.1.2.1.).

Aproximadamente 105 ± 3 g de floretes de broccoli (4 unidades) se colocaron dentro de las bolsas y se termosellaron. Las bolsas fueron almacenadas a 4°C durante 14 días. Cada bolsa constituyó una unidad experimental. En tiempos de almacenamiento preseleccionados (0, 3, 9 y 14 días), se muestrearon para su análisis 3 unidades experimentales de cada condición de envasado. Durante el almacenamiento se determinó: las concentraciones de O₂ y CO₂ en el espacio cabeza, la pérdida de masa, color, textura (firmeza del tallo), apariencia externa, contenido de glucosinolatos y ácidos hidroxicinámicos. En la **Figura 7. 8** se muestra un esquema del diseño experimental descrito y la nomenclatura empleada para referirse a cada uno de los tratamientos estudiados.

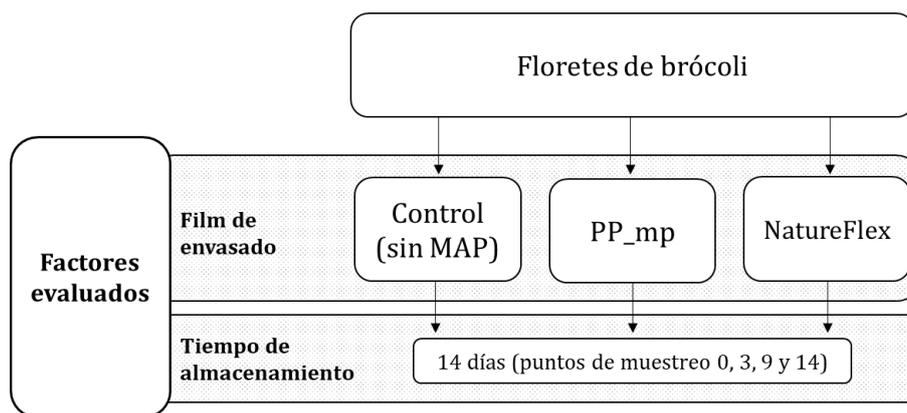


Figura 7. 8. Esquema del diseño experimental para evaluar el efecto del film de envasado en la calidad externa y compuestos bioactivos de floretes de brócoli (cv. Legacy) envasados en atmósfera modificada pasiva, almacenados a 4°C.

7.2.2. Resultados y discusión

7.2.2.1. Composición gaseosa del espacio cabeza

Las muestras NatureFlex mostraron un rápido cambio de la composición del espacio cabeza, alcanzando al día 3 concentraciones de O₂ y CO₂ de $2,4 \pm 1,2$ y $22,5 \pm 1,6$ kPa respectivamente (**Figura 7. 9**). Según la bibliografía, concentraciones de CO₂ superiores a 20 kPa podrían inducir mecanismos fermentativos, causando detrimento de la calidad del producto. A lo largo del tiempo hubo una acumulación excesiva de CO₂ ($40,4 \pm 1,6$ kPa al día 9) y un agotamiento de O₂ (0,5 kPa al día 9) lo que hace a este material inviable para su aplicación en el envasado de brócoli en estas condiciones (sin perforar y a 4°C).

Las muestras PP_mp mostraron una modificación leve de la atmósfera ($p < 0,05$), con concentraciones de equilibrio significativamente superiores de O₂ ($17,5 \pm 0,7$ kPa) e inferiores de CO₂ ($3,6 \pm 0,8$ kPa) respecto al film NatureFlex. La evolución observada coincide con los resultados obtenidos para floretes envasados en BOPP-CAD45 de las secciones 6.2 y 6.3.

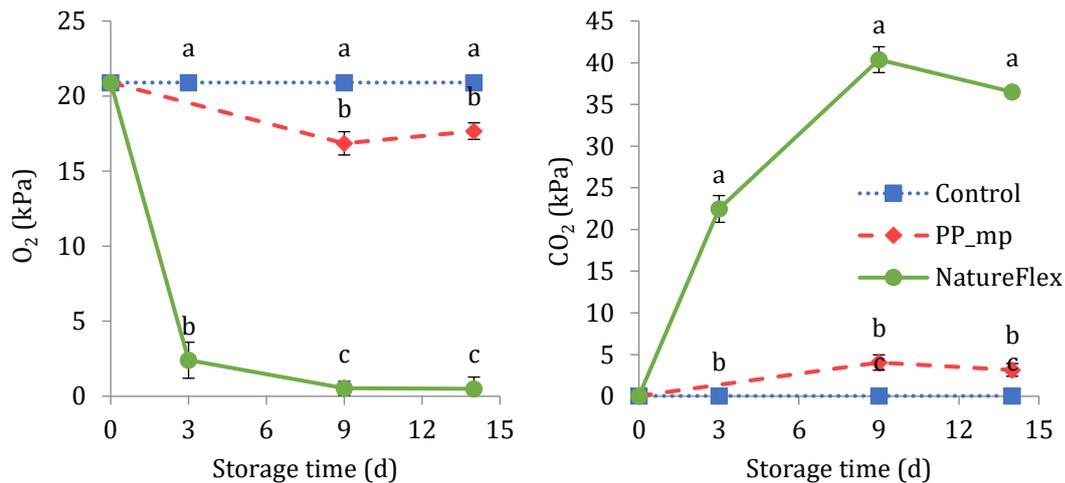


Figura 7. 9. Evolución de la composición gaseosa del espacio cabeza de floretes de brócoli almacenados a 4°C en diferentes sistemas de envasado: Control \cdots \blacksquare \cdots , PP_mp $-$ \blacklozenge $-$, NatureFlex $-$ \bullet $-$. Las barras verticales representan la desviación estándar (n = 3). Letras distintas implican que existen diferencias significativas (p < 0,05) entre sistemas de envasado dentro del mismo día de almacenamiento.

7.2.2.2. Pérdida de masa (ML)

El film de envasado tuvo un efecto significativo en la evolución de la ML a lo largo del almacenamiento (**Figura 7. 10 - A**). Los floretes envasados en NatureFlex presentaron una marcada ML, significativamente superior a la de los floretes envasados en PP_mp e incluso a la de los floretes Control (0,0001 < p). Este resultado llama la atención, debido a que el film de celulosa ofreció menor barrera al vapor de agua que el film macro perforado. **En la Figura 7. 10 - B** se muestra la evolución de la humedad relativa (RH) en los distintos sistemas de envasado. Se puede observar el comportamiento particular del sistema NatureFlex, donde la RH disminuye durante los primeros días de almacenamiento y luego (a partir del día 8) comienza a aumentar paulatinamente, pero siempre se mantiene en valores inferiores respecto a los sistemas Control y PP_mp. Este comportamiento permite inferir que existe una interacción entre el film de celulosa y las moléculas de agua en la atmosfera circundante. Estudios recientes explican que la presencia de grupos polares y sitios activos en los films a base de polisacáridos conducen a una interacción constante con la humedad ambiental, ganando o perdiendo moléculas de agua hasta alcanzar la humedad de equilibrio (Cazón et al., 2020). Esta

interacción provoca cambios en la estructura que pueden modificar significativamente las propiedades de difusión de las moléculas de agua a través de estos films (Cazón et al., 2020). Según la literatura, las moléculas de agua adsorbidas incrementan la movilidad, flexibilidad y el volumen libre de la matriz celulósica, aumentando la permeabilidad al vapor de agua (WVP) (Y. Liu et al., 2021b). Es decir que, además de que inicialmente el film de celulosa presenta mayor WVP respecto a un film convencional, su WVP se incrementa al incrementarse la RH del ambiente. Esto explica la evolución observada de la RH dentro del envase, y la marcada ML de los floretes envasados en NatureFlex. Este fenómeno podría afectar significativamente la calidad del producto y también su rentabilidad económica. Al día 9 de almacenamiento, las muestras NatureFlex presentaron una ML del 7,6% (más de tres puntos porcentuales por encima de las muestras Control) que excedería el valor máximo admisible para su comercialización.

Estos resultados coinciden con lo reportado por otros autores que han evaluado la aplicación de films a base de celulosa en productos frescos. Por ejemplo, Belay et al. (2018) reportaron una mayor ML en granada envasada en NatureFlex™ (3,8%) respecto a las envasadas en BOPP (0,7%). Ierna et al. (2017) envasaron papas IV gama en films de NatureFlex™ y PE, reportando ML de 6,4% y 0,4% en 9 días, respectivamente. Caleb et al., (2016) utilizaron films de BOPP con ventanas de celulosa para el envasado de brócoli y también observaron una ML significativamente superior respecto a brócolis envasados en films convencionales.

Por lo tanto, la alta permeabilidad al vapor de agua y la interacción con la RH del film NatureFlex™ podría ser una limitante para su aplicación en productos de alta tasa de transpiración como el brócoli. A continuación, se evaluará el impacto de este nivel de pérdida de masa sobre otros parámetros de calidad del brócoli.

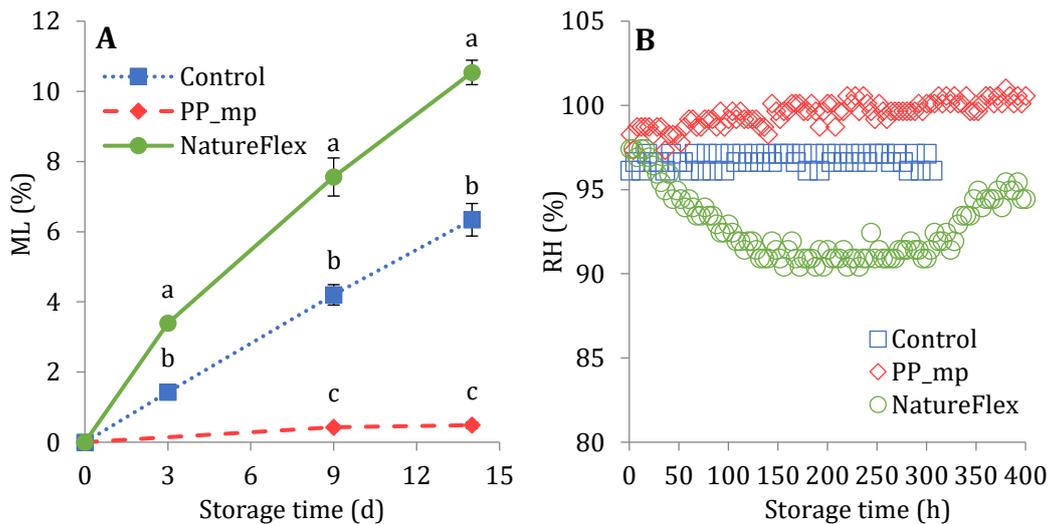


Figura 7. 10. A: Pérdida de masa de floretes de brócoli almacenados a 4°C en diferentes sistemas de envasado: Control $\cdots\blacksquare\cdots$, PP_mp $- \blacklozenge -$, NatureFlex $\text{---}\bullet\text{---}$. Las barras verticales representan la desviación estándar (n = 3). Letras distintas implica que existen diferencias significativas ($p < 0,05$) entre sistemas de envasado dentro del mismo día de almacenamiento. **B:** Evolución de la humedad relativa dentro del envase en floretes de brócolis envasados en diferentes films y almacenados a 4°C.

7.2.2.3. Textura

El tipo de envase tuvo un efecto significativo en la dureza del tallo de floretes de brócoli durante el almacenamiento (**Figura 7. 11**). Con un comportamiento semejante al observado en secciones anteriores (6.1 y 6.3), la dureza del tallo se incrementó en floretes control (al día 14) y se mantuvo sin cambios en las muestras PP_mp. Por otro lado, los floretes en NatureFlex presentaron una pérdida significativa de la dureza del tallo durante el almacenamiento. Como se explicó en otras secciones, en general se observa un incremento de la dureza del tallo (como fuerza de corte o penetración) durante el almacenamiento refrigerado. Esto está asociado a la pérdida de agua en las células y a procesos de lignificación. Sin embargo, las muestras NatureFlex presentaron la mayor pérdida de masa y un marcado descenso de la dureza (12% y 38% para los días 9 y 14 respectivamente). Este comportamiento podría deberse al desarrollo de procesos fermentativos en el tejido (producto de la baja concentración de O_2 en la atmósfera) que podrían generar una concentración excesiva de etanol endógeno dañando la estructura del tejido y degradando los floretes (Techavuthiporn et al., 2021). Por lo tanto, el film de

NatureFlex no mostró ser una buena alternativa al film convencional para mantener la textura de floretes de brócoli.

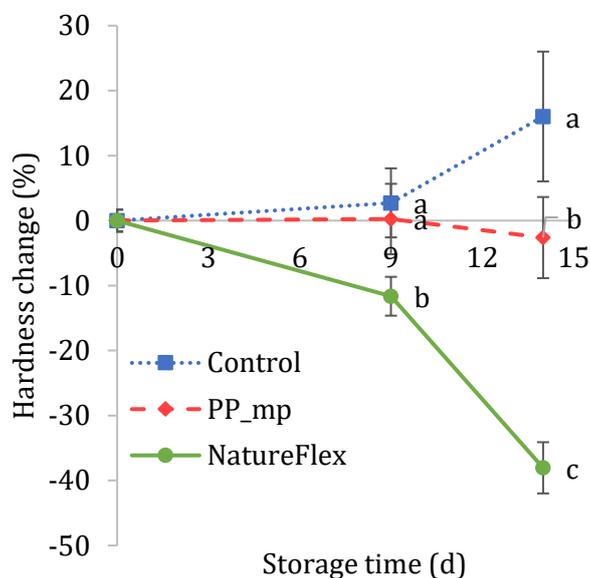


Figura 7. 11. Cambio en la dureza, evaluada como dureza del tallo, durante el almacenamiento a 4°C de floretes de brócoli en distintos sistemas de envasado: Control $\cdots\blacksquare\cdots$, PP_mp $- \blacklozenge -$, NatureFlex $- \bullet -$. Las barras verticales representan la desviación estándar ($n = 3$). Letras distintas implica que existen diferencias significativas ($p < 0,05$) entre sistemas de envasado dentro del mismo día de almacenamiento.

7.2.2.4. Color

El tipo de envase tuvo efecto significativo en la evolución del color de los floretes (**Figura 7. 12**). Como se observó en experiencias anteriores, floretes expuestos al aire mostraron un aumento de L^* , C^*_{ab} y descenso h_{ab} ($p < 0,001$), indicando deterioro significativo del color y confirmando la importancia de la tecnología MAP en la preservación de la calidad (**Figura 7. 12, A y B**). El PP_mp permitió conservar el color, no existiendo diferencias significativas en ninguno de los parámetros de color entre floretes recién cosechados y almacenados durante 14 días. Floretes envasados en NatureFlex presentaron un comportamiento particular. No se observó degradación del color verde, sino que se observó un oscurecimiento durante el almacenamiento. L^* disminuyó y h_{ab} aumentó significativamente. Este comportamiento podría estar asociado al desarrollo del metabolismo fermentativo.

Techavuthiporn et al. (2021) observaron oscurecimiento de floretes de brócoli expuestos a condiciones de anoxia y explicaron que las bajas concentraciones de O_2 o la acumulación de etanol en el tejido podría enlentecer los procesos en cloroplastos y cromoplastos, y preservar la membrana tilacoidal haciendo que la clorofila no se metabolice normalmente. Además, una exposición prolongada del producto a condiciones de anoxia, provocaría acumulación excesiva de etanol endógeno generando lesiones en el tejido de color verde oscuro.

En el presente estudio no se observaron síntomas de lesiones tisulares, pero si se observó un detrimento sensorial vinculado a la pérdida de firmeza y al desarrollo de olores no característicos.

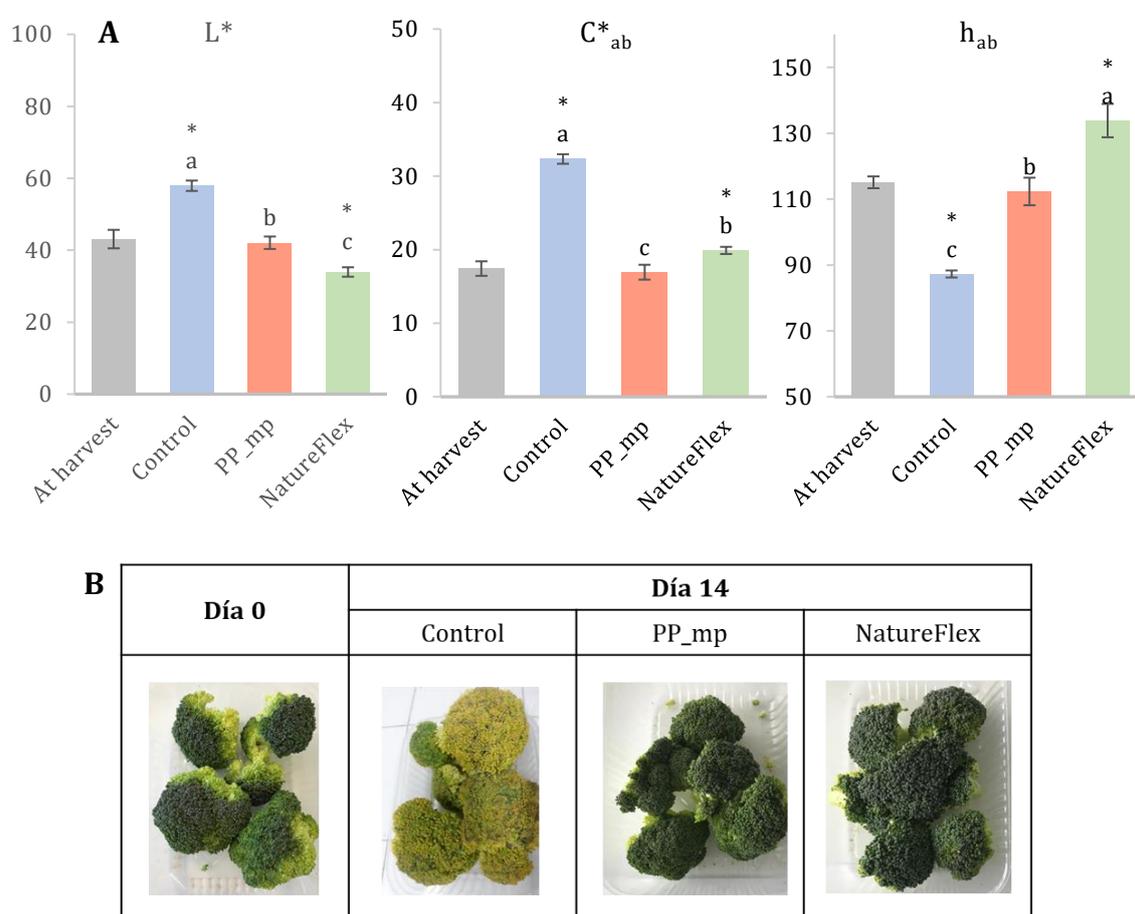


Figura 7. 12. A) Parámetros colorimétricos (L^* , C^*_{ab} , h_{ab}) de floretes de brócoli el día de la cosecha (“At harvest”) y último día de muestreo: día 14 para floretes almacenados a 4°C en distintos sistemas de envasado. Las barras verticales representan la desviación estándar ($n=3$). Letras distintas indican que existen diferencias significativas entre distintos sistemas de envasado (Control, PP_mp y NatureFlex) según el Test de Tukey ($p < 0,05$). “*” indican que existen diferencias

significativas entre muestras envasadas en diferentes films y el producto el día de la cosecha según el Test de Dunnett ($\alpha = 0,05$). **B)** Registro fotográfico de la apariencia externa de floretes de brócoli envasados en distintos films y almacenados durante 14 días a 4°C.

7.2.2.5. Evaluación sensorial

Todas las muestras presentaron un detrimento de la calidad sensorial con el tiempo, existiendo diferencias significativas en función del sistema de envasado (**Figura 7. 13**). Floretes PP_mp fueron los que preservaron en mayor medida los atributos evaluados, presentando valores por encima del límite de comercialización hasta el final del almacenamiento. Floretes Control mostraron una rápida y significativa disminución del puntaje de color, coincidiendo con lo observado en los resultados del color instrumental (**Figura 7. 12 - A**) y registros fotográficos (**Figura 7. 12 - B**). Por lo tanto, la apariencia general también disminuyó significativamente, y al día 9 de almacenamiento mostraron valores por debajo del límite de comercialización. Floretes envasados en NatureFlex no mostraron diferencias significativas en el color respecto a floretes PP_mp. Sin embargo, mostraron un marcado descenso en el puntaje de olor característico, donde al día 9 presentaron el mínimo puntaje de la escala. En consecuencia, la apariencia externa también disminuyó hasta el puntaje mínimo. Por lo tanto, se puede inferir que las condiciones gaseosas establecidas dentro del envase NatureFlex propiciaron el desarrollo del metabolismo fermentativo, produciendo sustancias volátiles que generaron olores extraños y desagradables, reduciendo la vida útil de los floretes de brócoli. Mastrandrea et al. (2017) también observaron un incremento de olores desagradables durante el almacenamiento (a 5 y 15°C) de hojas de rúcula envasadas en films con baja permeabilidad al O₂ (concentraciones de equilibrio menores a 5 kPa), atributo que limitó la vida útil del producto y la redujo respecto al producto almacenada sin modificación de la atmósfera.

Los compuestos azufrados (principalmente sulfuro de dimetilo y disulfuro de dimetilo) son los principales volátiles generados durante el almacenamiento del brócoli y su producción se ve incrementada en condiciones de anoxia y/o elevadas temperaturas de almacenamiento. Presentan un fuerte olor desagradable y su presencia en concentraciones elevadas se asocia a productos deteriorados

(Mastrandrea et al., 2017). Los volátiles que contienen azufre pueden ser sintetizados o productos de degradación de compuestos azufrados como los glucosinolatos (Caleb et al., 2016; G. Yuan et al., 2010). Se producen por deterioro de las membranas lipídicas, así como por pérdida de compartimentación intracelular, lo que promueve reacciones enzimáticas de degradación. Esta explicación coincide con los resultados de este estudio, donde floretes envasados en NatureFlex mostraron una pérdida significativa de masa, firmeza (variables vinculadas a la integridad de las membranas celulares) y glucosinolatos totales (como se ve en 7.2.2.6). Además, las condiciones de anoxia son propicias para el crecimiento de bacterias ácido-lácticas, capaces de utilizar compuestos azufrados como fuente de energía y producir volátiles que contribuyen a la generación de malos olores (Palani et al., 2016).

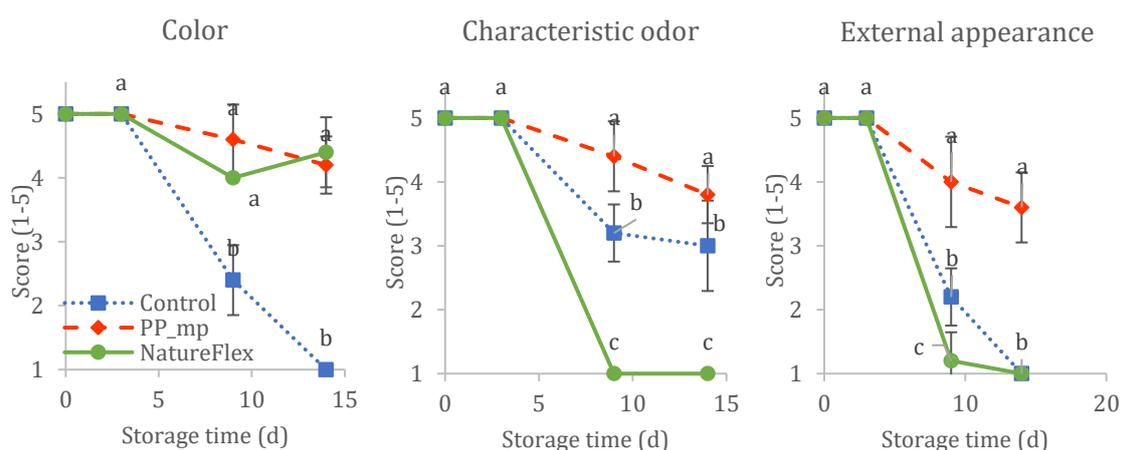


Figura 7. 13. Evolución de atributos sensoriales durante el almacenamiento a 4°C de floretes de brócoli en distintos sistemas de envasado: Control $\cdots\blacksquare\cdots$, PP_mp $-\blacklozenge-$, NatureFlex $\text{---}\bullet\text{---}$. Las barras verticales representan la desviación estándar ($n = 3$). Letras distintas implica que existen diferencias significativas ($p < 0,05$) entre sistemas de envasado dentro del mismo día de almacenamiento.

7.2.2.6. Contenido de glucosinolatos (GSL)

El contenido total de GSL en los floretes fue de $26,4 \pm 0,5 \mu\text{mol g}^{-1}$ y se identificaron cuatro GSL; uno alifático: glucorafanina (GRA) y 3 indólicos: neoglucobrasicina (NGB) (GSL predominante con 71% del total), glucobrasicina (GB) y metoxiglucobrasicina (MGB) (en concentraciones bajas, representando menos de un

1% del total). Esta caracterización coincide con las obtenidas en ensayos anteriores con el cultivar Legacy (secciones 6.1 y 6.3).

El material de envasado tuvo un efecto significativo en la evolución del contenido de GSL durante el almacenamiento de los floretes (**Figura 7. 14, A**). Las muestras Control y PP_mp presentaron una evolución semejante a las ya observadas (secciones 6.2 y 6.3). La modificación de la atmósfera permitió conservar el contenido de GSL totales en los floretes, mientras que los expuestos al aire mostraron una pérdida significativa en el tiempo (27% a los 14 días). Un comportamiento similar se observó para los GSL individuales (**Figura 7. 14, B-D**). El envasado en NatureFlex no logró preservar el contenido de GSL y, contrariamente, presentó la mayor pérdida de GSL totales (66%) e individuales (71%, 92% y 60% para GRA, GB y NGB respectivamente). La pronunciada pérdida de GSL en los floretes envasados en NatureFlex se atribuye al desarrollo del metabolismo fermentativo. Se ha visto que los GSL son afectados significativamente durante estos procesos. Por ejemplo, se han reportado pérdidas de 90% y 100% en 5 y 7 días respectivamente, para repollo blanco en condiciones de anoxia. Además, se observó disminución en el contenido de GB y aumento de indol-3-carbinol (el isotiocianato derivado) (Palanini et al., 2016). Makino et al. (2018) reportaron degradación de GSL y aumento de sulforafano (isotiocianato derivado de la GRA) en floretes de brócoli expuestos a anoxia combinado con elevadas concentraciones de CO₂. Palani et al. (2016) concluyeron que la degradación de GSL en condiciones de baja concentración de O₂ se debe al efecto combinado de degradación enzimática y degradación microbiana, ya que los microorganismos que proliferan en estas condiciones gaseosas (como las bacterias ácido-lácticas) son capaces de degradar GSL y usarlos como fuente de energía. En la **Figura 7. 15** se muestran cromatogramas donde se pueden ver los picos correspondientes a los GSL individuales y la degradación de estos compuestos en muestras envasadas en NatureFlex respecto a las muestras recién cosechadas.

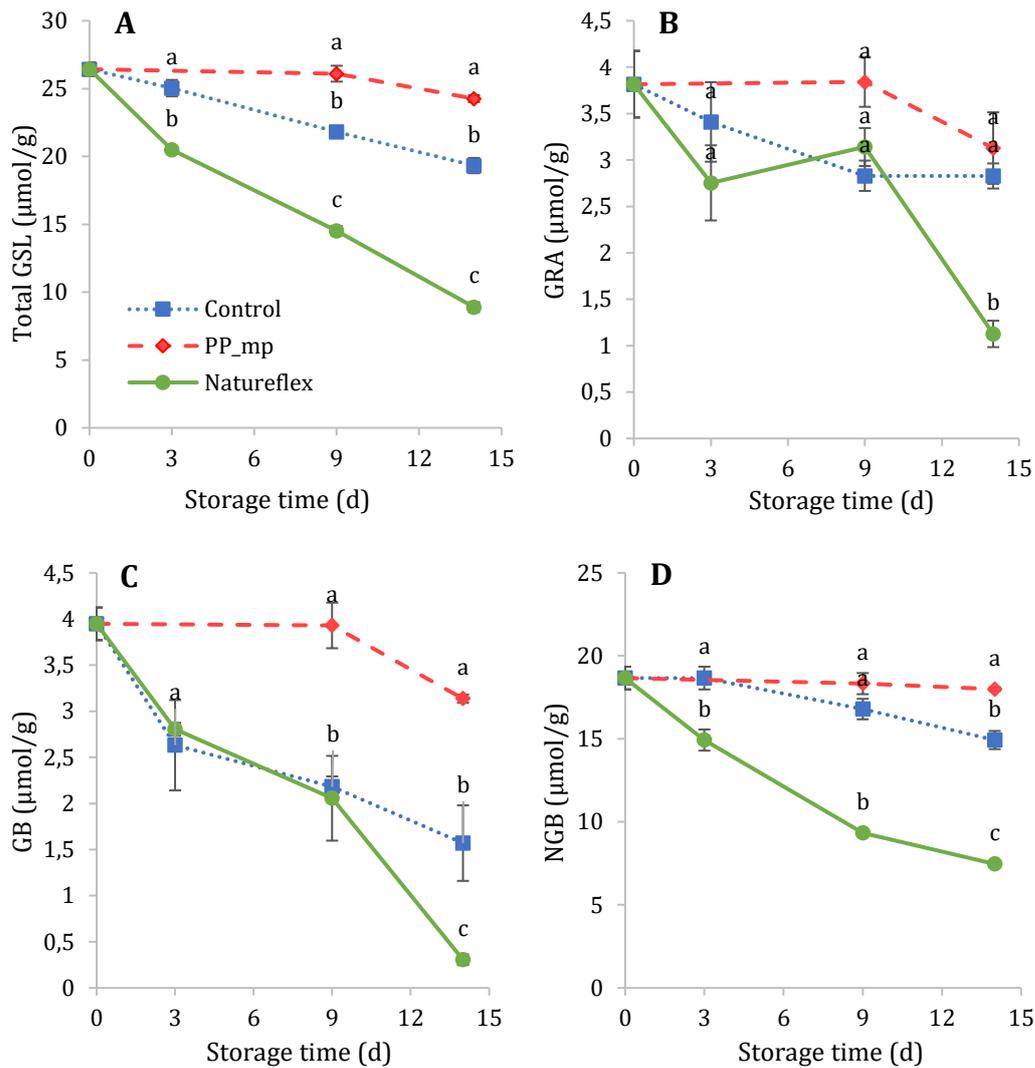


Figura 7. 14. Evolución del contenido total de glucosionlatos (A), glucorafanina (B), glucobrassicina (C) y neoglucobrassicina (D) durante el almacenamiento a 4°C de floretes de brócoli en distintos sistemas de envasado: Control $\cdots\blacksquare\cdots$, PP_mp $- \blacklozenge -$, NatureFlex $- \bullet -$. Las barras verticales representan la desviación estándar (n = 3). Letras distintas implica que existen diferencias significativas ($p < 0,05$) entre sistemas de envasado dentro del mismo día de almacenamiento.

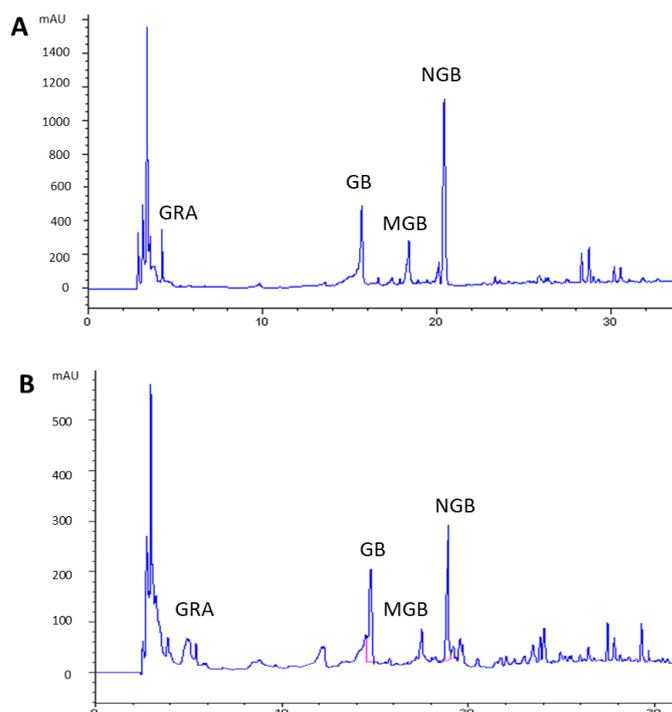


Figura 7. 15. Cromatogramas a 227 nm de muestras de brócoli: A) recién cosechado, B) envasado en NatureFlex y almacenado durante 14 días a 4°C.

7.2.2.7. Ácidos hidroxicinámicos (HCA)

Floretes en PP_mp conservaron el contenido de HCA durante el almacenamiento, mientras que las muestras Control presentaron un descenso leve pero significativo (**Figura 7. 16**). Resultados semejantes se obtuvieron en la sección 6.3, confirmando la importancia del MAP en la retención de estos compuestos bioactivos. Sin embargo, floretes envasados en NatureFlex mostraron una pérdida total de HCA al final del almacenamiento. Por lo tanto, se infiere que los procesos fermentativos (generados por concentraciones de O₂ extremadamente bajas) producen una importante degradación de estos compuestos en el brócoli. La degradación de compuestos fenólicos ha sido reportada en procesos de fermentación en repollo (Harbaum et al., 2007). En la **Figura 7. 17** se muestra un ejemplo de cromatograma a 320 nm de una muestra de brócoli recién cosechado y de una envasada en NatureFlex y almacenada durante 14 días a 4°C. En la misma se puede observar la degradación de componentes sufrida durante el almacenamiento en las condiciones mencionadas.

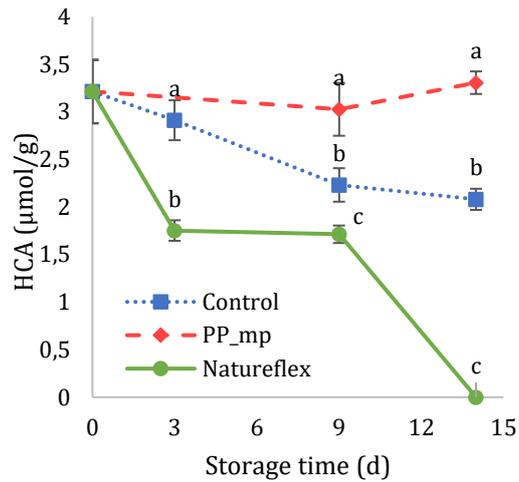


Figura 7. 16. Evolución del contenido de ácidos hidroxicinámicos durante el almacenamiento a 4°C de floretes de brócoli en distintos sistemas de envasado: Control $\cdots\blacksquare\cdots$, PP_mp $- \blacklozenge -$, NatureFlex $- \bullet -$. Las barras verticales representan la desviación estándar ($n = 3$). Letras distintas implica que existen diferencias significativas ($p < 0,05$) entre sistemas de envasado dentro del mismo día de almacenamiento.

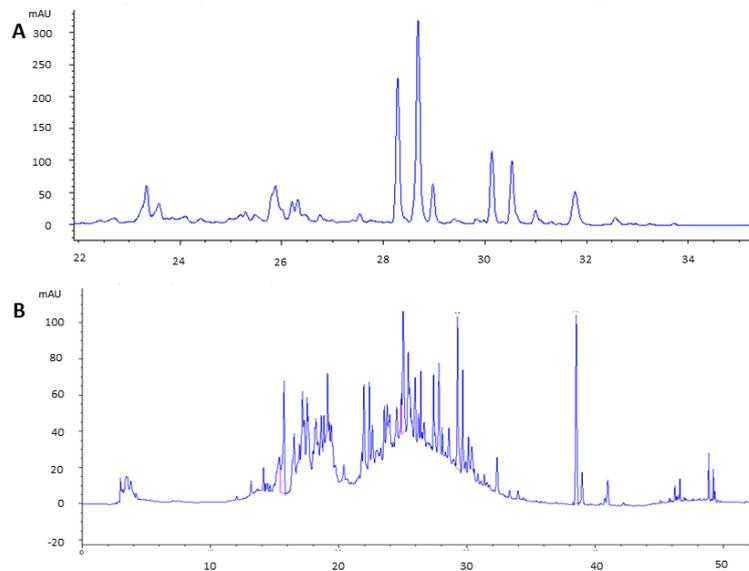


Figura 7. 17. Cromatogramas a 320 nm de muestras de brócoli: A) recién cosechado, B) envasado en NatureFlex y almacenado durante 14 días a 4°C.

7.2.3. Conclusiones parciales

Se evaluó la idoneidad de un film a base de celulosa (NatureFlex™) para su aplicación en el envasado de brócoli. El film NatureFlex resultó inadecuado para el envasado de brócoli en las condiciones de estudio. El producto presentó una alta pérdida de masa y las concentraciones de O₂ y CO₂ establecidas desencadenaron procesos fermentativos indeseables, acompañados con pérdida de textura, desarrollo de malos olores y pérdida de compuestos bioactivos.

Los resultados demostraron que condiciones de envasado inadecuadas pueden disminuir significativamente la calidad y vida útil de floretes de brócoli, incluso en comparación con el almacenamiento sin modificación de la atmósfera.

Dadas las limitantes identificadas para la aplicación del film de celulosa, en la siguiente sección se considerará la realización de perforaciones para aumentar la permeabilidad y obtener mejores resultados en la conservación de floretes de brócoli.

7.3. Film de celulosa perforado para el envasado de floretes de brócoli: Efecto del incremento de la temperatura de almacenamiento sobre el contenido de fitoquímicos y vida útil

7.3.1. Diseño experimental

Cabezas de brócoli (cv. Legacy) se obtuvieron y procesaron como se describe en Materiales y Métodos (4.1). Los floretes se dividieron al azar en 3 grupos homogéneos, uno por cada sistema de envasado:

- **Control:** Sin modificación de la atmósfera (ídem 7.2.1)
- **PP_mp:** Bolsas de BOPP microperforadas (ídem 7.2.1)
- **NatureFlex_p:** Bolsas a base de celulosa (ídem 7.2.1), a las cuales se les realizó una perforación mecánica con una aguja hipodérmica de 0,6 mm de diámetro.

Aproximadamente 105 ± 3 g de floretes de broccoli se colocaron dentro de las bolsas y se termosellaron. Después del envasado, cada grupo (Control, PP_mp y NatureFlex_p) se subdividió en dos grupos:

- Almacenamiento a 4°C (temperatura recomendada)
- Almacenamiento a 4°C y posterior aumento a 15°C durante los dos días previos al muestreo (simulando condiciones de abuso de temperatura en la cadena de suministro)

Las muestras se almacenaron durante 21 días. Cada bolsa constituyó una unidad experimental. En tiempos de almacenamiento preseleccionados (0, 7, 14 y 21 días), se muestrearon para su análisis 5 unidades experimentales de cada condición. Durante el almacenamiento se determinó: las concentraciones de O₂ y CO₂ en el espacio cabeza, pérdida de masa, color, textura (dureza del tallo y compacidad del florete), apariencia externa, contenido de glucosinolatos y ácidos hidroxicinámicos y recuento de microorganismos aerobios, mohos y levaduras. En la **Figura 7. 18** se muestra un esquema del diseño experimental.

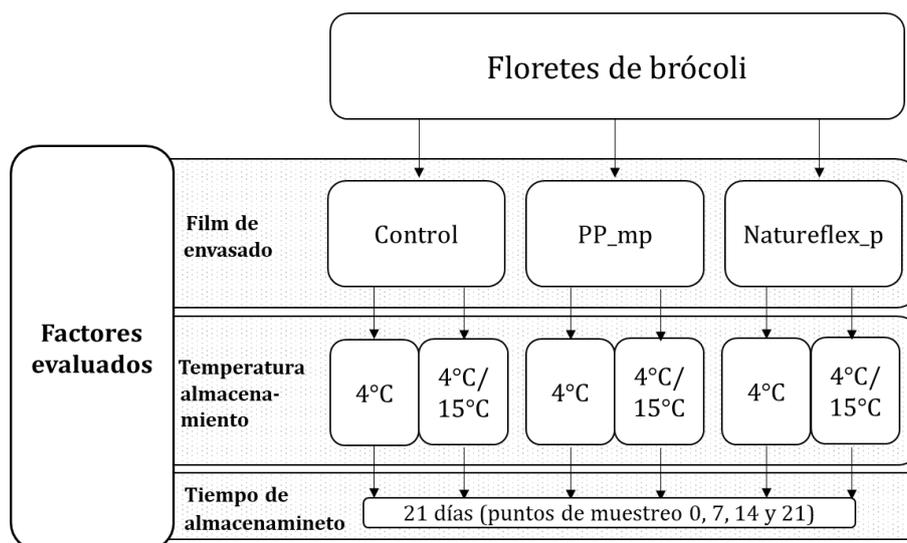


Figura 7. 18. Esquema del diseño experimental para evaluar el efecto del film de envasado y temperatura de almacenamiento en la calidad externa y compuestos bioactivos de floretes de brócoli (cv. Legacy) envasados en atmósfera modificada pasiva.

7.3.2. Resultados y discusión

7.3.2.1. Composición del espacio cabeza

La composición del espacio cabeza mostró la evolución habitual, con descenso significativo de la concentración de O_2 y aumento de la de CO_2 para los floretes MAP. El film NatureFlex perforado mostró concentraciones de equilibrio de O_2 menores y de CO_2 mayores respecto a los floretes envasados en PP_mp (**Figura 7. 19**). Las diferencias de composición entre los dos sistemas de envasado fueron significativas a $4^\circ C$, mientras que en el aumento a $15^\circ C$ no hubo diferencias significativas. Esto puede deberse a que la permeabilidad de los films presenta diferente dependencia con la temperatura y con la humedad relativa (RH) (Macedo et al., 2013). La permeabilidad a los gases del BOPP es independiente de la RH, mientras que la permeabilidad de los films de celulosa se incrementa significativamente con la RH, debido a que la adsorción de moléculas de agua incrementa el volumen libre interfibrilar proporcionando mayor espacio para la migración de moléculas (Cazón et al., 2020; Y. Liu et al., 2021b; Okugawa et al., 2023; Reishofer et al., 2022). Este fenómeno podría explicar porque a mayores temperaturas (donde la tasa de

transpiración es mayor) no existen diferencias estadísticas en la evolución de O₂ y CO₂ dentro de los envases.

En las condiciones del estudio, el film NatureFlex perforado permitió alcanzar composiciones atmosféricas cercanas a las recomendadas para este producto (Jones et al., 2006). Como es esperado, el incremento de temperatura generó menores concentraciones de O₂ y mayores de CO₂ respecto a floretes conservados a 4°C, pero en ningún caso se generaron condiciones o riesgo de anoxia.

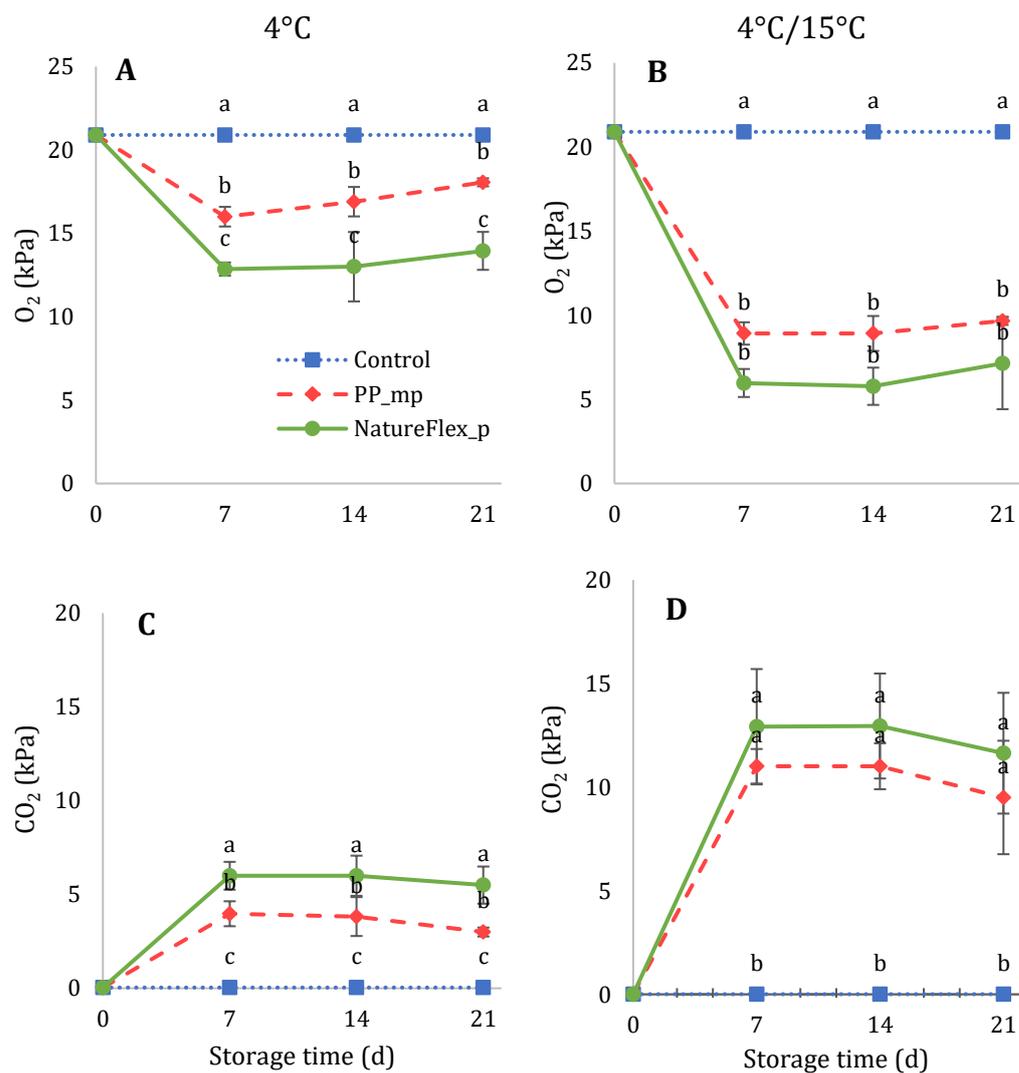


Figura 7. 19. Evolución de la composición gaseosa del especio cabeza en floretes de brócoli envasados en diferentes films (Control $\cdots\blacksquare\cdots$, PP_mp $- \blacklozenge -$, NatureFlex_p $\text{---}\bullet\text{---}$) a lo largo del almacenamiento a 4°C (A y C) y a 4°C/15°C (B y D). Las barras verticales representan la desviación estándar (n = 5). Letras distintas implica que existen diferencias significativas (p < 0,05) entre sistemas de envasado dentro del mismo día de almacenamiento.

7.3.2.2. Pérdida de masa (ML)

Al igual que se observó en la sección 7.2, los floretes envasados en NatureFlex presentaron la mayor ML a lo largo del almacenamiento (**Figura 7. 20**). Al día 7 de almacenamiento, la ML fue superior al 6% lo que podría limitar su vida útil. El aumento de temperatura tuvo un impacto significativo en la ML en muestras NatureFlex_p y Control, que se incrementó al aumentar la temperatura.

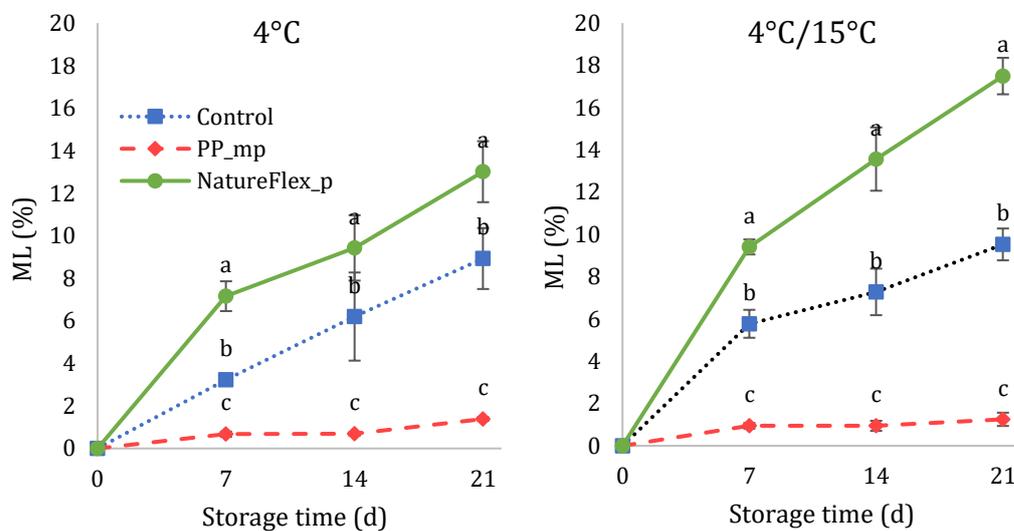


Figura 7. 20. Pérdida de masa de floretes de brócoli almacenados a 4°C y a 4°C/15°C en diferentes sistemas de envasado: Control $\cdots\blacksquare\cdots$, PP_mp $- \blacklozenge -$, NatureFlex_p $- \bullet -$. Las barras verticales representan la desviación estándar ($n = 5$). Letras distintas implica que existen diferencias significativas ($p < 0,05$) entre sistemas de envasado dentro del mismo día de almacenamiento.

Para los sistemas de envasado NatureFlex_p y PP_mp se cuantificó el agua perdida a través del film (mediante cuantificación de la masa total del sistema: floretes + film) y la masa de agua condensada sobre el film (mediante la diferencia entre la masa total perdida por el sistema y la masa perdida por los floretes) (**Figura 7. 21 - A**). Como resultado se obtuvo que, el sistema PP_mp no presentó pérdida significativa de masa, por lo tanto, el agua perdida por los floretes condensó en el envase prácticamente en un 100%. Contrariamente, el sistema NatureFlex_p presentó una pérdida significativa de masa, siendo mayor la masa de agua pérdida a través del

film que la masa de agua condensada en el mismo. Estos resultados se corresponden con la mayor permeabilidad al vapor de agua que presenta el film NatureFlex respecto al film de BOPP (Macedo et al., 2013). Además, para el caso de NatureFlex se observó que un incremento de la temperatura aumentó la proporción de agua perdida a través del film respecto al agua condensada. Esto podría indicar que la permeabilidad al vapor de agua de NatureFlex aumentó al aumentar la temperatura de almacenamiento. En el sistema PP_mp no se observó efecto de la temperatura en la ML total del sistema ni de los floretes de brócoli. Macedo et al. (2013) determinaron la permeabilidad de films NatureFlex y BOPP a diferentes niveles de temperatura y RH. Reportaron que la permeabilidad al vapor de agua de NatureFlex es entre 2 y 4 veces mayor que la del BOPP, y que NatureFlex presenta mayor incremento de la permeabilidad con la temperatura que el BOPP. Los resultados obtenidos en este ensayo concuerdan con lo reportado en la literatura. En la **Figura 7. 21 - B** se muestran floretes de brócoli envasados en los sistemas PP_mp y Natureflex_p donde en el primero se puede observar mayor condensación de agua que en el segundo. En consecuencia, la mayor permeabilidad de NatureFlex presenta como ventaja una menor condensación dentro del envase, evitando el crecimiento de hongos y detrimento prematuro del producto. Como desventaja, la pronunciada pérdida de masa podría afectar la calidad de los floretes y acortar su vida útil.

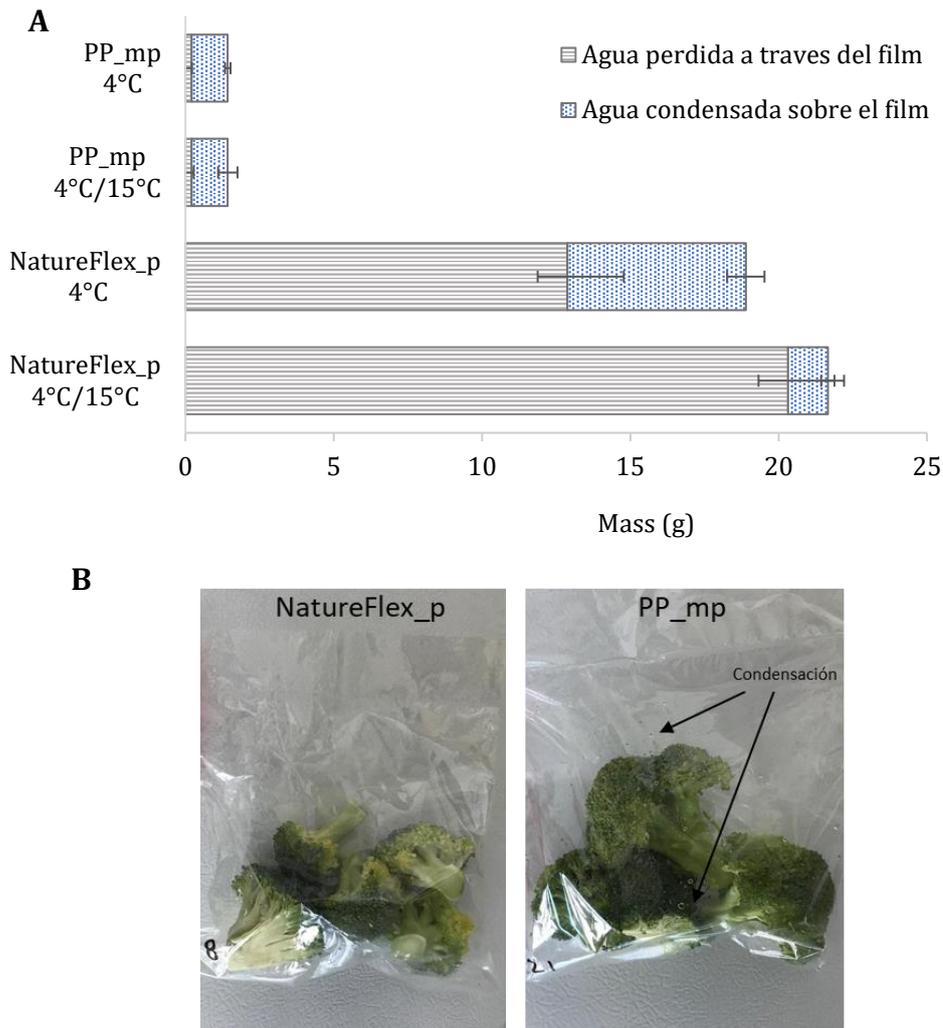


Figura 7. 21. A) Distribución de la pérdida de masa en los sistemas de envasado PP_mp y NatureFlex_p: vapor de agua condensado dentro del envase (■) y transmitido a través del film hacia el exterior (▨), después de 21 días almacenamiento a 4°C y 4°/15°C. Se representan los valores medios (n = 5) y las barras horizontales representan la desviación estándar. **B)** Brócolis envasados en films NatureFlex perforado (NatureFlex_p) y BOPP microperforado (PP_mp) y almacenados 21 días a 4°C.

7.3.2.3. Tasa respiratoria (RRO_2)

Se determinó la RRO_2 el día de la cosecha y luego de 21 días de almacenamiento, encontrándose un efecto significativo tanto de la temperatura como del sistema de envasado. A 4°C, floretes Control y PP_mp no presentaron diferencias en la RRO_2 respecto al producto recién cosechado. Sin embargo, floretes NatureFlex_p presentaron un incremento respecto al día de la cosecha, y la RRO_2 fue significativamente mayor en comparación a la de los floretes Control y PP_mp

(Figura 7. 22). Dado que los floretes envasados en NatureFlex presentaron la menor concentración de O_2 , podría esperarse una menor tasa respiratoria. Sin embargo, por las condiciones en que se realiza la medida, la misma brinda información del estado fisiológico del vegetal, y una mayor tasa respiratoria podría indicar un mayor nivel de estrés en el tejido. Teniendo en cuenta la importante pérdida de masa experimentada en esta condición, es probable que el estrés y baja RH tengan el efecto de incrementar la tasa respiratoria explicando estos resultados (Guevara et al., 2006). En la bibliografía se encuentra ampliamente reportado que el incremento de la temperatura genera un aumento en la RRO_2 de hortalizas, y esto es lo que se observa en los resultados de este estudio. El film de envasado tuvo un efecto semejante en los floretes transferidos a $15^\circ C$, donde las muestras NatureFlex_p presentaron la mayor RRO_2 . En esta condición, se observó una mayor RRO_2 en floretes Control respecto a los PP_mp, permitiendo inferir que el MAP en BOPP microperforado disminuyó la actividad metabólica del tejido respecto a los sin envasar. Dado que esta diferencia no se observó en floretes mantenidos a $4^\circ C$, se podría concluir que el efecto de la atmósfera en los procesos metabólicos resulta más significativo cuando se incrementa la temperatura de almacenamiento, como ha sido observado a lo largo de esta Tesis.

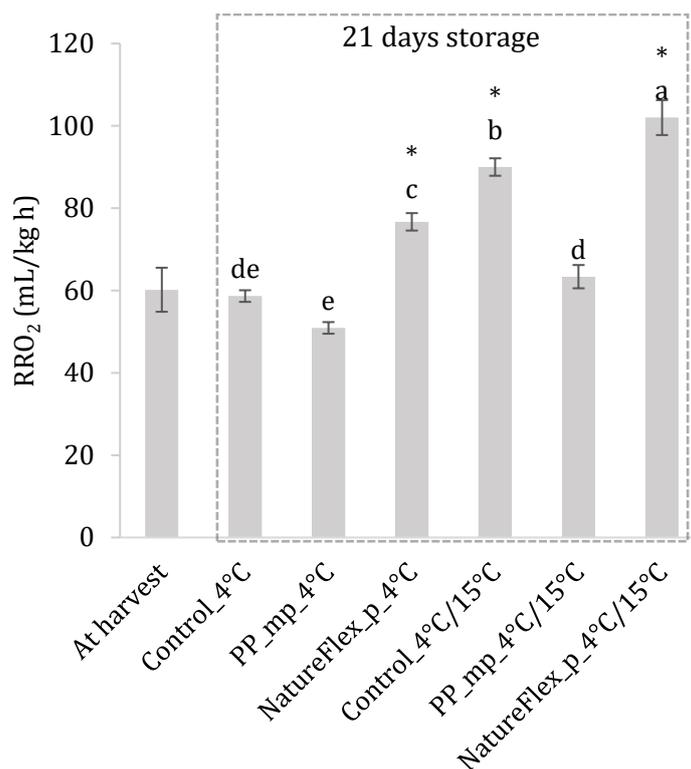


Figura 7. 22. Tasa respiratoria de floretes de brócoli medida en O₂ (mLO₂ kg⁻¹ h⁻¹), el día de la cosecha y al día 21 de almacenamiento a 4°C y a 4°C/15°C en diferentes sistemas de envasado: Control, PP_mp y NatureFlex_p. Los resultados están expresados como el promedio ± la desviación estándar (n = 3). Letras diferentes indican diferencias significativas entre condiciones de temperatura según el test de Tukey (p < 0,05). “*” indican diferencias significativas entre floretes almacenados y floretes recién cosechados (día 0) (Test de Dunnnett, α = 0.05).

7.3.2.4. Textura

Para la firmeza o compacidad (medida como fuerza a la compresión) y dureza en el tallo (medida como fuerza a la penetración) se observaron evoluciones que coinciden con los resultados de las secciones anteriores.

Se observa una disminución significativa de la firmeza a lo largo del almacenamiento en todas las condiciones (p < 0,05), excepto en floretes envasados en PP_mp y almacenados a 4°C donde los valores de firmeza se conservan durante todo el período (**Figura 7. 23**). Respecto al efecto del sistema de envasado en la firmeza, existieron diferencias significativas entre floretes PP_mp y NatureFlex_p, donde floretes PP_mp presentaron mayor firmeza respecto a floretes NatureFlex_p. Floretes Control presentan valores intermedios. La firmeza se correlacionó con la pérdida de masa, como se había observado en 6.2 para floretes y en 7.1 para cabezas,

con valores de correlación de Pearson de -0,974 ($p = 0,002$) y -0,933 ($p = 0,005$) para los sets de datos de 4°C y 4°C/15°C respectivamente.

La dureza en el tallo presentó un incremento a lo largo del tiempo (como ya fue observado en otros casos de estudio). La excepción fueron los floretes MAP almacenados 4°C que preservaron los valores de dureza durante el almacenamiento. Por lo tanto, se destaca que el film NatureFlex perforado permitió conservar la dureza de floretes de brócoli, presentando una evolución similar al sistema PP_mp (a diferencia de los resultados obtenidos con el film NatureFlex sin perforar en la sección anterior). Los floretes Control presentaron el mayor incremento de dureza. Esta variable tendió a estar correlacionada con la concentración de O₂ y CO₂ del espacio cabeza, aunque la correlación no fue estadísticamente significativa ($p > 0,05$). El incremento de dureza podría estar vinculado a procesos de lignificación mediados por enzimas. La composición de O₂ y CO₂ podría afectar la actividad enzimática, y es por esto que el MAP podría mitigar el endurecimiento del tallo respecto a floretes expuestos al aire. Según la bibliografía, el incremento de la dureza también podría estar relacionado con la pérdida de masa (Serrano et al., 2006). En este ensayo no se encontró correlación entre estas variables, resultados que coinciden con los obtenidos en las secciones 6.1 y 6.3, donde se observa cierta correlación positiva, pero sin significancia estadística. Por lo tanto, se concluye que, si bien la pérdida de masa puede contribuir al incremento de dureza, existen otros mecanismos implicados (como ya fue discutido en la sección 6.1).

En síntesis, NaturaFlex no permitió conservar la firmeza ya que esta está fuertemente correlacionada con la pérdida de masa, que en el caso de este film es alta consecuencia de la alta permeabilidad al vapor de agua. Sin embargo, evitó el incremento de dureza del tallo. En secciones siguientes se analizará el impacto de la pérdida de masa y firmeza en otros parámetros de calidad relevantes.

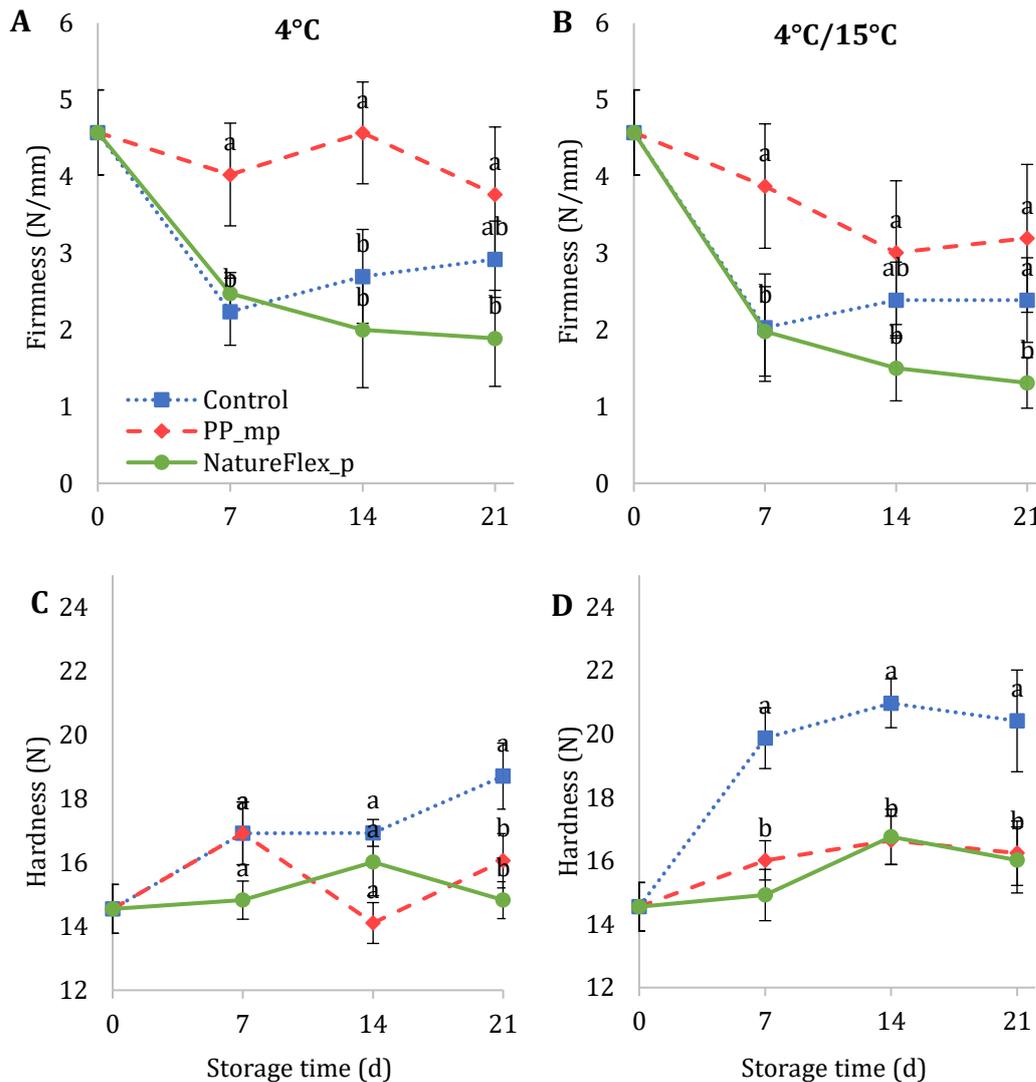


Figura 7. 23. Evolución firmeza (A - B) y dureza en el tallo (C - D) de floretes de brócoli envasados en diferentes sistemas de envasado: Control $\cdots\blacksquare\cdots$, PP_mp $- \blacklozenge -$, NatureFlex_p $\text{---}\bullet\text{---}$ durante el almacenamiento a 4°C y 4°C/15°C. Las barras verticales representan la desviación estándar (n = 5). Letras distintas implica que existen diferencias significativas entre sistemas de envasado dentro del mismo día de almacenamiento según el test de Tukey (p < 0,05).

7.3.2.5. Color

Tanto el film NatureFlex_p como PP_mp permitieron conservar los parámetros de color de floretes de brócoli durante el almacenamiento, sin diferencias significativas entre ellos. h_{ab} fue el único parámetro que presentó una disminución el día 21 (respecto el valor del día 0) en floretes MAP en la condición 4°C/15°C (**Figura 7. 24**). Los parámetros colorimétricos mostraron correlación significativa con la composición de O₂ y CO₂ del espacio cabeza, evidenciando la importancia del MAP

en la conservación de este parámetro de calidad, como ya se fue determinado en estudios anteriores (6.3). Los valores de los coeficientes de Pearson se pueden ver en el Material suplementario (**Figura 7S. 2**). En el registro fotográfico puede observarse el detrimento del color de floretes sin envasar, y la preservación en floretes MAP independiente del film de envasado (**Figura 7. 25**). También se aprecia que el incremento de temperatura tiene un impacto negativo en el color de floretes MAP al final del período de almacenamiento.

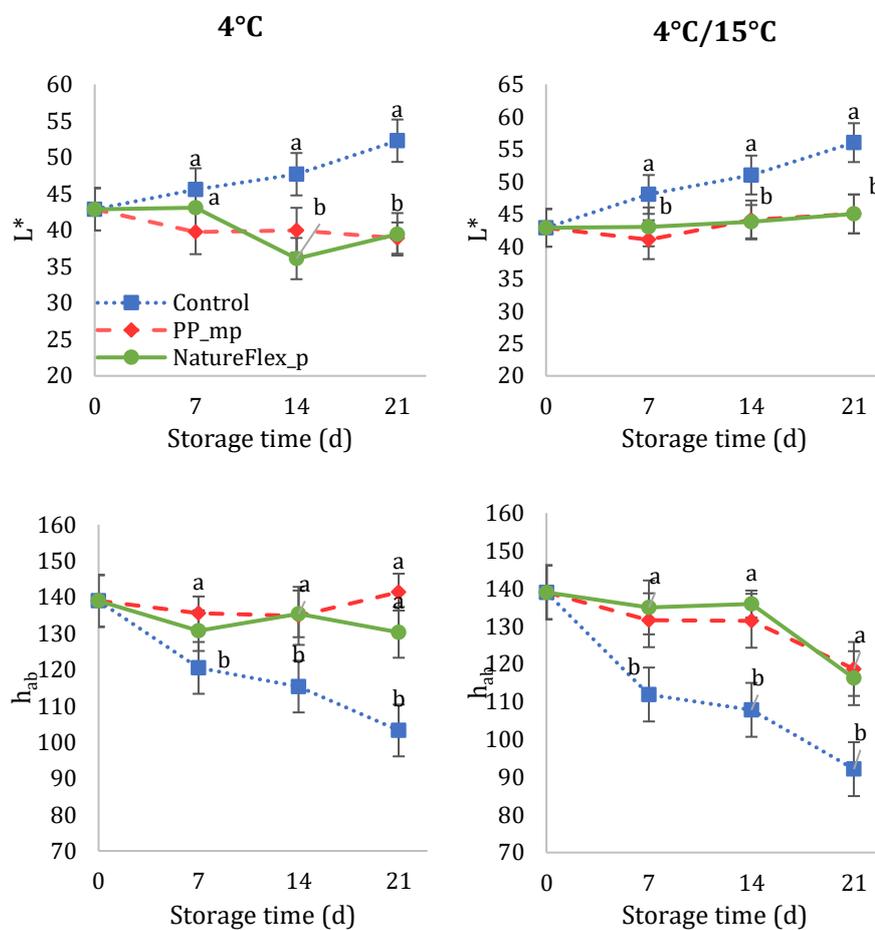


Figura 7. 24. Evolución de los parámetros colorimétricos L^* y h_{ab} de floretes de brócoli envasados en diferentes sistemas de envasado: Control $\cdots\blacksquare\cdots$, PP_mp $- \blacklozenge -$, NatureFlex_p $\text{---}\bullet\text{---}$ durante el almacenamiento a 4°C y $4^\circ\text{C}/15^\circ\text{C}$. Las barras verticales representan la desviación estándar ($n = 5$). Letras distintas implica que existen diferencias significativas entre sistemas de envasado dentro del mismo día de almacenamiento según el test de Tukey ($p < 0,05$).

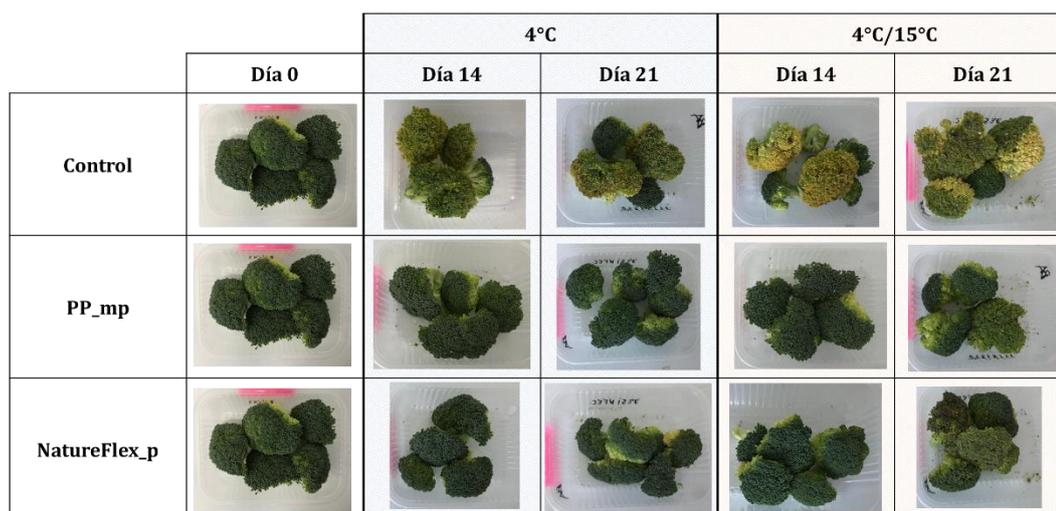


Figura 7. 25. Registro fotográfico de la evolución de la apariencia externa de floretes de brócoli envasados en distintos films y almacenados durante 21 días a 4°C y 4/15°C.

7.3.2.6. Evaluación sensorial

La evolución de los atributos sensoriales presentó la evolución habitual, disminuyendo de forma significativa a lo largo de almacenamiento (**Figura 7. 26**). Floretes Control presentaron un rápido descenso del color (independientemente de la condición de temperatura) y, en consecuencia, de la apariencia externa, con valores por debajo del límite comercial al día 14 de almacenamiento. Floretes MAP, independientemente del film y temperatura, permitieron preservar en mayor medida los atributos sensoriales de los floretes y presentaron valores por encima del límite comercial durante todo el período. No existieron diferencias significativas en ninguno de los atributos sensoriales entre floretes envasados en PP_mp y en NatureFlex_p, por lo que la mayor pérdida de masa y firmeza determinada en las muestras NatureFlex_p no tuvo un impacto significativo en la calidad organoléptica. Los atributos sensoriales se correlacionaron significativamente ($p < 0,05$) con los parámetros de color instrumental (L^* y h_{ab}). También se observó correlación entre atributos sensoriales y composición de O_2 y CO_2 del espacio cabeza, pero no fue estadísticamente significativa ($p > 0,05$) (**Figura 7S. 2**).

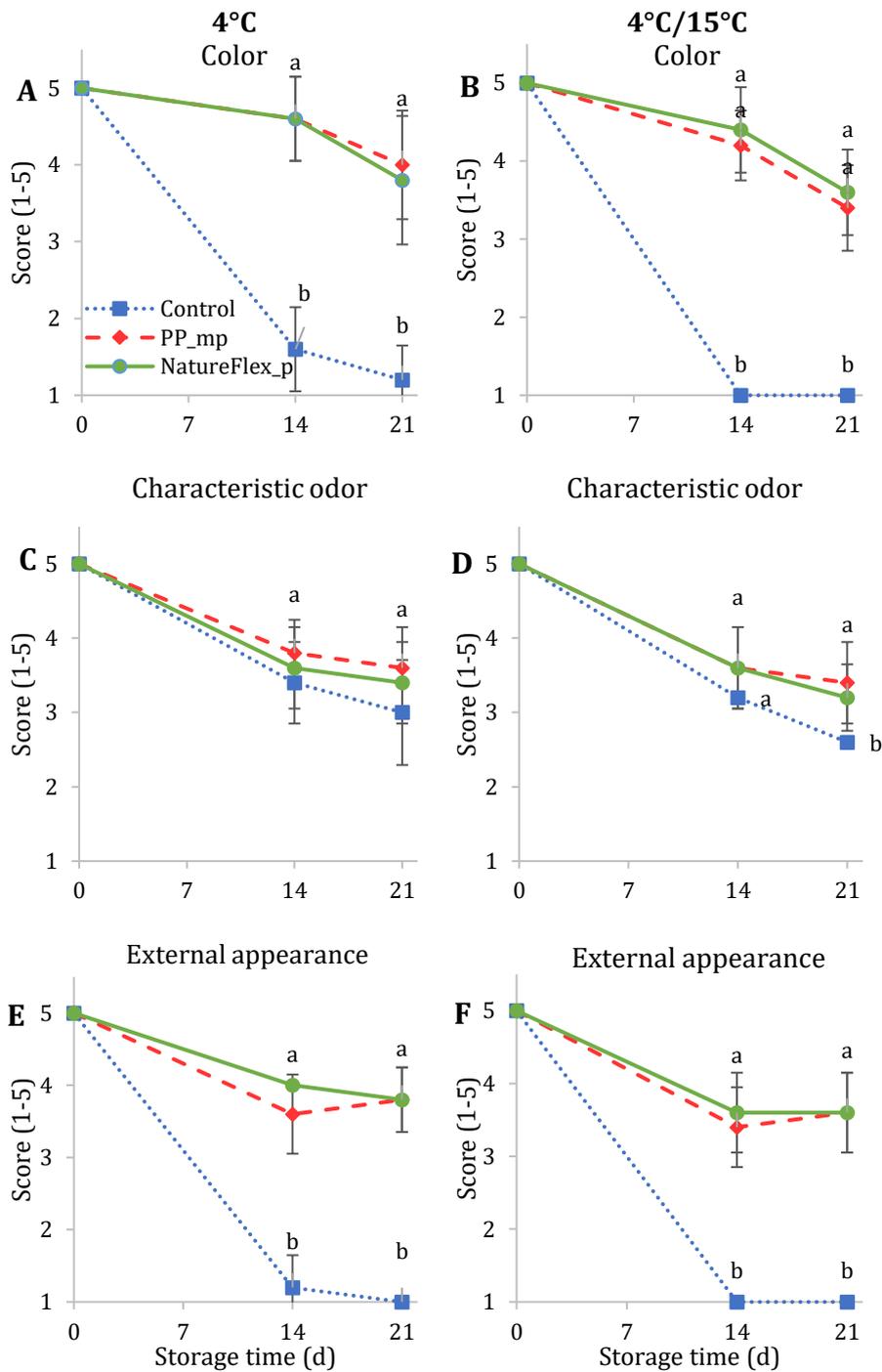


Figura 7. 26. Evolución de atributos sensoriales (puntaje de 1 a 5) de floretes de brócoli envasados en diferentes sistemas de envasado: Control $\cdots\blacksquare\cdots$, PP_mp $- \blacklozenge -$, NatureFlex_p $\text{---}\bullet\text{---}$ durante el almacenamiento a 4°C y 4°C/15°C: (A-B) Color, (C-D) Olor característico, (E-F) Apariencia externa. Las barras verticales representan la desviación estándar ($n = 3$). Letras distintas implica que existen diferencias significativas entre sistemas de envasado dentro del mismo día de almacenamiento según el test de Tukey ($p < 0,05$).

7.3.2.7. Contenido de glucosinolatos (GSL)

En el brócoli recién cosechado se identificaron 5 GSL: uno alifático (glucorafanina) y cuatro indólicos (glucobrasicina, neoglucobrasicina, 4-hidroxi-glucobrasicina y 4-metoxiglucobrasicina). La glucobrasicina (GB) fue el GSL mayoritario (44,8%), seguido por la glucorafanina (GRA) (34,7%), neoglucobrasicina (NGB) (15,6%), 4-metoxiglucobrasicina (MGB) (3,8%) y 4-hidroxi-glucobrasicina (HGB) (1,1%). El grupo predominante fue el de los GSL indólicos. Esta caracterización coincide con las realizadas en experiencias anteriores para el cultivar Legacy. Además, también coincide con el perfil reportado por Casajús et al. (2021) para el mismo cultivar. Por lo tanto, se podría inferir que el cultivar Legacy se caracteriza por una predominancia de GSL del tipo indólicos. Los parámetros de almacenamiento postcosecha (como temperatura, RH, composición atmosférica, etc.) pueden tener un impacto diferente en el contenido de GSL dependiendo del tipo, por lo que resulta relevante contar con la caracterización de los cultivares a modo de determinar su idoneidad para distintos productos, aplicaciones y tecnologías.

No se observaron pérdidas de GSL totales durante el almacenamiento en ninguna de las condiciones estudiadas (**Figura 7. 27**). Por lo tanto, a diferencia del film de celulosa sin perforar (7.2.), el film de celulosa perforado generó condiciones propicias para la conservación de estos compuestos. El aumento de la temperatura durante 2 días no tuvo un impacto significativo, y el contenido de GSL totales también se conservó en esta condición.

La evolución de los GSL se asemeja a las obtenidas en las secciones 6.1 y 6.2. Se concluye que temperaturas de almacenamiento de 4°C (o menores) permiten conservar el contenido de GSL en floretes de brócoli, sin necesidad de modificaciones drásticas de la atmósfera interior. Hacia el final del almacenamiento, los floretes en NatureFlex_p presentaron el mayor contenido de GSL y los floretes Control el menor, por lo que se infiere que la modificación de la atmósfera permitió incrementar el contenido de estos compuestos (**Figura 7. 27**). Por lo tanto, el film de celulosa perforado fue exitoso en la conservación de los GSL, generando condiciones que parecen haber contribuido al incremento de estos compuestos.

Se obtuvo correlación significativa ($p = 0,04$) entre el contenido de GSL totales y la concentración de O_2 (r entre $-0,975$ y $-0,998$) y CO_2 (r entre $0,977$ y $0,975$) del espacio cabeza (**Figura 7S. 2**). Resultados que están alineados con los obtenidos en la sección 6.2.

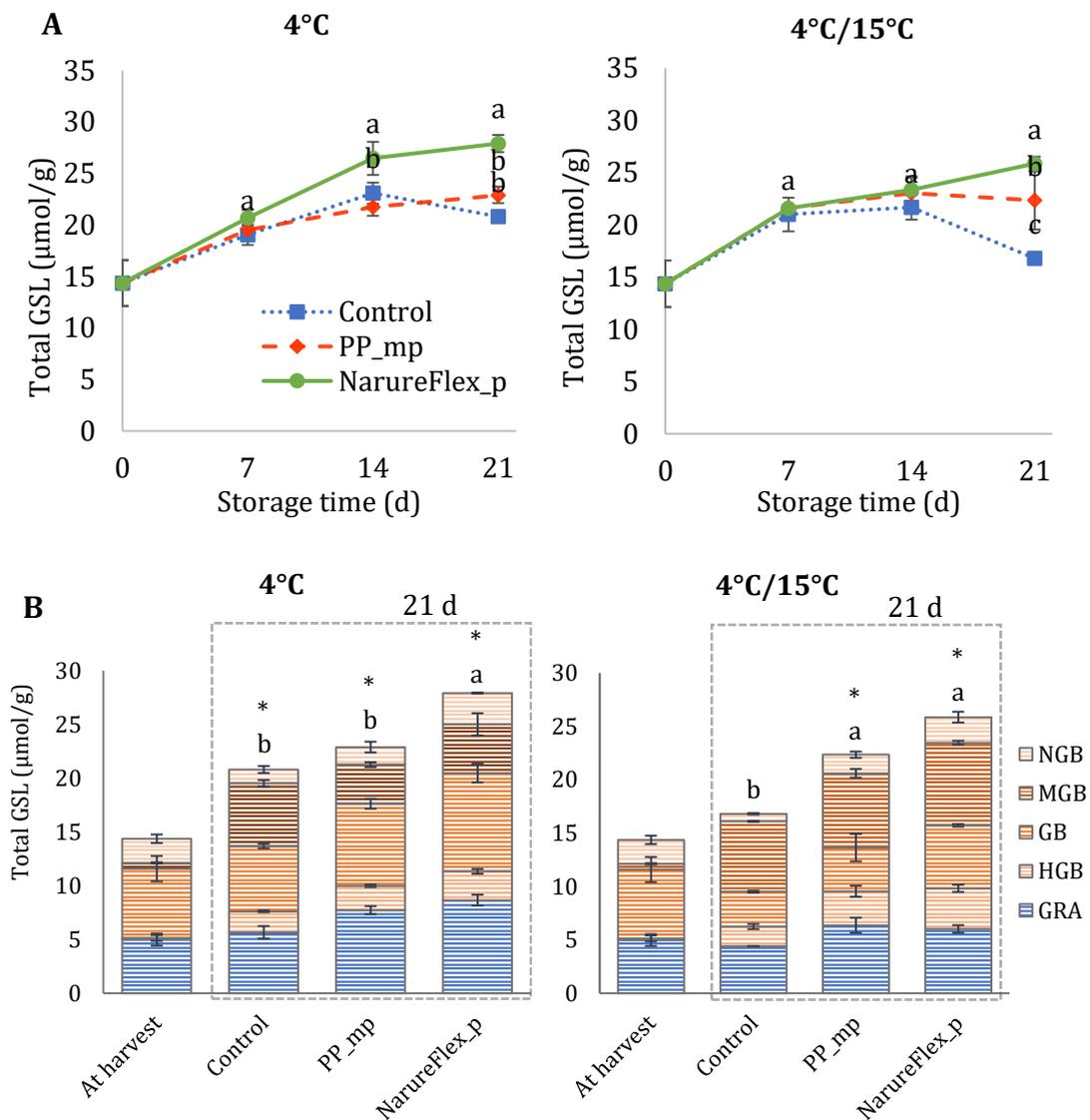


Figura 7. 27. A) Evolución del contenido total de glucosionlatos durante el almacenamiento a 4°C y $4^{\circ}\text{C}/15^{\circ}\text{C}$ de floretes de brócoli en distintos sistemas de envasado: Control $\cdots\blacksquare\cdots$, PP_mp $-\blacklozenge-$, NatureFlex_p $\text{---}\bullet\text{---}$. Las barras verticales representan la desviación estándar ($n = 3$). Letras diferentes indican diferencias significativas entre condiciones de envasado dentro del mismo día de almacenamiento según el test de Tukey ($p < 0,05$). **B)** Contenido total de glucosionlatos al día 0 ("At harvest") y al día 21, desglosado por glucosionlatos individuales. Letras diferentes indican diferencias significativas entre condiciones

de envasado según el test de Tukey ($p < 0,05$). “*” indican diferencias significativas entre floretes recién cosechados y floretes almacenados durante 21 días (Test de Dunnett, $\alpha = 0.05$).

Como ya ha sido mencionado, en la literatura científica se reportan importantes pérdidas de GSL (tanto en cabezas como en floretes) si el producto se mantiene expuesto al aire e incluso durante MAP, observándose menores pérdidas al aplicar MAP (Howard et al., 1997; Rodrigues & Rosa, 1999; Vallejo et al., 2003; Jia et al., 2009). Además, la mayoría de los trabajos recomiendan concentraciones de O₂ bajas (menores al 5%) y de CO₂ altas (mayores al 15%) para lograr la conservación de estos compuestos (Jones et al., 2006; Schreiner et al., 2007).

Como contribución en el área, este trabajo determina que, a temperaturas recomendadas, es posible conservar e incrementar el contenido de GSL durante un almacenamiento prolongado (21 días), sin modificación de la atmósfera o con modificaciones moderadas (lo que verifica los resultados obtenidos en secciones anteriores). Se determinaron condiciones de envasado y almacenamiento que parecieran haber permitido la predominancia de mecanismos de síntesis frente a mecanismos de degradación de GSL. Existen algunos reportes que coinciden con estos hallazgos, reportando conservación de GSL, y en algunos casos aumento de GSL indólicos, aunque la mayoría de los trabajos estudian períodos relativamente cortos de almacenamiento y/o no indican las condiciones gaseosas del espacio cabeza (Rangkadilok et al., 2002; Song & Thornalley, 2007; Torres-Contreras et al., 2017; Verkerk et al., 2001).

El incremento de GSL observado en esta experiencia (y a lo largo de esta Tesis), se puede atribuir a una combinación de factores vinculados al procesamiento, tecnología y cultivares empleados. Las operaciones de corte (durante la generación de los floretes) provocan daños en el tejido que ponen en contacto enzima y sustrato, pero también generan un tipo de estrés abiótico que desencadena mecanismos de síntesis. En el MAP, donde se cuantificó mayor contenido de GSL, la reducción de O₂ e incremento de CO₂ podrían disminuir la actividad mirosinasa (esto coincide con los resultados de la sección 7.3.2.8. *Actividad mirosinasa*) y generar mayor estrés, haciendo que predominen las vías de síntesis frente a la degradación enzimática (Torres-Contreras et al., 2017). Los mecanismos asociados a este comportamiento fueron discutidos en la sección 6. En la **Figura 7. 27 - B** (y **Figura 7S. 3** en Materiales

suplementarios) se puede observar que el incremento de GSL totales viene dado principalmente por la acumulación de GSL indólicos. La mayor acumulación de estos compuestos frente a la de GSL alifáticos se ha relacionado con la activación de peroxidasas inducida por heridas, que cataliza el paso limitante de la velocidad en la conversión de triptófano a glucosinolatos indólicos (Casajús et al., 2021; Stahl et al., 2016; Torres-Contreras et al., 2017; Starzyńska et al., 2003). Que la variedad estudiada se caracterice por predominancia de GSL indólicos, podría explicar el incremento de GSL observado durante el almacenamiento. La MGB fue el GSL que presentó mayor incremento durante el almacenamiento de los floretes (incrementó su concentración entre 6 y 14 veces respecto a la concentración inicial). Esto también se observó en la sección 6.1 para el cv. Legacy y en las secciones 6.2 y 7.1 para el cv. Marathon; y ha sido reportado por otros autores (Casajús et al., 2021; Rybarczyk-plonska et al., 2016; Torres-Contreras et al., 2017; Yi et al., 2016).

Por lo tanto, se concluye que:

- Las condiciones de envasado y almacenamiento ensayadas generaron condiciones adecuadas para la conservación, e incluso el incremento, de GSL en floretes de brócoli del cultivar Legacy durante el almacenamiento postcosecha.
- El film de celulosa perforado resultó adecuado y generó condiciones propicias para incrementar el contenido de GSL y así preservar el potencial saludable de floretes de brócoli, tanto a temperaturas de almacenamiento recomendadas como durante el incremento abrupto a temperaturas abusivas.

7.3.2.8. Actividad mirosinasa (Myr)

El sistema GSL-Myr es un sistema de defensa presente solo en plantas del género *Brassica*, que provee a la planta mecanismos de defensa contra herbívoros y patógenos (Xie et al., 2022). Por otro lado, los productos de la hidrólisis de GSL mediados por la enzima Myr (isotiocianatos) tienen múltiples beneficios para la salud. Es por ello que entender la relación entre el contenido de GSL y actividad Myr ha comenzado a ganar interés en los estudios de postcosecha con el objetivo de

conservar el potencial nutracéutico de estas hortalizas (Lim et al., 2015). Sin embargo, el papel de la Myr en la definición de la calidad de los vegetales aún no es claro. Por ejemplo, se ha reportado una correlación positiva entre el contenido de sulforafano (isotiocianato derivado de la glucorafanina) y la actividad Myr (J. G. Lee et al., 2017; Lim et al., 2015). Si bien los isotiocianatos son los que tienen la actividad bioactiva, y desde ese punto de vista interesa su alto contenido, también han sido asociados a la generación olores y sabores extraños en los vegetales. Además, se ha observado que presentan una menor estabilidad durante la postcosecha respecto a los GSL (J. G. Lee et al., 2017). No se encontraron trabajos publicados en donde se estudie la relación entre la actividad Myr y la calidad de los vegetales y es por ello que este trabajo buscó generar información al respecto.

De los análisis de correlación entre la actividad Myr y las variables de calidad, no se obtuvieron resultados estadísticamente significativos ($p > 0,05$). De todos modos, se dejan planteadas algunas hipótesis de posibles relaciones entre variables, que deberán ser confirmadas con estudios posteriores.

Se observó que la actividad Myr se mantuvo o descendió durante 21 días de almacenamiento. Descensos estadísticamente significativos se obtuvieron en las muestras NatureFlex_p y en las muestras control almacenadas a 4°C/15°C (**Figura 7. 28**). Reducciones de la actividad Myr durante la postcosecha fueron reportadas para rábano, y atribuidas a procesos de senescencia (Lee et al., 2017; Lim et al., 2015). En este trabajo no se encontraron resultados concluyentes que correlacionen actividad Myr y variables que indiquen senescencia en brócoli. Para el almacenamiento a 4°C/15°C, se observó una tendencia de correlación entre actividad Myr y parámetros colorimétricos y actividad Myr y atributos sensoriales. Para las muestras almacenadas a 4°C no se encontró correlación.

Las muestras que presentaron mayor pérdida de masa fueron las que presentaron menor actividad Myr. Se plantea la hipótesis de que la pérdida de agua podría disminuir la actividad enzimática, ya que podría afectar la disponibilidad de agua, estructura de la enzima y otros factores condicionantes de su actividad (Tetteh et al., 2019; Yábar et al., 2011). En estudios en rábano se ha reportado que la pérdida de agua podría ocasionar pérdida de viabilidad celular y deterioro del sistema GSL-Myr (J. G. Lee et al., 2017).

A 4°C, se observó una tendencia a que muestras expuestas a menores concentraciones de O₂ y mayores de CO₂ presentaron menor actividad Myr. A 4°C/15°C no se observó dicha tendencia. Se deja planteada la hipótesis de que, en condiciones de refrigeración, la modificación de la atmósfera podría disminuir la actividad Myr. El incremento de la temperatura podría desencadenar otros mecanismos, haciendo que no se observe efecto de la composición atmosférica sobre la actividad enzimática. Estos resultados podrían contribuir a explicar la mayor conservación de GSL en floretes MAP observada a lo largo de esta Tesis. En la literatura es escasa la información sobre el efecto de la concentración gaseosa sobre la actividad Myr, y los reportes existentes son contradictorios. En línea con la hipótesis planteada, se ha reportado efecto inhibitorio de la actividad Myr a concentraciones de CO₂ elevadas, pero el mecanismo de acción aún es desconocido (Dunford & Temelli, 1996; Jia et al., 2009; Rodríguez-Hernández et al., 2014). Por otro lado, también se encontraron reportes de modulación positiva de genes asociados con la actividad Myr (BoTGG₁ y BoTGG₂) durante el crecimiento de plantas expuestas a concentraciones elevadas de CO₂ (Almuhayawi et al., 2020; Wiesner-Reinhold et al., 2021). Esto deja de manifiesto de que aún existe desconocimiento acerca de cómo la concentración atmosférica puede modular la actividad de esta enzima y de su rol en la conservación de compuestos bioactivos en los vegetales del género *Brassica*.

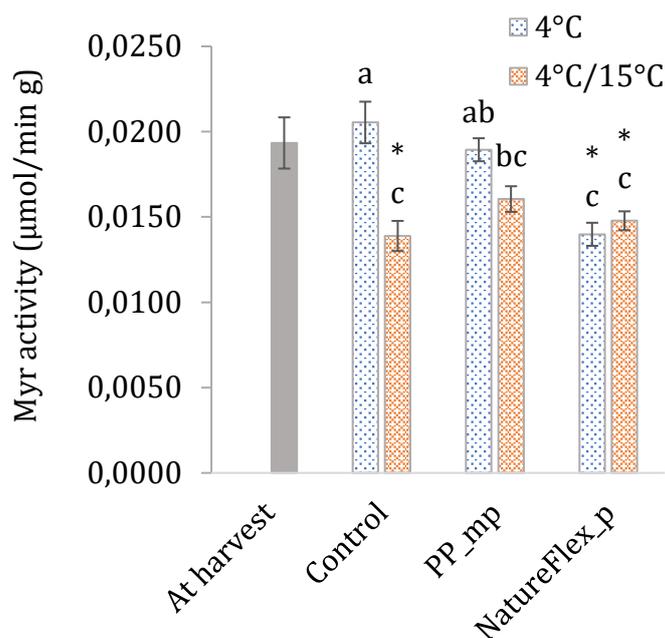


Figura 7. 28. Actividad mirosinasa de floretes de brócoli el día de la cosecha (At harvest) y después de 21 días de almacenamiento a 4°C y a 4°C/15°C en distintos sistemas de envasado. Los resultados están expresados como el promedio \pm la desviación estándar ($n = 3$). Letras diferentes indican diferencias significativas entre condiciones de envasado según el test de Tukey ($p < 0,05$). "*" indican diferencias significativas entre floretes recién cosechados y floretes almacenados durante 21 días (Test de Dunnett, $\alpha = 0,05$).

Respecto a la relación entre el contenido de GSL y actividad Myr, se encontró correlación negativa significativa ($r = -0,881$; $p = 0,002$; grados de libertad = 7) para muestras almacenadas a 4°C (**Figura 7. 29**). Esta correlación podría indicar que floretes con mayor actividad Myr están expuestos a una mayor degradación de GSL. Esto está en línea con reportes que identifican correlación positiva entre la actividad Myr y los productos de degradación de los GSL (isotiocianatos) (J. G. Lee et al., 2017; Lim et al., 2015; Xie et al., 2022). Sin embargo, la correlación entre actividad Myr y contenido de GSL no se observó para floretes almacenados a 4°C/15°C ($r = 0,221$, $p = 0,568$) (**Figura 7. 29**). Tiene sentido que en algunas condiciones exista correlación y en otras no, ya que la concentración de GSL no solo depende de su hidrólisis, sino también de los mecanismos de síntesis, como ha quedado demostrado en esta Tesis. En la bibliografía no se encontraron reportes de la correlación entre actividad Myr y GSL, pero si se encontraron reportes de correlaciones fuertes y significativas de la actividad Myr y el contenido de isotiocianatos (J. G. Lee et al., 2017; Lim et al., 2015;

Yang et al., 2022). Por ejemplo, estudios recientes en brócoli indican que el contenido de sulforafano y de indol-3-metanol se correlacionaron positivamente con la expresión de genes relacionados con la actividad Myr (Yang et al., 2022). Estudios en rábano indicaron que el contenido de sulforafano depende en mayor medida de la actividad de la Myr que del contenido de GSL (J. G. Lee et al., 2017).

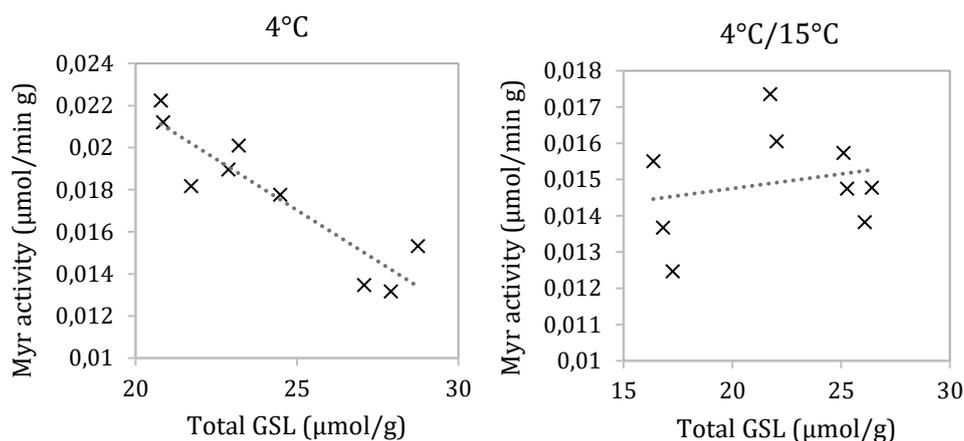


Figura 7. 29. Actividad mirosinasa ($\mu\text{mol}/\text{min g}$) vs. contenido total de glucosinolatos ($\mu\text{mol}/\text{g}$) en floretes de brócoli almacenados 21 días en diferentes films de envasado y temperaturas de almacenamiento.

Se deja planteada la hipótesis de que, en condiciones de refrigeración, floretes de brócoli con mayor actividad Myr podrían estar expuestos a mayor degradación de GSL. Además, en estas condiciones, una mayor modificación de la atmósfera podría disminuir la actividad Myr y contribuir a la preservación de GSL durante la postcosecha. Se requieren mayores trabajos de investigación que permitan confirmar las hipótesis formuladas a partir de este estudio.

7.3.2.9. Ácidos hidroxicinámicos (HCA)

Al igual que en caracterizaciones anteriores, los ácidos sinápicos y sus derivados fueron el grupo predominante de HCA. El contenido promedio fue de $3,22 \pm 0,71 \mu\text{mol g}^{-1}$, el cual se mantuvo constante durante los 21 días de almacenamiento, independientemente del envase empleado y del incremento abrupto de la temperatura de almacenamiento. Estos resultados son consistentes con las

experiencias anteriores, concluyéndose que a temperaturas de 4°C (o inferiores) los HCA se conservan durante la postcosecha, independientemente del sistema de envasado. Además, el incremento de temperatura durante dos días no presenta efecto significativo en el contenido de estos compuestos.

7.3.2.10. Análisis de componentes principales (PCA)

Se realizó un PCA en el cual los componentes principales 1 y 2 (PC1 y PC2) explicaron el 76% de la variabilidad de los datos. Este análisis corrobora algunos de los resultados obtenidos en análisis anteriores. Nuevamente, se observó correlación entre parámetros colorimétricos, atributos sensoriales y dureza, variables que se correlacionaron con el PC1 (**Figura 7. 30 - A**). Firmeza y pérdida de masa (ML) se correlacionaron con el PC2, e inversamente entre ellas (resultado semejante al obtenido para cabezas de brócoli en 7.1). El contenido de GSL también se correlaciono con el PC2, no observándose en esta representación correlación con los parámetros de calidad externa, como se había observado en análisis realizados en ensayos anteriores. Sin embargo, en el mapa de calor de correlaciones (**Figura 7S. 2**), se observa correlación significativa entre GSL y atributos de calidad externa, especialmente cuando se incrementa la temperatura de almacenamiento. Además, en el mapa de correlaciones también se obtuvo correlación significativa entre GSL y composición gaseosa, infiriéndose que la composición de gases es determinante del contenido de GSL del producto. Los HCA no estuvieron bien representados por los PC1 y PC2 no pudiéndose sacar conclusiones.

Se obtuvo una representación gráfica de las muestras de brócoli envasadas y almacenadas, en la cual se pueden distinguir tres grupos que coinciden con los distintos materiales de envasado (**Figura 7. 30 - B**). En relación con la representación de las muestras en el PC1 y PC2, se puede interpretar que:

- Las muestras NatureFlex_p se ubican hacia valores positivos del PC2, en orden creciente a medida que aumenta el tiempo de almacenamiento. Esto implica que floretes envasados en este material se caracterizan por mayores valores de pérdida de peso, menores de firmeza y mayor contenido de GSL.

- Las muestras PP_mp fueron el grupo con las características más cercanas a las muestras recién cosechadas. Se caracterizaron por preservar los parámetros colorimétricos, de textura y atributos sensoriales.
- Las muestras control se ubican a lo largo del PC1, en orden descendente a medida que se incrementa el tiempo de almacenamiento. Esto indica que la principal característica de estas muestras es el detrimento causado por la pérdida de color, incremento en la dureza del tallo y detrimento en los atributos sensoriales.

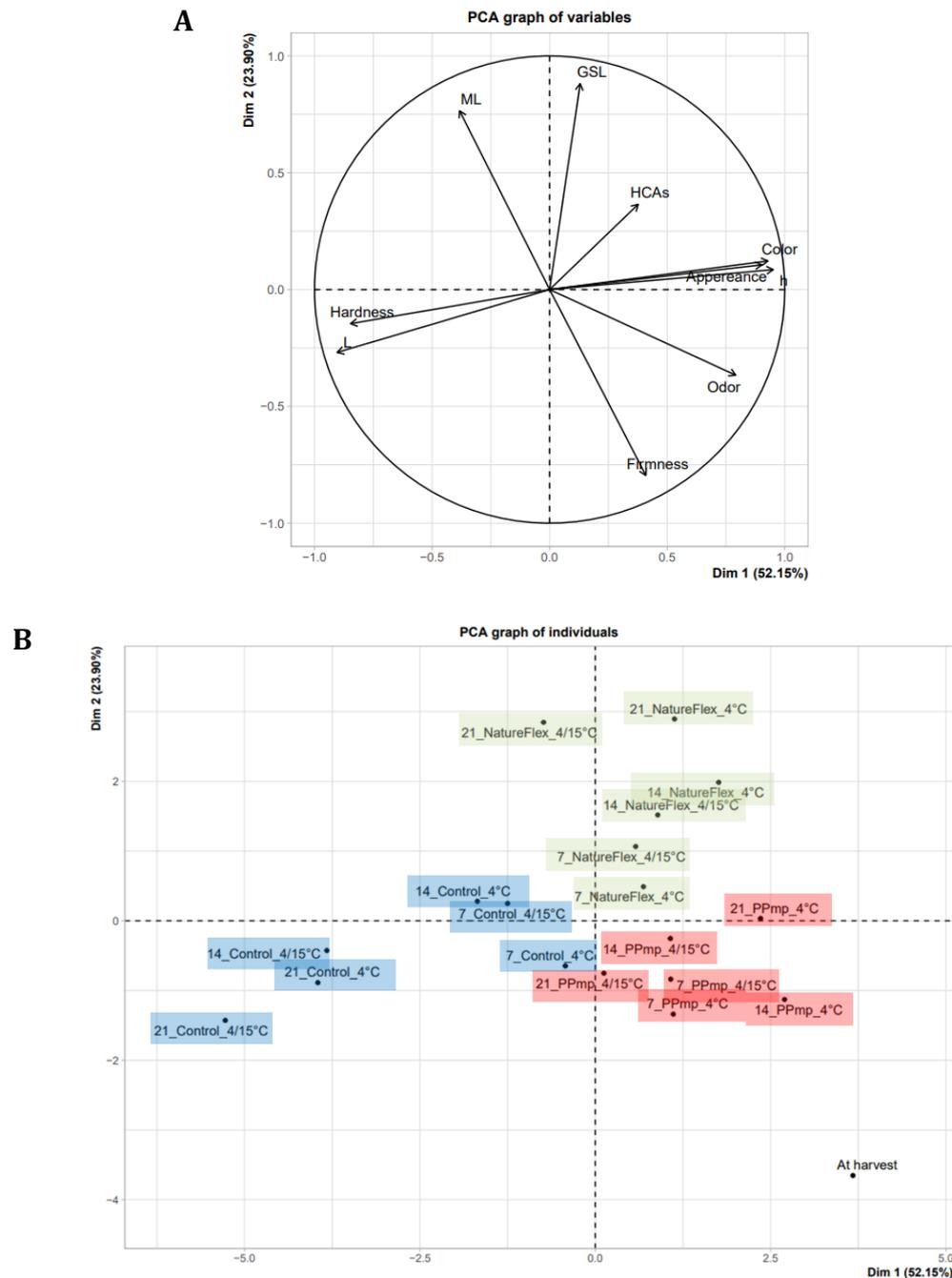


Figura 7. 30. A) Representación de diferentes parámetros de calidad de floretes de brócoli en el primer y segundo componente del análisis de componentes principales. **B)** Representación de muestras de floretes de brócoli almacenadas a 4 y 4/15°C, durante distintos tiempos (0 “At harvest”, 7, 14 y 21 días) en distintos sistemas de envasado (Control ■, NatureFlex® ■ y PP_mp ■), en el primer y segundo componente del análisis de componentes principales.

7.3.2.10. Calidad microbiológica

Para evaluar la aptitud del producto en términos microbiológicos se utilizó como referencia el Real Decreto 3484/2000 de la legislación española. Se tomaron como referencia los parámetros establecidos para el Grupo D, que refiere a “comidas preparadas envasadas, a base de vegetales crudos” (**Tabla 7. 1**). Uruguay y el Mercosur no cuentan con normativas para productos mínimamente procesados.

Tabla 7. 1. Normas microbiológicas para comidas preparadas envasadas a base de vegetales crudos (grupo D)(BOE, 2001.).

	Día de fabricación	Día de caducidad
Recuento total de aerobios mesófilos (UFC/g)	n=5, c=2 m=10 ⁵ , M=10 ⁶	n=5, c=2 m=10 ⁶ , M=10 ⁷

n = número de unidades de la muestra

m = valor umbral del número de bacterias. El resultado se considerará satisfactorio si todas las unidades que componen la muestra tienen un número de bacterias igual o menor que m. M = valor límite del número de bacterias. El resultado se considerará no satisfactorio si una o varias unidades que componen la muestra tienen un número de bacterias igual o mayor que M.

c = número de unidades de la muestra, cuyo número de bacterias podrá situarse entre m y M. La muestra seguirá considerándose aceptable si las demás unidades tienen un número de bacterias menor o igual a m.

El sistema de envasado tuvo un efecto significativo en el recuento microbiano ($p < 0,01$). A los 14 días de almacenamiento, floretes sin envasar presentaron recuentos microbiológicos por encima del valor umbral (10^6 ufc/g) independientemente de la temperatura de almacenamiento, limitando su vida útil a menos de 14 días. El MAP resultó crucial para prolongar la vida útil de los floretes, que a los 14 días de almacenamiento presentaron recuentos aceptables a ambas temperaturas de almacenamiento (**Figura 7. 31 - A**). El film de NatureFlex perforado mostró los mejores resultados, presentando recuentos significativamente inferiores respecto al film de PP microperforado. Este resultado puede explicarse a la menor humedad relativa en los envases NatureFlex, que limita el crecimiento microbiano (**Figura 7. 31 - A y B**).

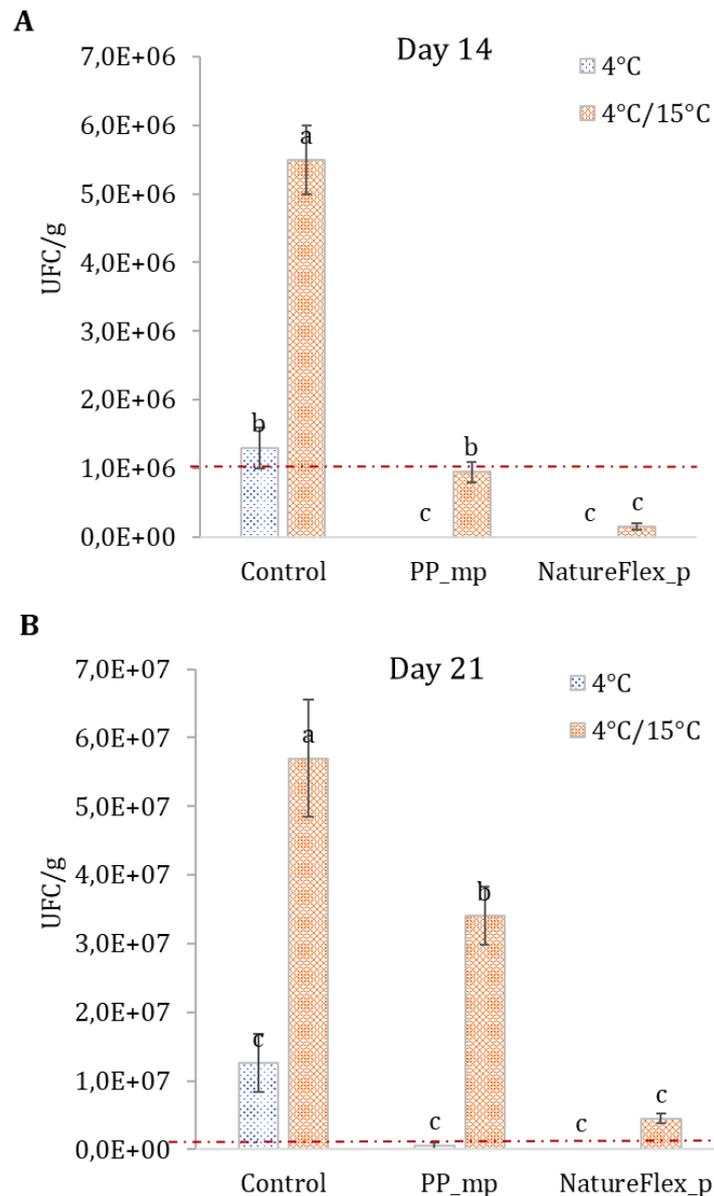


Figura 7. 31. Recuento de aerobios mesófilos, en unidades formadoras de colonia por gramo (UFC/g), en floretes de brócoli almacenados a 4°C y a 4°C/15°C durante 14 días **(A)** y 21 días **(B)**, en distintos sistemas de envasado. La línea roja punteada indica el valor umbral del número de bacterias. Los resultados están expresados como el promedio \pm la desviación estándar ($n = 3$). Letras diferentes indican diferencias significativas entre muestras según el test de Tukey ($p < 0,05$).

Si bien el incremento de temperatura a 15°C durante dos días no tuvo un impacto significativo en la mayoría de las variables estudiadas, el impacto en la calidad microbiológica fue significativo y determinante de la vida útil **(Figura 7. 31)**. Floretes almacenados dos días a 15°C presentaron recuentos significativamente superiores respecto a los que se mantuvieron a 4°C. A los 21 días, todas las muestras

que estuvieron expuestas al incremento de la temperatura de almacenamiento presentaron recuentos por encima del umbral, mientras que las muestras MAP conservadas a 4°C presentaron recuentos aceptables.

Por lo tanto, el film Natureflex generó condiciones propicias para limitar el crecimiento microbiano y extender la vida útil de floretes de brócoli. El empleo de MAP y mantener la temperatura de refrigeración es crucial para prolongar la vida útil de este producto y reducir pérdidas.

7.3.3. Conclusiones parciales

El film de celulosa perforado resultó ser una alternativa viable para el envasado y comercialización de floretes de brócoli mínimamente procesado. Como ventajas, permitió generar concentraciones de O₂ y CO₂ adecuadas, redujo la condensación de agua dentro del envase y floretes de brócoli envasados en este material presentaron menores recuentos microbianos y mayores contenidos de glucosinolatos respecto a floretes envasados en polipropileno. La evolución del color, dureza en el tallo, atributos sensoriales y contenido de ácidos hidroxicinámicos fue semejante tanto en floretes envasados en film de celulosa como en polipropileno. Las desventajas del film de celulosa respecto al polipropileno fueron la mayor pérdida de masa y firmeza de los floretes, pero que no impactaron significativamente en la calidad organoléptica.

Se verifica el rol crucial del envasado en atmósfera modificada en la extensión de la vida útil. Floretes envasados presentan una vida útil de al menos 21 mientras que en floretes sin envasar la vida útil es inferior a 14 días (según criterio microbiológico). La vida útil de los floretes envasados se redujo a menos de 21 días al incrementarse la temperatura de almacenamiento, corroborándose que la temperatura es un factor clave en la conservación del producto.

Los resultados obtenidos proporcionan información valiosa sobre condiciones almacenamiento y envasado en film a base de celulosa para floretes de brócoli, que son factibles de aplicar en la industria y permiten una vida útil adecuada del producto, a la vez que conserva sus componentes bioactivos.

Por último, se realizó un estudio preliminar sobre la relación entre la actividad mirosinasa y parámetros de calidad de floretes de brócoli, del cual se formularon las siguientes hipótesis como insumos para investigaciones futuras:

- La pérdida de agua podría disminuir la actividad mirosinasa, ya que podría afectar la disponibilidad de agua y estructura de la enzima.
- En condiciones de refrigeración, la modificación de la atmósfera podría disminuir la actividad mirosinasa. El incremento de la temperatura pudo desencadenar otros mecanismos, haciendo que no se observe efecto de la composición atmosférica sobre la actividad mirosinasa.
- En condiciones de refrigeración, floretes de brócoli con mayor actividad Myr podrían estar expuestos a mayor degradación de glucosinolatos.

7.3.4. Material suplementario

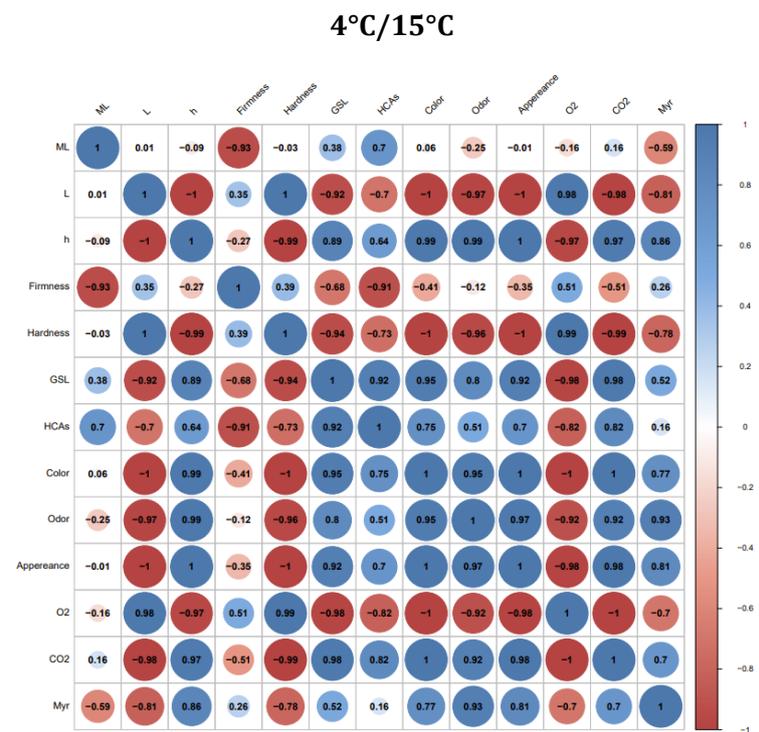
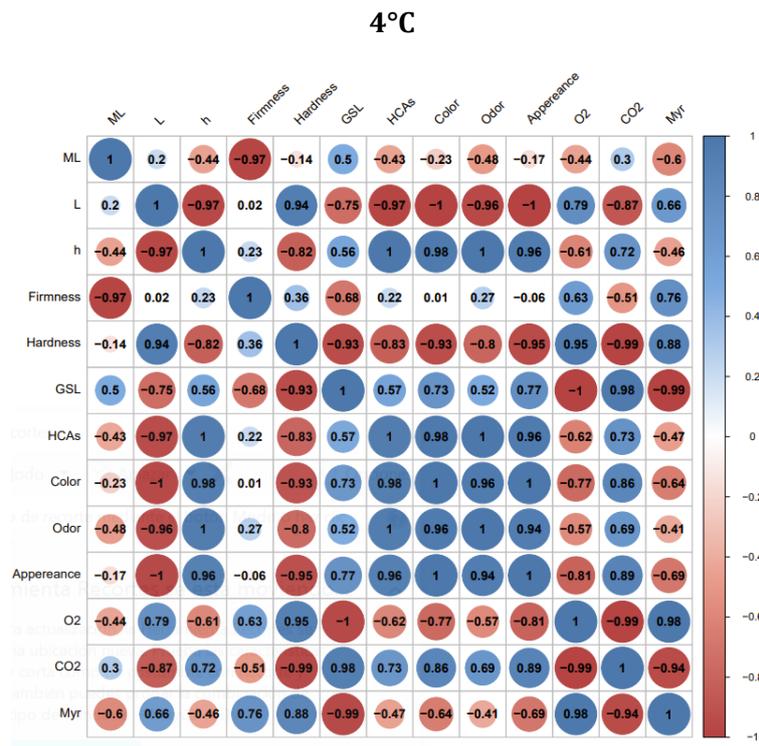


Figura 7S. 2. Mapa de calor de correlación de Pearson para los parámetros de calidad evaluados en floretes de brócoli (cv. Legacy) a lo largo del almacenamiento postcosecha a 4°C y 4/15°C.

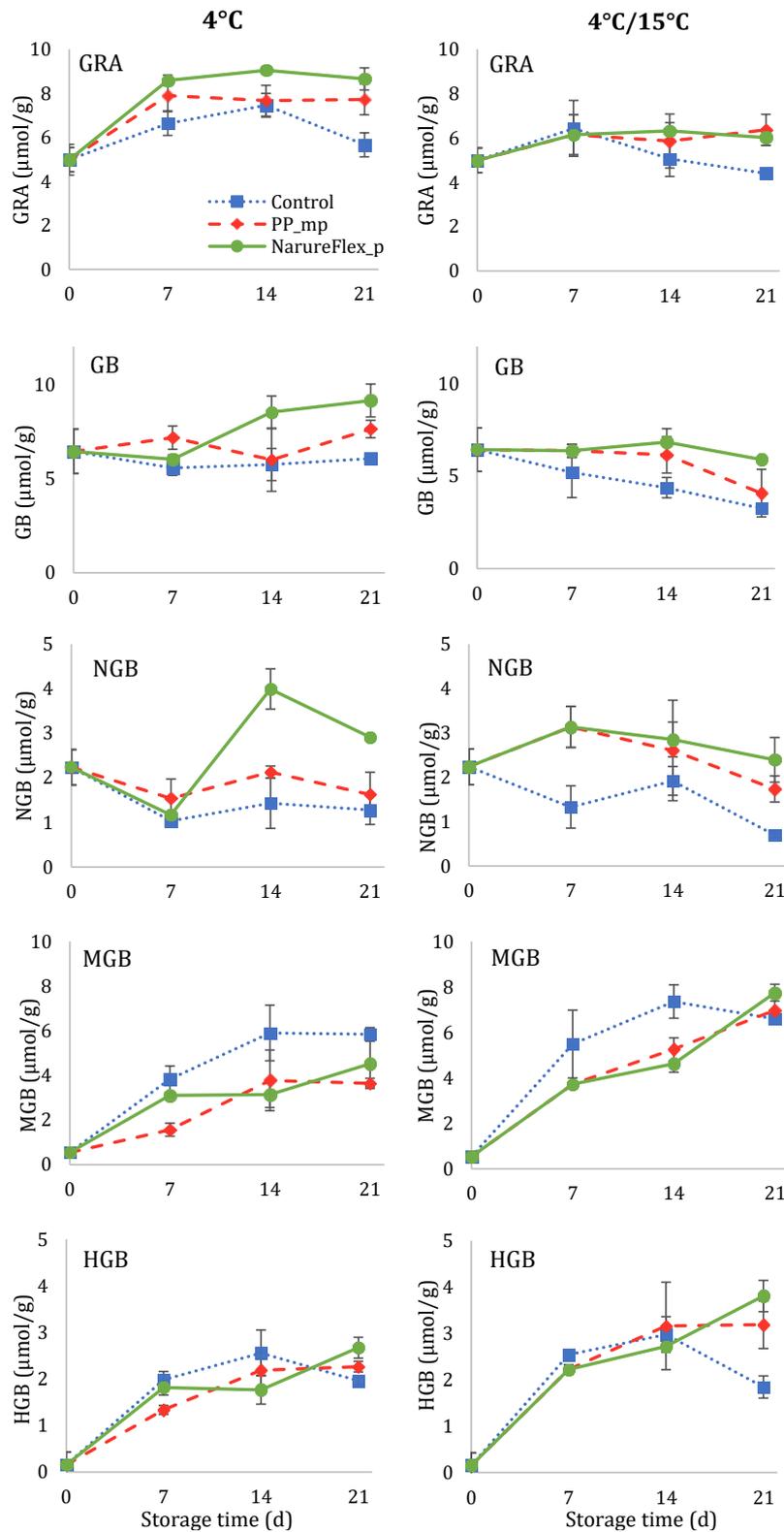


Figura 7S. 3. Evolución del contenido de glucosinolatos individuales: glucorafanina (GRA), glucobrasicina (GB), metoxiglucobrasicina (MGB) y neoglucobrasicina (NGB) de floretes de brócoli envasados en diferentes sistemas de envasado (Control \cdots ■ \cdots , PP_mp $-$ ◆ $-$, NatureFlex_p $-$ ● $-$) almacenados a 4°C y 4°C/15°C. Las barras verticales representan el error estándar (n = 3).

CAPÍTULO 8.

TEMA 3.

Cocción en horno microondas

8.1. Efecto de la cocción en microondas convencional vs. en bolsas microondables en el contenido de fitoquímicos del brócoli

Los principales objetivos de este capítulo son: (I) estudiar el efecto de la cocción en microondas usando bolsas microondables sobre el contenido de fitoquímicos de floretes de brócoli y (II) estudiar el efecto del tiempo de cocción sobre el contenido de fitoquímicos. Como forma de validar los resultados se realizaron dos experiencias independientes, una empleando brócoli procesado domésticamente y otra empleando brócoli procesado en la industria.

8.1.1. Caso de estudio: brócoli procesado domésticamente

8.1.1.1. Diseño experimental

Aproximadamente 200 g de floretes de brócoli, procesados domésticamente (ver Capítulo 4, apartado 4.15.1.), se colocaron en bolsas aptas para cocción al microondas (MW) y se cocinaron en horno MW doméstico durante 3 y 5 minutos. Como control se utilizó el producto cocinado en las mismas condiciones, pero sin bolsa (microondas convencional). Luego de la cocción los floretes se almacenaron refrigerados a 4°C durante 2 días, simulado un posible uso doméstico del alimento cocido. En la **Figura 8. 1** se resumen los tratamientos realizados y la nomenclatura utilizada para referirse a cada uno de ellos. Se determinó: pérdida de peso durante la cocción (como porcentaje respecto al peso del producto fresco), temperatura del producto (inmediatamente después de la cocción), recuentos microbiológicos y contenido de GSL y HCA. Para los análisis microbiológicos y de compuestos bioactivos se tomaron muestras antes y después de cada tratamiento de cocción, y luego de dos días de almacenamiento del producto cocido.

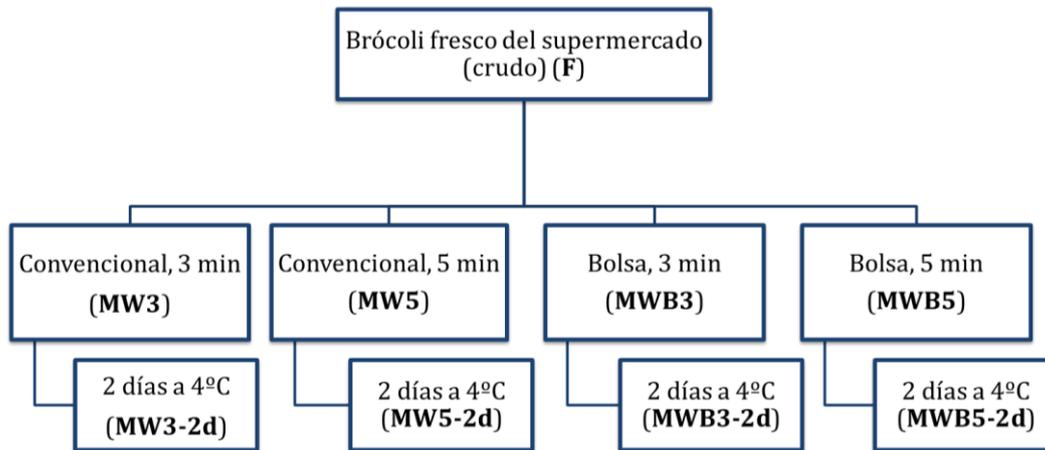


Figura 8. 1. Esquema del diseño experimental para evaluar el efecto de la cocción en microondas sobre la calidad de floretes de brócoli (cv. Parthenon) procesados domésticamente, y nomenclatura utilizada para referirse a cada tratamiento.

8.1.1.2. Resultados y discusión

8.1.1.2.1. Pérdida de peso y temperatura del producto después de la cocción

Existieron diferencias significativas tanto en la pérdida de peso (WL) como en la temperatura del producto según el tratamiento de cocción aplicado (**Tabla 8. 1**). Los reportes bibliográficos indican que la pérdida de agua durante la cocción por MW es superior respecto a otros métodos de cocción (Xu et al., 2016). Por ejemplo, Ramos et al. (2015) evaluaron la cocción al vapor, hervido, *sous vide* y MW, e informaron que el brócoli cocinado por MW presentó el menor contenido de humedad. La mayor pérdida de agua en este método de cocción se explica por la generación de un gradiente de presión dentro del alimento, que se establece debido a las características del calentamiento por MW. Esto genera un flujo de vapor hacia el exterior del alimento y el agua se pierde rápidamente (Chandrasekaran et al., 2013). En este estudio, la WL fue mayor en el brócoli cocinado convencionalmente que en el brócoli cocinado en bolsa microondable. Esto podría atribuirse a que la bolsa funciona como una barrera a la difusión del vapor de agua, aumentando la humedad y la presión alrededor del vegetal. En consecuencia, los gradientes de humedad y presión disminuyen, reduciendo la pérdida de agua durante el proceso. Este es un hallazgo a tener presente, ya que la retención de agua en las matrices vegetales puede influir en otros factores.

En todas las condiciones, los brócolis cocinados durante 5 minutos mostraron mayor WL en comparación con los cocinados durante 3 min, confirmando que mayores tiempos de cocción por MW provocan mayores WL en los alimentos.

El efecto del método de cocción sobre la temperatura final del producto fue diferente dependiendo del tiempo de cocción. Para 3 minutos, los floretes cocinados en bolsas presentaron una temperatura significativamente mayor respecto a los cocinados convencionalmente. Para 5 minutos, no existieron diferencias significativas de la temperatura entre floretes cocinados en bolsa o convencionalmente, aunque el valor de temperatura alcanzado por los floretes cocinados en bolsas fue mayor. Que floretes cocinados en bolsas alcancen mayores temperaturas puede deberse al incremento de presión dentro de la bolsa y a la menor evaporación de agua (menor WL) presentada por este método.

Tabla 8. 1. Pérdida de peso (WL) y temperatura del brócoli después de la cocción para cada tratamiento realizado. Los datos se expresan como la media \pm desviación estándar ($n = 3$). Letras diferentes dentro de una misma columna indican diferencias significativas según el test de Tukey ($p < 0,05$).

Tratamiento	WL (%)		Temperatura producto (°C)
MW3	21,1 \pm 1,3	b	87,5 \pm 3,5 b
MWB3	8,3 \pm 0,3	d	96,0 \pm 1,4 a
MW5	28,2 \pm 0,1	a	91,0 \pm 1,4 ab
MWB5	14,1 \pm 0,3	c	97,0 \pm 0,0 a

8.1.1.2.2. Contenido de GSL totales

Brócolis cocinados durante 3 minutos no presentaron diferencias significativas en el contenido de GSL respecto al brócoli fresco ni diferencias significativas entre los distintos tipos de cocción (**Figura 8. 2**). Brócolis cocinados convencionalmente por 5 minutos mostraron un descenso significativo del contenido de GSL respecto al fresco (de $32,0 \pm 1,2$ a $26,4 \pm 1,3$ $\mu\text{mol/g}$) mientras que floretes cocinados en bolsa durante el mismo período de tiempo conservaron el contenido de estos compuestos bioactivos ($32,3 \pm 2,6$ $\mu\text{mol/g}$). Por lo tanto, el uso de la bolsa retuvo el contenido de GSL durante periodos de cocción más largos (5 min). La mejor conservación de GSL

en esta condición podría deberse a la reducción de las pérdidas por evaporación. En varios estudios se reporta que la cocción por MW es adecuada para la retención de diversos compuestos de interés nutricional (Guo et al., 2017a; Pellegrini et al., 2010; Soares et al., 2017; Tabart et al., 2018; Xu et al., 2016). Sin embargo, también hay trabajos que reportan que la lisis celular y la alta tasa de evaporación en el microondas pueden causar pérdidas de varios compuestos, incluidos los GSL (Soares et al., 2017). Además, la mayor retención de agua en el tejido vegetal contribuye a evitar daños térmicos y preservar compuestos bioactivos (Chandrasekaran, Ramanathan, & Basak, 2013; Soares et al., 2017). Por lo tanto, la menor evaporación (menos WL) observada en la cocción en bolsas de microondas podría explicar la mayor retención de GSL.

En la mayoría de las muestras, el contenido de GSL se conservó durante el almacenamiento refrigerado por dos días respecto a los floretes recién cocidos. La excepción fueron las muestras MW3-2d y MWB5-2d que presentaron valores significativamente inferiores respecto a las muestras MW3 y MWB5 respectivamente. Por lo tanto, la mejor conservación lograda por un menor tiempo de cocción o por el uso de bolsa podría perderse si el producto se almacena 2 días previo a su consumo. Por lo tanto, estudiar el almacenamiento del producto cocido previo a su consumo aparece como un aspecto a tener en cuenta en trabajos futuros.

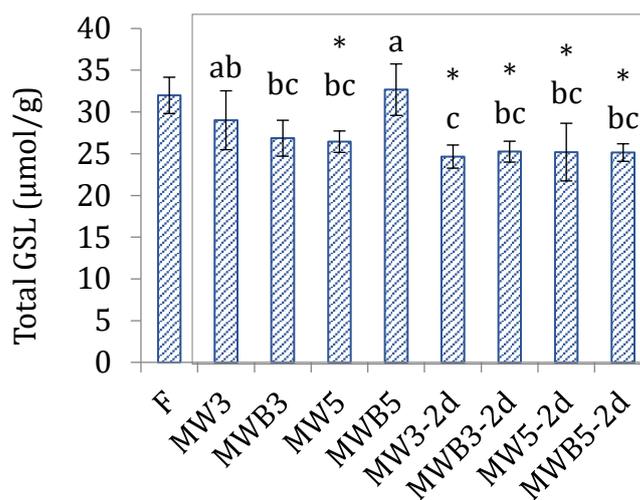


Figura 8. 2. Contenido total de GSL ($\mu\text{mol/g}$). Floretes de brócoli procesados doméesticamente: frescos (F), cocinados por MW bajo diferentes condiciones (MW3: convencional por 3 min, MW5: convencional por 5 min, MWB3: en bolsa por 3 min, MWB5: en bolsa por 5 min) y cocidos y almacenados a 4°C durante 2 días (sufijo “-2d”). Los resultados se expresan como el promedio \pm desviación estándar ($n = 3$). Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos (Test de Tukey, $p < 0,05$). “*” indica diferencias significativas entre tratamiento y la muestra fresca (F) (Test de Dunnett, $\alpha = 0,05$).

8.1.1.2.3. Contenido de GSL individuales

Los iones moleculares [M - H]⁻ (m/z) de GSL, sus patrones de iones de fragmentación y sus tiempos de retención permitieron identificar siete compuestos diferentes en todas las muestras analizadas. La información espectral de masas de los GSL intactos identificados (**Tabla 8S. 1**), el contenido individual de GSL de todas las muestras analizadas (**Tabla 8S. 2**) y un ejemplo de cromatograma HPLC-DAD obtenido en el análisis de brócoli fresco (**Figura 8S. 1**) se muestran en la sección de Materiales suplementarios. Los perfiles de GSL no mostraron diferencias entre las muestras frescas y cocidas, independientemente del tiempo y el método de cocción aplicados. Se ha descrito una mayor pérdida de GSL indólicos en comparación con los alifáticos para métodos de cocción como hervir, cocer al vapor y saltar (Soares et al., 2017; G. F. Yuan et al., 2009). Sin embargo, no se ha observado un comportamiento diferencial entre grupos de GLS durante la cocción por MW (Yuan et al., 2009). Estudios con diferentes variedades de *Brassica* han reportado que la distribución relativa de GSL no cambió después de la cocción (Francisco et al., 2010; Pellegrini et al., 2010). Los resultados obtenidos en este estudio concuerdan con

estos reportes. El contenido individual de GSL permaneció constante o disminuyó dependiendo del método y tiempo de cocción, pero no se encontró ningún patrón de comportamiento específico.

8.1.1.2.4. Contenido de ácidos hidroxicinámicos (HCA)

El principal HCA identificado fue el ácido sinápico y sus derivados. El contenido de HCA disminuyó un 40% (en promedio), luego de la cocción en todos los tratamientos, y permaneció constante después de 2 días de almacenamiento refrigerado (**Figura 8. 3**). Los HCA pertenecen al grupo de compuestos fenólicos, cuya baja estabilidad a las altas temperaturas ha sido vastamente reportada. Por esta razón es que su pérdida se atribuye a la degradación térmica. Las condiciones empleadas en este estudio mostraron una mejor retención de estos compuestos si se compara con otros resultados de la literatura. Por ejemplo, Vallejo et al. (2003) cocinaron floretes de brócoli en horno microondas (1000 W, 5 min) obteniendo una disminución en el contenido de HAC de 74%. En ese trabajo se utilizó agua para la cocción, por lo que las pérdidas se atribuyen al fenómeno de lixiviación. Pellegrini et al. (2010) cocinaron floretes de brócoli (300 W, 30 min) sin usar agua, y reportaron pérdidas de HCA del 72% respecto a los floretes crudos, que se explica por el excesivo tiempo de cocción aplicado (Guo et al., 2017a). La degradación térmica parece ser el principal factor que afecta a la estabilidad de los HCA, ya que a pesar de no utilizar agua para la cocción (se reduce el efecto de lixiviación) las pérdidas son significativas.

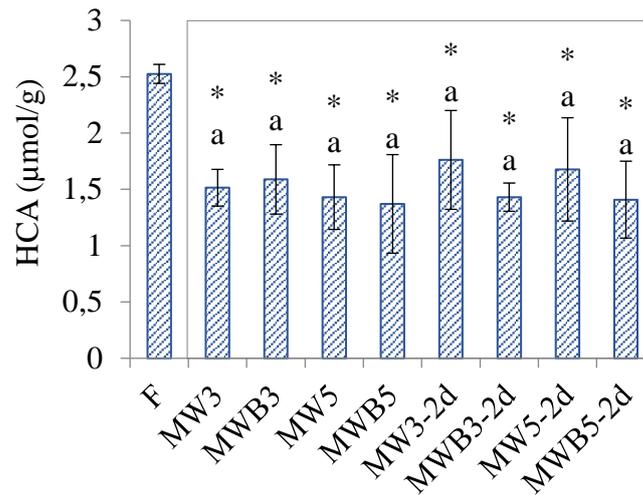


Figura 8. 3. Contenido de ácidos hidroxicinámicos (HCA) ($\mu\text{mol/g}$). Floretes de brócoli procesados domésticamente: frescos (F), cocinados por MW bajo diferentes condiciones (MW3: convencional por 3 min, MW5: convencional por 5 min, MWB3: en bolsa por 3 min, MWB5: en bolsa por 5 min) y cocidos y almacenados a 4°C durante 2 días (sufijo “-2d”). Los resultados se expresan como el promedio \pm desviación estándar ($n = 3$). Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos (Test de Tukey, $p < 0,05$). “*” indica diferencias significativas entre tratamiento y la muestra fresca (F) (Test de Dunnett, $\alpha = 0,05$).

8.1.1.2.5. Análisis microbiológico

No se observó efecto del tiempo ni del método de cocción en el recuento de mohos y levaduras. En todos los casos, el recuento se redujo desde $5,2 \times 10^2$ ufc/g (previo a la cocción) a $< 10^2$ ufc/g. Además, no se observó incremento significativo del recuento de mohos y levaduras luego de dos días de almacenamiento refrigerado.

Los recuentos de bacterias mesófilas mostraron diferencias significativas según el tiempo y método de cocción (**Figura 8. 4 - A**). Los tiempos de cocción más largos presentaron recuentos más bajos. La cocción en bolsas de microondas mostró una mayor reducción de bacterias mesófilas respecto a la cocción convencional en MW. Esto se atribuye a las mayores temperaturas alcanzadas por el producto durante la cocción en bolsas microondables. El recuento de bacterias mesófilas no aumentó en el producto cocido tras dos días de almacenamiento refrigerado.

Resultados análogos se obtuvieron para bacterias psicrófilas. El aumento del tiempo de cocción redujo significativamente el recuento. Para 5 min, brócolis cocinados en

bolsa (MWB5) presentaron menores recuentos respecto a brócolis cocinados convencionalmente (MW5). Sin embargo, no se obtuvieron diferencias entre los métodos de cocción para tiempos de 3 minutos (MW3 y MWB3) (**Figura 8.4 - B**). Se infiere que para tiempos de cocción cortos no hay un impacto significativo del método de cocción (y de la temperatura del producto) en el recuento de este tipo de bacterias. En general, el almacenamiento durante dos días no mostró crecimiento de bacterias psicrófilas (excepto en las muestras MW5).

En general, la cocción en bolsas de microondas mostró una mayor reducción de la carga microbiana respecto a la cocción convencional. Esto podría atribuirse a las mayores temperaturas alcanzadas por el producto en este método de cocción. Por otro lado, tiempos de cocción más largos mostraron una mayor reducción, que también podría vincularse con mayores temperaturas del producto y a un mayor tiempo de proceso. En general, no se observó crecimiento microbiano tras dos días de almacenamiento refrigerado.

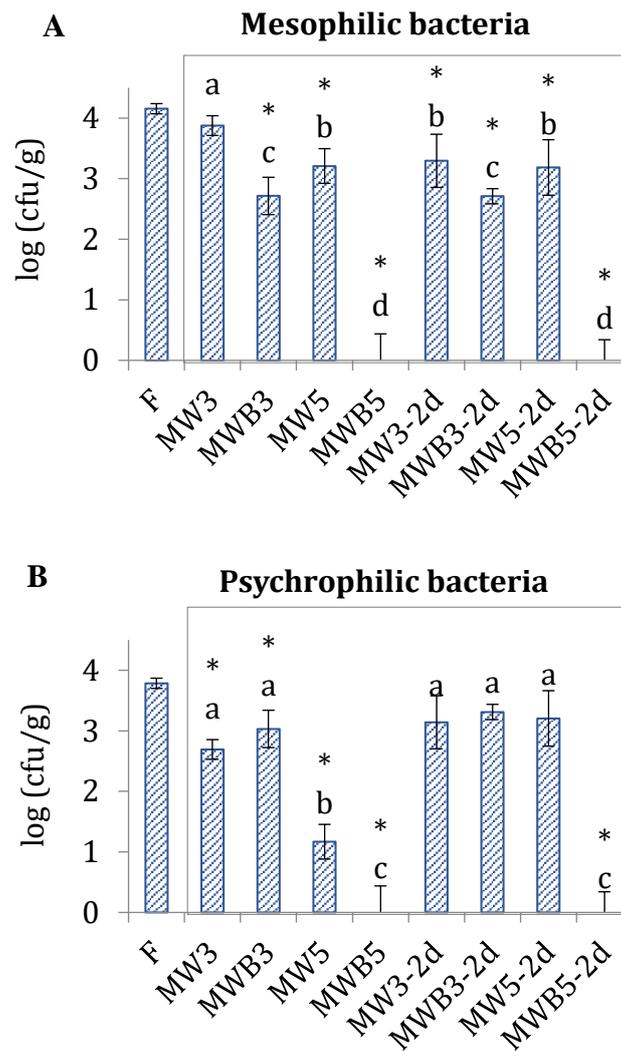


Figura 8. 4. Valor medio del log ufc/g para bacterias aerobias mesófilas y psicrófilas en floretes de brócoli: frescos (F), cocinados por MW bajo diferentes condiciones (MW3: convencional por 3 min, MW5: convencional por 5 min, MWB3: en bolsa por 3 min, MWB5: en bolsa por 5 min) y cocidos y almacenados a 4°C durante 2 días (sufijo “-2d”). Los resultados se expresan como el promedio \pm desviación estándar ($n = 3$). Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos (Test de Tukey, $p < 0,05$). “*” indica diferencias significativas entre tratamiento y la muestra fresca (F) (Test de Dunnett, $\alpha = 0,05$).

8.1.2. Caso de estudio: brócoli procesado industrialmente

8.1.2.1. Diseño experimental

El diseño experimental fue análogo al planteado en 8.1.1. Los floretes de brócoli mínimamente procesados (Verdisfresh - Grupo Alimentario Citrus, Valencia, España) se cocinaron dentro de su envase (bolsa microondable) en un horno MW

doméstico, durante 3 y 5 minutos. Floretes cocinados en las mismas condiciones, pero sin bolsa, fueron usados como control (**Figura 8. 5**). Se tomaron muestras de brócoli antes y después de la cocción y se determinó: pérdida de peso (WL), temperatura del producto inmediatamente después de la cocción y contenido de GSL y HCA. Además, a modo de evaluar el efecto de otros parámetros de calidad bioactiva/nutricional de interés, se determinó capacidad antioxidante (método de ORAC y DPPH) y contenido de minerales.

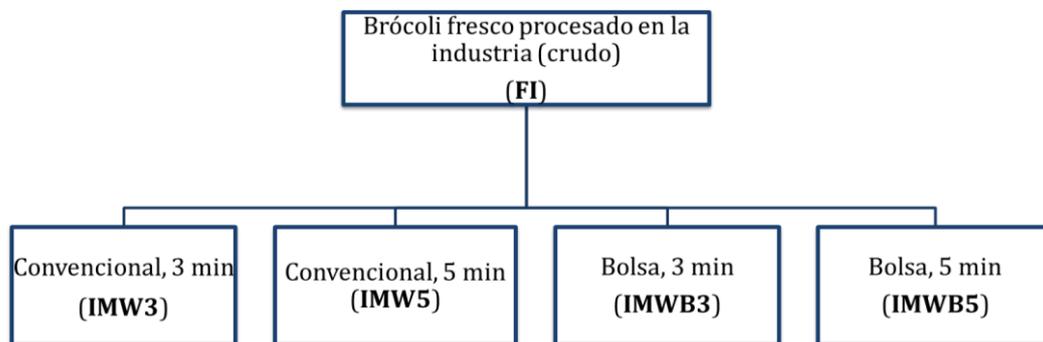


Figura 8. 5. Esquema del diseño experimental para evaluar el efecto de la cocción en microondas sobre la calidad de floretes de brócoli (cv. Parthenon) procesados industrialmente, y nomenclatura utilizada para referirse a cada tratamiento.

8.1.2.2. Resultados y discusión

8.1.2.2.1. Pérdida de peso y temperatura del producto después de la cocción

Los resultados coinciden con los obtenidos en el experimento anterior (8.1.1). Brócolis cocinados en bolsa mostraron una pérdida de peso (WL) significativamente menor ($4,1 \pm 1,1 \%$ y $12,2 \pm 0,0 \%$ para IMWB3 y IMWB5 respectivamente) respecto a brócolis cocinados convencionalmente ($20,9 \pm 0,0 \%$ y $33,5 \pm 0,0 \%$ para IMW3 e IMW5 respectivamente). Un mayor tiempo de cocción provocó mayores WL en ambos métodos de cocción. Por lo tanto, este segundo experimento confirma que la cocción en bolsas de microondas reduce la WL de floretes de brócoli durante la cocción respecto a la cocción convencional.

Al igual que en el experimento anterior, la temperatura del producto tras la cocción fue significativamente superior en la cocción en bolsas de MW ($96,0 \pm 0,0 \text{ }^\circ\text{C}$) que en la cocción convencional ($87,0 \pm 0,0 \text{ }^\circ\text{C}$ y $92,0 \pm 0,0 \text{ }^\circ\text{C}$ para IMW3 e IMW5

respectivamente). Nuevamente se observó que el tiempo de cocción tuvo un efecto significativo en la temperatura del producto en la cocción convencional, pero no durante la cocción en bolsa donde la temperatura del producto alcanzó el mismo valor independientemente del tiempo de cocción ($96,0 \pm 0,0$ °C).

8.1.2.2.2. Contenido de GSL

Los resultados coinciden con los obtenidos en el experimento realizado sobre brócolis procesados domésticamente (8.1.1). Floretes de brócoli cocinados de forma convencional durante 3 min (IMW3) mantuvieron el contenido total de GSL, mientras que el mismo método de cocción durante 5 min (IMW5) mostró una pérdida significativa de GSL respecto al brócoli fresco (**Figura 8. 6**). Brócolis cocinados en bolsa de microondas mantuvieron el mismo contenido de GSL que el brócoli fresco, y no se observaron diferencias significativas entre tiempos de cocción. Por lo tanto, se concluye que la cocción en bolsas de microondas podría reducir la pérdida de GSL totales debido a una reducción en la evaporación. Además, se destaca como resultado que las pérdidas por volatilización predominarían sobre las pérdidas por degradación térmica, ya que el brócoli cocinado en bolsa de microondas alcanzó mayores temperaturas, a la vez que presentó mayor retención de GSL respecto al brócoli cocinado convencionalmente. Por lo tanto, el fenómeno de volatilización podría ser la causa predominante de las pérdidas de GSL durante la cocción por MW. En la literatura se reportan como principales causas de pérdida de GSL durante la cocción: lixiviación, degradación enzimática y térmica, pero el fenómeno de volatilización se menciona escasamente (Armesto et al., 2019; Campos et al., 2019; Guo et al., 2017a; Pellegrini et al., 2010; Tabart et al., 2018; Vallejo et al., 2003a; Zhao et al., 2019). Como nueva contribución este trabajo muestra que el uso de bolsas para microondas podría reducir las pérdidas de GSL totales en comparación con la cocción convencional por MW, probablemente debido a la reducción de la evaporación.

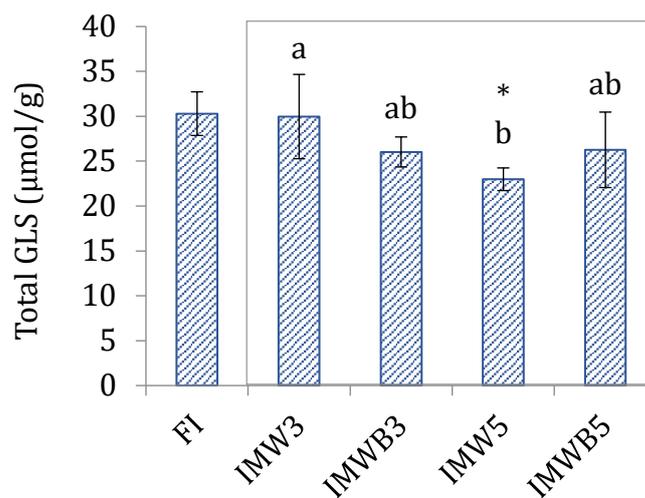


Figura 8. 6. Contenido total de GSL ($\mu\text{mol/g}$) en floretes de brócoli procesados industrialmente: frescos (FI) y cocinados por MW bajo diferentes condiciones (IMW3: convencional por 3 min, IMW5: convencional por 5 min, IMWB3: en bolsa por 3 min, IMWB5: en bolsa por 5 min). Los resultados se expresan como el promedio \pm desviación estándar ($n = 3$). Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos (Test de Tukey, $p < 0,05$). “*” indica diferencias significativas entre tratamiento y la muestra fresca (F) (Test de Dunnett, $\alpha = 0,05$).

8.1.2.2.3. Contenido de GSL individuales

Los resultados fueron similares a los obtenidos con brócoli procesado domésticamente (8.1.1). El perfil de GSL no mostró diferencias entre muestras frescas y cocidas, independientemente del método y tiempo de cocción aplicado. El contenido individual de GSL se muestra en la **Tabla 8S. 2** dentro de la sección de Material suplementario.

8.1.2.2.4. Contenido de HCA

Los resultados obtenidos usando brócoli procesado industrialmente (**Figura 8. 7**) fueron levemente diferentes a los obtenidos usando brócoli procesado domésticamente (8.1.1). Durante la cocción de 3 minutos, el brócoli cocinado convencionalmente mantuvo el contenido de HCA, mientras que el brócoli cocinado en bolsa mostró una disminución de estos compuestos en comparación con el brócoli fresco. Un tiempo de cocción de 5 min redujo significativamente el contenido

de HCA, independientemente del método de cocción aplicado. Las pérdidas fueron del 50% (en promedio) respecto al brócoli fresco, semejantes a las obtenidas en el experimento anterior (8.1.1). Las pérdidas significativas de HCA se obtuvieron en las muestras que alcanzaron mayores temperaturas después de la cocción (IMW5, IMWB3 e IMWB5), por lo que dichas pérdidas se atribuyen a la degradación térmica. Por lo tanto, la cocción en bolsa aumentó las pérdidas de HCA, debido a la mayor temperatura que alcanza el producto con este método respecto a la cocción convencional. La termo sensibilidad de los fenoles ha sido ampliamente reportada, y se ha informado degradación o transformación como fenómenos responsables de las pérdidas de HCA en tejidos vegetales (Ruiz et al., 2018).

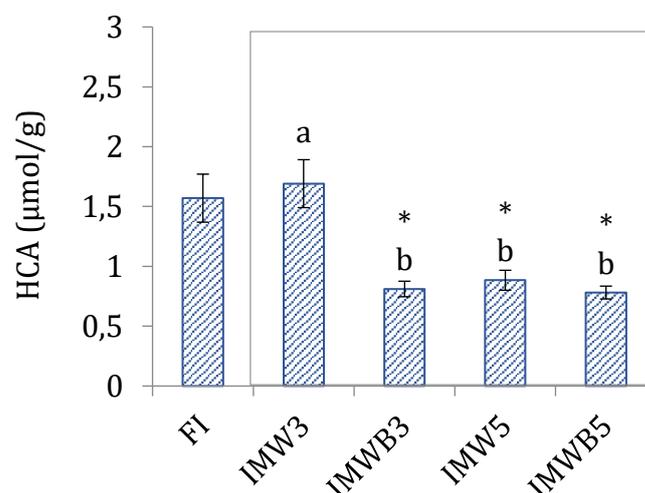


Figura 8. 7. Contenido de HCA ($\mu\text{mol/g}$). Floretes de brócoli procesados industrialmente: frescos (FI) y cocinados por MW bajo diferentes condiciones (IMW3: convencional por 3 min, IMW5: convencional por 5 min, IMWB3: en bolsa por 3 min, IMWB5: en bolsa por 5 min). Los resultados se expresan como el promedio \pm desviación estándar ($n = 3$). Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos (Test de Tukey, $p < 0,05$). "*" indica diferencias significativas entre tratamiento y la muestra fresca (F) (Test de Dunnett, $\alpha = 0,05$).

8.1.2.2.5. Capacidad antioxidante (AOC)

Los resultados obtenidos en la determinación por ORAC no mostraron diferencias significativas entre métodos y tiempos de cocción. La AOC se mantuvo en $92,0 \pm 13,0$ $\mu\text{mol/g}$ (en promedio) tanto en el brócoli fresco como en el cocinado bajo diferentes

condiciones. Estos resultados concuerdan con lo reportado por otros autores quienes no observaron pérdidas de la AOC en brócolis cocidos por MW (dos Reis et al., 2015; Zhong et al., 2015). Zhong et al. (2015) encontraron que la AOC (determinada por ORAC) de los floretes de brócoli cocinados en MW convencional y en bolsa se conservó o aumentó, respectivamente. Estos resultados se explicaron por un equilibrio entre las pérdidas de compuestos debido al proceso de calentamiento y el aumento de AOC debido a la liberación de compuestos antioxidantes de la matriz vegetal y la formación de nuevos compuestos antioxidantes (Zhong et al., 2015).

En la determinación de la AOC por el método de DPPH, si se obtuvieron diferencias significativas entre métodos de cocción (**Figura 8. 8**). En el brócoli cocinado de forma convencional, la AOC se redujo en un 41% y 75% durante 3 y 5 minutos de cocción, respectivamente. En el brócoli cocinado en bolsa, la AOC redujo en un 50%, independientemente del tiempo de cocción. Por lo tanto, para tiempo de 5 min la cocción en bolsa permitió retener la AOC en mayor medida que en la cocción convencional. Estos resultados concuerdan con Zhong et al., (2015), quienes reportaron que el brócoli cocido en bolsas microondables presentó una AOC más alta en comparación con el cocinado en MW convencional. Sin embargo, nuestros hallazgos muestran una disminución significativa en la AOC durante la cocción, mientras que Zhong et al. (2015) observaron un aumento. Por otra parte, nuestros resultados concuerdan con los de Pellegrini et al. (2010), quienes concluyeron que el MW tuvo un efecto perjudicial en la AOC. Las discrepancias entre los estudios pueden deberse a varios factores, como eficiencias de extracción, condiciones de cocción, tamaño del corte, entre otros. La pérdida de AOC después de la cocción se atribuye principalmente a la difusión por la lisis celular y la degradación térmica de los compuestos con AOC (Soares et al., 2017). La mejor retención de AOC en la cocción en bolsa de microondas (para un tiempo de cocción de 5 min) podría estar relacionada con la retención de compuestos al reducir la tasa de evaporación. Sin embargo, se deben realizar otros estudios para identificar cuál es el efecto de la bolsa de microondas sobre este tipo de compuestos.

Las conclusiones obtenidas son diferentes en función del método de determinación de AOC empleado. Esto se debe principalmente a la diversidad de compuestos que

contribuyen al AOC y a la complejidad de este tipo de matriz alimentaria (Floegel et al., 2011; Ou et al., 2002). Este trabajo confirma que la AOC de matrices complejas como los vegetales debe analizarse mediante más de un método, y que la interpretación de resultados debe hacerse con precaución.

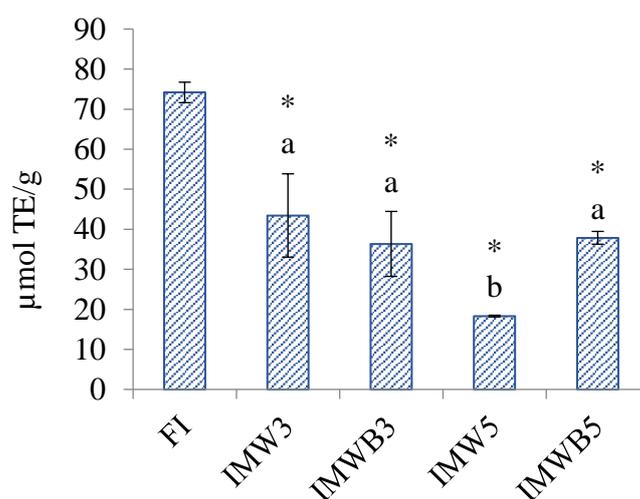


Figura 8. 8. Capacidad antioxidante determinada por DPPH ($\mu\text{mol TE/g}$). Floretes de brócoli procesados industrialmente: frescos (FI) y cocinados por MW bajo diferentes condiciones (IMW3: convencional por 3 min, IMW5: convencional por 5 min, IMWB3: en bolsa por 3 min, IMWB5: en bolsa por 5 min). Los resultados se expresan como el promedio \pm desviación estándar ($n = 3$). Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos (Test de Tukey, $p < 0,05$). “*” indica diferencias significativas entre tratamiento y la muestra fresca (F) (Test de Dunnett, $\alpha = 0,05$).

8.1.2.2.6. Minerales

No se encontraron diferencias significativas en el contenido de minerales entre brócolis frescos y cocidos, independientemente del método y tiempo de cocción. El contenido de minerales de las muestras se informa en la sección de Materiales suplementarios (**Tabla 8S. 3**). En la literatura existen resultados contradictorios respecto a los cambios en el contenido de minerales de verduras cocinadas por MW. Algunos estudios han reportado pérdidas de minerales después de calentar por MW diferentes matrices vegetales (Ali, 2015; Lima et al., 2019). Sin embargo, López-Berenguer et al. (2007) reportaron una alta retención de minerales en brócoli

cocinado en MW en diferentes condiciones. En el presente estudio se encontró que el contenido de minerales del brócoli se mantuvo estable, coincidiendo con los resultados de López-Berenguer et al. (2007). No utilizar agua para la cocción podría explicar la conservación de minerales durante este proceso de cocción (Lima et al., 2019).

8.1.3. Conclusiones parciales

Este es el primer estudio que informa el efecto de la cocción por microondas en bolsas microondables sobre los principales compuestos bioactivos de floretes de brócoli.

Los resultados fueron equivalentes en los dos casos de estudio, utilizando brócoli procesado domésticamente e industrialmente.

Para tiempos de cocción de 5 minutos, floretes cocinados en bolsa retuvieron mayormente el contenido total de glucosinolatos y capacidad antioxidante (determinada por el ensayo DPPH) en comparación con el brócoli cocinado convencionalmente. Los resultados sugieren que la volatilización de los glucosinolatos predomina sobre la degradación térmica. El contenido de ácidos hidroxicinámicos se redujo durante la cocción, independientemente del método y tiempo aplicado, pareciendo ser la degradación térmica el fenómeno predominante en la pérdida de estos compuestos.

Los resultados muestran que la cocción en bolsas para microondas puede ser un método de cocción beneficioso para conservar el potencial bioactivo de los floretes de brócoli, siendo además un método rápido y fácil, satisfaciendo las necesidades de los consumidores modernos.

Se debe considerar la realización de más estudios para determinar el efecto de la cocción en bolsas sobre los atributos sensoriales y el contenido de posibles compuestos nocivos.

8.1.4. Material suplementario

Tabla 8S. 1. GSL intactos identificados en floretes de brócoli (*Brassica oleracea* var. *Italica* cv. Parthenon) en ESI modo de polaridad negativo Rt=tiempo de retención.

Código	Glucosinolato	Clase	Rt (min)	[M-H] ⁻ (m/z)	MS2 y MS3
GIB	Glucoiberina	alifático	4.4	422	
GRA	Glucorafanina	alifático	5.2	436	
HGB	4-Hidroxiglucobrasicina	indólico	8.1	463	259, 97
GB	Glucobrasicina	indólico	16.6	447	
GST	Gluconasturtina	aromático	19.5	422	
MGB	4-Metoxiglucobrasicina	indólico	19.8	477	
NGB	Neoglucobrasicina	indólico	21.1	477	447, 259, 97

Tabla 8S. 2. Contenido de GSL individuales ($\mu\text{mol/g}$) de brócoli fresco y brócoli cocinado por microondas bajo diferentes condiciones. Los datos se expresan como el promedio \pm desviación estándar (n=3).

Código de la muestra	GIB	GRA	HGB	GB	GST	MGB	NGB
F	11.70 \pm 0.62	2.97 \pm 0.51	2.22 \pm 0.12	5.27 \pm 0.32	1.94 \pm 0.12	1.11 \pm 0.13	6.78 \pm 0.91
MW3	10.14 \pm 1.75	3.22 \pm 0.35	2.18 \pm 0.17	4.98 \pm 0.60	2.04 \pm 0.16	1.10 \pm 0.09	5.33 \pm 0.63
MW5	7.39 \pm 0.81	2.94 \pm 0.05	1.92 \pm 0.11	4.57 \pm 0.23	1.79 \pm 0.09	1.02 \pm 0.04	6.80 \pm 0.31
MWB3	7.90 \pm 0.70	3.31 \pm 0.21	2.26 \pm 0.13	4.96 \pm 0.69	2.17 \pm 0.10	1.02 \pm 0.13	5.23 \pm 0.91
MWB5	10.01 \pm 1.51	4.10 \pm 0.58	2.21 \pm 0.24	4.80 \pm 0.78	3.12 \pm 0.82	1.01 \pm 0.19	6.22 \pm 1.83
MW3-2d	8.03 \pm 0.63	3.72 \pm 0.24	1.97 \pm 0.18	4.09 \pm 0.35	1.73 \pm 0.12	0.88 \pm 0.05	4.23 \pm 0.43
MW5-2d	6.20 \pm 0.80	3.92 \pm 0.47	2.18 \pm 0.17	4.73 \pm 0.76	2.18 \pm 0.22	1.06 \pm 0.16	4.93 \pm 1.13
MWB3-2d	7.75 \pm 1.74	4.26 \pm 0.48	1.87 \pm 0.11	4.31 \pm 0.26	1.77 \pm 0.01	0.81 \pm 0.03	4.48 \pm 0.48
MWB5-2d	6.60 \pm 0.35	4.13 \pm 0.28	2.11 \pm 0.08	4.64 \pm 0.30	2.24 \pm 0.07	0.92 \pm 0.06	4.49 \pm 0.23

Tabla 8S. 2. Continuación.

Código de la muestra	GIB	GRA	HGB	GB	GST	MGB	NGB
IF	9.37 ± 0.73	8.18 ± 0.93	2.14 ± 0.24	3.86 ± 0.37	1.73 ± 0.13	0.85 ± 0.03	4.16 ± 0.12
IMW3	10.16 ± 1.59	8.58 ± 1.44	2.23 ± 0.31	3.49 ± 0.21	1.81 ± 0.26	0.98 ± 0.16	2.72 ± 0.39
IMW5	4.95 ± 0.03	7.83 ± 0.26	1.73 ± 0.03	2.95 ± 0.21	1.40 ± 0.08	0.78 ± 0.03	3.35 ± 0.17
IMWB3	9.39 ± 0.43	7.59 ± 0.24	1.94 ± 0.03	2.86 ± 0.35	1.62 ± 0.17	0.75 ± 0.10	1.86 ± 0.72
IMWB5	8.25 ± 2.00	8.23 ± 1.76	1.87 ± 0.28	2.98 ± 0.55	1.60 ± 0.21	0.80 ± 0.18	2.54 ± 0.46

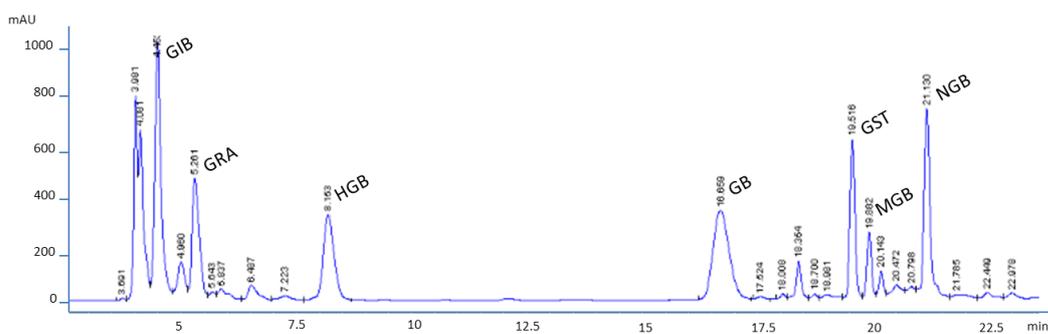


Figura 8S. 1. HPLC-DAD cromatograma del prefill de GSL para floretes de brócoli frescos (*Brassica oleracea* var. *Italica* cv. Parthenon). Detección at 227 nm. Picos: glucoiberina (GIB), glucorafanina (GRA), 4-hidroxi glucobrasicina (HGB), glucobrasicina (GB), gluconasturtina (GST), 4-metoxi glucobrasicina (MGB), neoglucobrasicina (NGB).

Tabla 8S. 3. Contenido de minerales en brócoli (*Brassica oleracea* var. *italica* cv. Parthenon) procesado industrialmente: fresco y cocinado por microondas bajo diferentes condiciones. Los datos se expresan como el promedio \pm desviación estándar (n=3).

Tratamiento	P (g/100g)	K (g/100g)	Na (g/100g)	Ca (g/100g)	Mg (g/100g)	Fe (mg/Kg)	Mn (mg/Kg)	Zn (mg/Kg)	Cu (mg/Kg)	B (mg/Kg)
IF	0.74 \pm 0.02	2.7 \pm 0.1	0.23 \pm 0.01	0.36 \pm 0.01	0.19 \pm 0.01	53 \pm 1	40 \pm 1	62 \pm 4	5.6 \pm 0.4	25 \pm 1
IMW3	0.71 \pm 0.14	2.7 \pm 0.1	0.21 \pm 0.01	0.40 \pm 0.02	0.19 \pm 0.01	51 \pm 2	38 \pm 1	45 \pm 1	4.5 \pm 0.2	27 \pm 1
IMW5	0.70 \pm 0.03	2.8 \pm 0.1	0.15 \pm 0.01	0.36 \pm 0.01	0.20 \pm 0.01	51 \pm 1	36 \pm 1	55 \pm 3	5.8 \pm 0.1	26 \pm 1
IMWB3	0.79 \pm 0.09	2.7 \pm 0.1	0.19 \pm 0.01	0.32 \pm 0.02	0.18 \pm 0.01	54 \pm 2	33 \pm 1	45 \pm 2	4.6 \pm 0.7	25 \pm 1
IMWB5	0.68 \pm 0.09	2.8 \pm 0.1	0.20 \pm 0.05	0.37 \pm 0.01	0.19 \pm 0.01	58 \pm 11	37 \pm 3	47 \pm 2	4.7 \pm 0.4	26 \pm 2

CAPÍTULO 9.

Conclusiones finales

De los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral, se han extraído las siguientes conclusiones en relación con los objetivos establecidos, siendo consideradas las más relevantes del trabajo:

Primera. A temperaturas entre 2 y 4°C, se observó que modificaciones leves de la atmósfera (14 – 20 kPa O₂ y 0,9 – 5 kPa CO₂) permiten mantener la calidad del brócoli (externa, organoléptica y bioactiva) y extender su vida útil, sin necesidad de modificaciones drásticas y riesgosas de la atmósfera interior.

Segunda. En general, se puso de manifiesto que la modificación de la atmósfera tiene un efecto más significativo cuando las temperaturas de almacenamiento son superiores a las recomendadas (>4°C). Esto nos permite concluir que el envasado en atmósfera modificada ayuda a mitigar los efectos negativos sobre la calidad, provocados por temperaturas de almacenamiento inadecuadas.

Tercera. Con esta Tesis Doctoral se ha demostrado que la incorrecta selección del material de envasado puede disminuir significativamente la calidad y vida útil de floretes de brócoli, incluso en comparación con el almacenamiento sin modificación de la atmósfera.

Cuarta. El envasado en films microperforados permitió extender la vida útil de floretes de brócoli y conservar sus componentes bioactivos en un rango amplio de temperaturas de almacenamiento (2 –12°C). Además, evitó el riesgo y generación de anaerobiosis a temperaturas de almacenamiento por encima de las recomendadas (>4°C). La selección del nivel de perforación del film resultó un factor relevante para la conservación de color, apariencia externa, firmeza y contenido de glucosinolatos del brócoli.

Quinta. Se evaluó la idoneidad de un nuevo bioplástico compostable (Nature Fresh®), basado en ácido láctico y tereftalato adipato de polibutileno, para su aplicación en el envasado de cabezas de brócoli. Brócolis envasados en Nature Fresh® presentaron una vida útil de 21 días (a 2 °C) y una evolución similar en la mayoría de los parámetros de calidad respecto a brócolis envasados en polietileno de baja densidad. La principal limitante del uso de Nature Fresh® fue la mayor pérdida de masa y firmeza del producto.

Sexta. Se evaluó la idoneidad de un film a base de celulosa (NatureFlex™) para su aplicación en el envasado de floretes de brócoli. El film NatureFlex™ sin perforar resultó inadecuado debido a la alta pérdida de masa del producto y las concentraciones de O₂ y CO₂ establecidas dentro del envase, que causaron un rápido deterioro de la calidad de los floretes. El NatureFlex™ perforado resultó ser una alternativa viable para el envasado de floretes de brócoli. Permitió establecer concentraciones de O₂ y CO₂ adecuadas, redujo la condensación de agua dentro del envase y el crecimiento microbiano, y los floretes presentaron mayores contenidos de glucosinolatos respecto a floretes envasados en polipropileno. Las desventajas radicaron en la mayor pérdida de masa y firmeza de los floretes.

Séptima. El estudio sobre el efecto de las condiciones de almacenamiento sobre la actividad mirosinasa (Myr) deja planteadas las siguientes hipótesis como retos para investigaciones futuras:

- La pérdida de agua podría afectar la estructura enzimática y disminuir la actividad Myr.
- En condiciones de refrigeración y envasado en atmósfera modificada, la actividad Myr podría disminuir. El aumento de temperatura podría desencadenar otros mecanismos, que enmascaren el efecto de la composición de la atmósfera sobre la actividad Myr.
- Una actividad Myr más alta en brócoli en refrigeración podría acelerar la pérdida de glucosinolatos.

Octava. Para tiempos de cocción de 5 minutos, la cocción en bolsas para microondas permitió mantener un mayor contenido total de glucosinolatos y de capacidad antioxidante (DPPH) en comparación con el cocinado sin bolsa. La pérdida de glucosinolatos durante la cocción en microondas podría deberse al fenómeno de volatilización. La utilización de bolsas para microondas puede ser un método de cocinado eficaz para conservar el potencial saludable de los floretes de brócoli, siendo además un método rápido y fácil que satisface las necesidades de los consumidores modernos.

CAPÍTULO 10.

Producción científica

10.1. Publicaciones científicas

Las publicaciones científicas generadas por la presente Tesis Doctoral son:

Publicación 1 (artículo científico)

Título: Effect of temperature on nutritional compounds and shelf life of ready-to-eat broccoli florets packaged in passive modified atmosphere.

Autores: **Erika Paulsen**, Sofía Barrios, Nieves Baenas, Diego A. Moreno, Horacio Heinzen y Patricia Lema.

Revista: Postharvest Biology and Technology

Publicación: (2018) 139, 125-133.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2018.01.006>

Publicación 2 (artículo científico)

Título: Influence of microwave bag vs. conventional microwave cooking on phytochemicals of industrially and domestically processed broccoli.

Autores: **Erika Paulsen**, Diego A. Moreno, Paula M. Periago y Patricia Lema.

Revista: Food Research International

Publicación: (2021) 140, 110077.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.110077>

Publicación 3 (artículo científico)

Título: Use of PLA/PBAT stretch-cling film as an ecofriendly alternative for individual wrapping of broccoli heads.

Autores: **Erika Paulsen**, Patricia Lema, Domingo Martínez-Romero y Cristina García-Viguera.

Revista: Scientia Horticulturae

Publicación: (2022) 304, 111260.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2022.111260>

Publicación 4 (artículo científico)

Título: Bioactive compounds of Broccoli florets as affected by packaging micro-perforations and storage temperature.

Autores: **Erika Paulsen**, Diego A. Moreno, Domingo Martínez-Romero y Cristina García-Viguera.

Revista: Coatings

Publicación: (2023) 13(3), 568

DOI: <https://doi.org/10.3390/coatings13030568>

10.2. Comunicaciones en congresos

Se ha realizado la difusión de los resultados generados en la presente Tesis Doctoral. A continuación, se listan los trabajos presentados en congresos:

Ponencia 1 (póster y publicación en actas)

Congreso: 8th Workshop on Agri-food Research for young researchers.
Título: Alternativas de conservación y procesado para mantener las propiedades nutricionales del brócoli.
Autores: **Erika Paulsen**, Patricia Lema, Diego A. Moreno, Pablo S. Fernández.
Publicación: Mayo, 2019. Cartagena, España. <http://hdl.handle.net/10317/8367>

Ponencia 2 (póster)

Congreso: 5º Jornadas Doctorales de la Universidad de Murcia.
Título: Efecto del material de envasado en la calidad y vida útil de floretes de brócoli mínimamente procesados.
Autores: **Erika Paulsen**, Diego A. Moreno, Patricia Lema, Pablo S. Fernández.
Publicación: Mayo, 2019. Murcia, España.

Ponencia 3 (póster)

Congreso: 9º Simposio de Internacional de Innovación y Desarrollo de Alimentos. Innova.
Título: Efecto de la composición gaseosa y la temperatura sobre la tasa respiratoria de tomate cherry, brócoli, lechuga y tomate.
Autores: Sylvia Schenck, **Erika Paulsen**, Patricia Burzaco, Sofía Barrios, Patricia Lema
Publicación: Octubre, 2019. Montevideo, Uruguay.

Ponencia 4 (presentación oral y publicación en actas)

Congreso: 9th Workshop on Agri-food Research for young researchers.
Título: Efecto del cocinado de floretes de brócoli en bolsas de microondas sobre la retención de compuestos bioactivos.
Autores: **Erika Paulsen**, Diego A. Moreno, Patricia Lema.
Publicación: Julio, 2020. Cartagena, España. <http://hdl.handle.net/10317/9241>

Ponencia 4 (póster)

Congreso: 33th EFFoST
Título: Ready-to-eat broccoli cooked in microwave bags: The influence of processing on phytochemical retention revisited.
Autores: **Erika Paulsen**, Diego A. Moreno, Patricia Lema.
Publicación: Octubre, 2020. Tel Aviv, Israel (on-line)

Ponencia 6 (póster)

Congreso: 10º Simposio de Internacional de Innovación y Desarrollo de Alimentos. Innova.
Título: Evolución de la calidad de cabezas de brócoli envasadas en film de ácido poliláctico (2021)
Autores: **Erika Paulsen**, Patricia Lema, Domingo Martínez-Romero y Cristina García-Viguera.
Publicación: Octubre, 2021. Montevideo, Uruguay.

Ponencia 7 (presentación oral y publicación en actas)

Congreso: 10th Workshop on Agri-food Research for young researchers.
Título: Calidad y Seguridad Microbiológica del Brócoli Cocinado en Microondas.
Autores: **Erika Paulsen**, Diego A. Moreno, Paula M. Periago y Patricia Lema.
Publicación: Junio, 2021. Cartagena, España. <http://hdl.handle.net/10317/10662>

Ponencia 8 (póster)

Congreso: 35th EFFoST
Título: Quality evolution of minimally processed broccoli packaged in PLA-based film.
Autores: **Erika Paulsen**, Sofía Barrios, Patricia Lema.
Publicación: Octubre, 2021. Lussane, Suiza.

Ponencia 9 (póster y publicación en actas)

Congreso: 2nd International Electronic Conference on Foods
Título: Cooking with microwave bags affects the quality of broccoli: easy-to-cook is a friend or foe?
Autores: **Erika Paulsen**, Diego A. Moreno, Paula M. Periago y Patricia Lema.
Publicación: Octubre, 2021. On-line.
DOI: doi.org/10.3390/Foods2021-11059

Ponencia 10 (presentación oral y publicación en actas)

Congreso: I Seminario Internacional de la Red CYTED ENVABIO100: OBTENCIÓN DE FILMS BIODEGRADABLES DE ORIGEN 100% NATURAL PARA LA INDUSTRIA DE ALIMENTOS.
Título: Estudios en vida útil en frutas y hortalizas mínimamente procesadas
Autores: **Erika Paulsen**, Sofía Barrios, Patricia Lema.
Publicación: Junio, 2023. Asunción, Paraguay.
ISBN: 978-99925-3-858-6

Ponencia 11 (póster)

Congreso: ICEF14
Título: Cellulose-based film for vegetable packaging application: case study on broccoli
Autores: **Erika Paulsen**, Sofía Barrios, Patricia Lema.
Publicación: Noviembre, 2022. Nantes, Francia.

Ponencia 12 (presentación oral)

Congreso: 11º Simposio de Internacional de Innovación y Desarrollo de Alimentos. Innova.
Título: Film Compostable para el Envasado de Brócoli: Aspectos Positivos y Negativos en la Conservación de Calidad
Autores: **Erika Paulsen**, Sofía Barrios, Patricia Lema.
Publicación: Setiembre, 2023. Montevideo, Uruguay.

10.3. Producción científica adicional durante la etapa predoctoral

Además de las publicaciones científicas relacionadas directamente con la presente Tesis Doctoral, se realizaron colaboraciones adicionales que dieron lugar a las siguientes publicaciones científicas:

Publicación 1 (artículo científico)

Título: Effect of power ultrasound on quality of fresh-cut lettuce (cv.Vera) packaged in passive modified atmosphere.
Autores: Magdalena Irazoqui, **Erika Paulsen**, Sofía Barrios, Nicolás Pérez, Ricardo Faccio, Patricia Lema.
Revista: Food and Bioproducts Processing.
Publicación: (2019) 117, 138-148
DOI: doi.org/10.1016/j.fbp.2019.07.004

Publicación 2 (artículo científico)

Título: Ready-to-eat cherry tomatoes: passive modified atmosphere packaging conditions for shelf-life extension.
Autores: **Erika Paulsen**, Sofía Barrios, Patricia Lema.
Revista: Food Packaging and Shelf Life.
Publicación: (2019). 22, 100407
DOI: doi.org/10.1016/j.fpsl.2019.100407

Publicación 3 (capítulo de libro)

Título: Foods and supplements
Autores: **Erika Paulsen**, María E. Romero, Patricia Lema, María D. López, Cristina García-Viguera, Diego A. Moreno.
Libro: *Food Waste Recovery*
Publicación: (2020)
DOI: doi.org/10.1016/B978-0-12-820563-1.00008-1

Publicación 4 (artículo científico)

Título: Production of packaged ready-to-eat whole strawberries (cv. San Andreas): packaging conditions for shelf-life extension.
Autores: **Erika Paulsen**, Sofía Barrios, Patricia Lema.
Revista: Food Packaging and Shelf Life.
Publicación: (2021). 29, 100696
DOI: doi.org/10.1016/j.fpsl.2021.100696

Referencias

- + *Brócoli presenta su hoja de ruta para incrementar el consumo de brócoli y alcanzar los 5 kilos per cápita – masbrocoli.* (n.d.). Retrieved July 20, 2022, from <https://masbrocoli.com/web/brocoli-presenta-su-hoja-de-ruta-para-incrementar-el-consumo-de-brocoli-y-alcanzar-los-5-kilos-per-capita/>
- Abellán Victorio, Á. (2022). *Influencia de luces led en el perfil fitoquímico de brotes de crucíferas: estudio de bioaccesibilidad.* <https://doi.org/10.31428/10317/11390>
- Ahmadzadeh, S., & Khaneghah, A. M. (2020). Role of Green Polymers in Food Packaging. In *Encyclopedia of Renewable and Sustainable Materials*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-803581-8.10576-4>
- Ali, A. M. (2015). *Effect of Food Processing Methods on the Bioactive Compound of Cauliflower.* 93(1), 117–131.
- Alias, A. R., Wan, M. K., & Sarbon, N. M. (2022a). Emerging materials and technologies of multi-layer film for food packaging application: A review. *Food Control*, 136, 108875. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2022.108875>
- Alias, A. R., Wan, M. K., & Sarbon, N. M. (2022b). Emerging materials and technologies of multi-layer film for food packaging application: A review. *Food Control*, 136, 108875. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2022.108875>
- Almuhayawi, M. S., AbdElgawad, H., al Jaouni, S. K., Selim, S., Hassan, A. H. A., & Khamis, G. (2020). Elevated CO₂ improves glucosinolate metabolism and stimulates anticancer and anti-inflammatory properties of broccoli sprouts. *Food Chemistry*, 328, 127102. <https://doi.org/10.1016/j.FOODCHEM.2020.127102>
- Alojaly, H., & Benyounis, K. Y. (2020). Packaging With Plastics and Polymeric Materials. In *Reference Module in Materials Science and Materials Engineering*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-820352-1.00025-0>
- Alzamora, S., López-Malo, A., Tapia, M., & Welti-Chanes, J. (2016). Minimally Processed Foods. *Encyclopedia of Food and Health*, 767–771. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00470-0>
- AOAC 942.04-1942, *Chlorophyll in plants. Spectrophotometric meth - \$14.30 : AOAC Official Method.* (n.d.). Retrieved April 13, 2023, from http://www.aocofficialmethod.org/index.php?main_page=product_info&products_id=648
- Armesto, J., Gómez-Limia, L., Carballo, J., & Martínez, S. (2019). Effects of different cooking methods on the antioxidant capacity and flavonoid, organic acid and mineral contents of Galega Kale (*Brassica oleracea* var. *acephala* cv. Galega). *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 70(2), 136–149. <https://doi.org/10.1080/09637486.2018.1482530>
- Baenas, N., Abellán, Á., Rivera, S., Moreno, D. A., García-Viguera, C., & Domínguez-Perles, R. (2018). Foods and supplements. In *Polyphenols: Properties, Recovery, and Applications* (pp. 327–362). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813572-3.00010-5>
- Baenas, N., Francisco, M., Velasco, P., Cartea, M. E., Garcia-Viguera, C., & Moreno, D. A. (2016). Bioactive Compounds from Brassicaceae as Health Promoters. In N. Baenas, M. Francisco, P. Velasco, M. Elena Cartea, C. García-Viguera, & D. A. Moreno (Eds.), *Natural Bioactive Compounds from Fruits and Vegetables as Health Promoters Part II* (pp. 27–47). BENTHAM SCIENCE PUBLISHERS. <https://doi.org/10.2174/9781681082431116010005>
- Baenas, N., Francisco, M., Velasco, P., Elena Cartea, M., García-Viguera, C., & A.

- Moreno, D. (Eds.). (2016). Bioactive Compounds from Brassicaceae as Health Promoters. In *Natural Bioactive Compounds from Fruits and Vegetables as Health Promoters Part II* (pp. 27–47). BENTHAM SCIENCE PUBLISHERS. <https://doi.org/10.2174/9781681082431116010005>
- Baenas, N., Marhuenda, J., García-Viguera, C., Zafrilla, P., & Moreno, D. A. (2019). Influence of cooking methods on glucosinolates and isothiocyanates content in novel cruciferous foods. *Foods*, *8*(7), 1–9. <https://doi.org/10.3390/foods8070257>
- Baenas, N., Moreno, D. A., & García-Viguera, C. (2012). *Selecting Sprouts of Brassicaceae for Optimum Phytochemical*.
- Baenas, N., Piegholdt, S., Schloesser, A., Moreno, D. A., García-Viguera, C., Rimbach, G., & Wagner, A. E. (2016). Metabolic Activity of Radish Sprouts Derived Isothiocyanates in *Drosophila melanogaster*. *International Journal of Molecular Sciences* 2016, Vol. 17, Page 251, *17*(2), 251. <https://doi.org/10.3390/IJMS17020251>
- Baenas, N., Villaño, D., García-viguera, C., & Moreno, D. A. (2016). Optimizing elicitation and seed priming to enrich broccoli and radish sprouts in glucosinolates. *FOOD CHEMISTRY*, *204*, 314–319. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.02.144>
- Bahadoran, Z., Mirmiran, P., Hosseinpanah, F., Rajab, A., Asghari, G., & Azizi, F. (2012). Broccoli sprouts powder could improve serum triglyceride and oxidized LDL/LDL-cholesterol ratio in type 2 diabetic patients: A randomized double-blind placebo-controlled clinical trial. *Diabetes Research and Clinical Practice*, *96*(3), 348–354. <https://doi.org/10.1016/J.DIABRES.2012.01.009>
- Baldera Zubeldia, B., Nieto Jiménez, M., Valenzuela Claros, M. T., Mariscal Andrés, J. L., & Martín-Olmedo, P. (2016). Effectiveness of the cold chain control procedure in the retail sector in Southern Spain. *Food Control*, *59*, 614–618. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2015.06.046>
- Barakat, H., & Rohn, S. (2014). Effect of different cooking methods on bioactive compounds in vegetarian, broccoli-based bars. *Journal of Functional Foods*, *11*(C), 407–416. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.10.009>
- Barrios, S., Lema, P., & Lareo, C. (2014). Modeling Respiration Rate of Strawberry (cv. San Andreas) for Modified Atmosphere Packaging Design. *International Journal of Food Properties*, *17*(9), 2039–2051. <https://doi.org/10.1080/10942912.2013.784328>
- Beaudry, R. M. (2000). Responses of Horticultural Commodities to Low Oxygen: Limits to the Expanded Use of Modified Atmosphere Packaging. *HortTechnology*, *10*(3), 491–500. <https://doi.org/10.21273/HORTTECH.10.3.491>
- Belay, Z. A., Caleb, O. J., Mahajan, P. V., & Opara, U. L. (2018). Design of active modified atmosphere and humidity packaging (MAHP) for ‘wonderful’ pomegranate arils. *Food and Bioprocess Technology*, *11*(8), 1478–1494. <https://doi.org/10.1007/s11947-018-2119-0>
- Belay, Z. A., Caleb, O. J., & Opara, U. L. (2016). Modelling approaches for designing and evaluating the performance of modified atmosphere packaging (MAP) systems for fresh produce: A review. *Food Packaging and Shelf Life*, *10*, 1–15. <https://doi.org/10.1016/J.FPSL.2016.08.001>
- Bioplastics – European Bioplastics e.V.* (n.d.). Retrieved July 10, 2022, from <https://www.european-bioplastics.org/bioplastics/>

- BOE.es - BOE-A-2001-809 Real Decreto 3484/2000, de 29 de diciembre, por el que se establecen las normas de higiene para la elaboración, distribución y comercio de comidas preparadas. (n.d.). Retrieved December 25, 2022, from <https://www.boe.es/buscar/act.php?id=BOE-A-2001-809>
- Boerzhijin, S., Makino, Y., Hirai, M. Y., Sotome, I., & Yoshimura, M. (2020). Effect of perforation-mediated modified atmosphere packaging on the quality and bioactive compounds of soft kale (*Brassica oleracea* L. convar. *acephala* (DC) Alef. var. *sabellica* L.) during storage. *Food Packaging and Shelf Life*, 23(October 2019), 100427. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2019.100427>
- Bovi, G. G., Caleb, O. J., Ilte, K., Rauh, C., & Mahajan, P. V. (2018). *Impact of modified atmosphere and humidity packaging on the quality, off-odour development and volatiles of 'Elsanta' strawberries*. <https://doi.org/10.14279/depositonce-9721>
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). *Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity* (Vol. 28).
- Briassoulis, D., & Giannoulis, A. (2018). Evaluation of the functionality of bio-based food packaging films. *Polymer Testing*, 69(March 2018), 39–51. <https://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2018.05.003>
- Broccoli | Product guides | Postharvest Management of Vegetables. (n.d.). Retrieved July 20, 2022, from <https://www.postharvest.net.au/product-guides/broccoli/>
- Brown, W., Ryser, E., Gorman, L., Steinmaus, S., & Vorst, K. (2016). Transit temperatures experienced by fresh-cut leafy greens during cross-country shipment. *Food Control*, 61, 146–155. <https://doi.org/10.1016/j.FOODCONT.2015.09.014>
- Caleb, O. J., Ilte, K., Fröhling, A., Geyer, M., & Mahajan, P. V. (2016). Postharvest Biology and Technology Integrated modified atmosphere and humidity package design for minimally processed Broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*). *Postharvest Biology and Technology*, 121, 87–100. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2016.07.016>
- Campos, D., Aguilar-Galvez, A., García-Ríos, D., Chirinos, R., Limaymanta, E., & Pedreschi, R. (2019). Postharvest storage and cooking techniques affect the stability of glucosinolates and myrosinase activity of Andean mashua tubers (*Tropaeolum tuberosum*). *International Journal of Food Science and Technology*, 54(7), 2387–2395. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14150>
- Cartea, M. E., Francisco, M., Soengas, P., & Velasco, P. (2010). Phenolic Compounds in Brassica Vegetables. *Molecules*, 16(1), 251–280. <https://doi.org/10.3390/molecules16010251>
- Carter, E. C., Ohno, Y., Pointer, M. R., Robertson, A. R., Sève, R., Schanda, J. D., & Witt, K. (Eds.). (n.d.). *CIE 15-2004: Colorimetry*.
- Casajús, V., Civello, P., Martínez, G., Howe, K., Fish, T., Yang, Y., Thannhauser, T., Li, L., & Gómez Lobato, M. (2021). Effect of continuous white light illumination on glucosinolate metabolism during postharvest storage of broccoli. *LWT*, 145. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111302>
- Casajús, V., Demkura, P., Civello, P., Gómez Lobato, M., & Martínez, G. (2020). Harvesting at different time-points of day affects glucosinolate metabolism during postharvest storage of broccoli. *Food Research International*, 136. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109529>
- Castellanos, D. A., Herrera, D. R., & Herrera, A. O. (2016). Modelling water vapour

- transport, transpiration and weight loss in a perforated modified atmosphere packaging for feijoa fruits. *Biosystems Engineering*, 151, 218–230.
<https://doi.org/10.1016/j.biosystemseng.2016.08.015>
- Castro-Ibáñez, I., Gil, M. I., & Allende, A. (2017). Ready-to-eat vegetables: Current problems and potential solutions to reduce microbial risk in the production chain. *LWT - Food Science and Technology*, 85, 284–292.
<https://doi.org/10.1016/j.LWT.2016.11.073>
- Castro-Torres, I. G., Castro-Torres, V. A., Hernández-Lozano, M., Naranjo-Rodríguez, E. B., & Domínguez-Ortiz, M. Á. (2020). Glucosinolates and metabolism. In *Glucosinolates: Properties, Recovery, and Applications* (pp. 107–141). Elsevier.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816493-8.00004-4>
- Cazón, P., Velázquez, G., & Vázquez, M. (2020). Bacterial cellulose films: Evaluation of the water interaction. *Food Packaging and Shelf Life*, 25, 100526.
<https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2020.100526>
- Chandrasekaran, S., Ramanathan, S., & Basak, T. (2013). Microwave food processing-A review. *Food Research International*, 52(1), 243–261.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.02.033>
- Cieślík, E., Leszczyńska, T., Filipiak-Florkiewicz, A., Sikora, E., & Pisulewski, P. M. (2007). Effects of some technological processes on glucosinolate contents in cruciferous vegetables. *Food Chemistry*, 105(3), 976–981.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.04.047>
- Clarke, D. B. (2010). Glucosinolates, structures and analysis in food. *Analytical Methods*, 2(4), 310. <https://doi.org/10.1039/b9ay00280d>
- Codex Alimentarius, 2003. Code of hygienic practice for fresh fruits and vegetables.* (n.d.).
- Costa, L., Vicente, A. R., Civello, P. M., Chaves, A. R., & Martínez, G. A. (2006). UV-C treatment delays postharvest senescence in broccoli florets. *Postharvest Biology and Technology*, 39(2), 204–210.
<https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2005.10.012>
- Dar, A. H., Shams, R., Rizvi, Q. ul E. H., & Majid, I. (2019). Microwave and ohmic heating of fresh cut fruits and vegetable products. In *Fresh-Cut Fruits and Vegetables: Technologies and Mechanisms for Safety Control* (pp. 295–337). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816184-5.00013-6>
- Darré, M., Valerga, L., Ortiz Araque, L. C., Lemoine, M. L., Demkura, P. v., Vicente, A. R., & Concellón, A. (2017). Role of UV-B irradiation dose and intensity on color retention and antioxidant elicitation in broccoli florets (*Brassica oleracea* var. *Italica*). *Postharvest Biology and Technology*, 128, 76–82.
<https://doi.org/10.1016/j.POSTHARVBIO.2017.02.003>
- De Corato, U. (2019). The Market of the Minimally Processed Fresh Produce Needs of Safer Strategies for Improving Shelf Life and Quality : A Critical Overview of the Traditional Technologies. *Journal of Agricultural Research*, 4(1).
<https://doi.org/10.23880/oajar-16000216>
- de Corato, U. (2020). Improving the shelf-life and quality of fresh and minimally-processed fruits and vegetables for a modern food industry : A comprehensive critical review from the traditional technologies into the most promising advancements. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(6), 940–975.
<https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1553025>
- Deng, Q., Zinoviadou, K. G., Galanakis, C. M., Orlien, V., Grimi, N., Vorobiev, E., Lebovka, N., & Barba, F. J. (2015). The Effects of Conventional and Non-

- conventional Processing on Glucosinolates and Its Derived Forms, Isothiocyanates: Extraction, Degradation, and Applications. *Food Engineering Reviews*, 7(3), 357–381. <https://doi.org/10.1007/s12393-014-9104-9>
- Di Gioia, F., Pinela, J., de Haro Bailón, A., Ferreira, I. C. F. R., & Petropoulos, S. A. (2020). The dilemma of “good” and “bad” glucosinolates and the potential to regulate their content. In *Glucosinolates: Properties, Recovery, and Applications* (pp. 1–45). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816493-8.00001-9>
- dos Reis, L. C. R., de Oliveira, V. R., Hagen, M. E. K., Jablonski, A., Flôres, S. H., & de Oliveira Rios, A. (2015). Carotenoids, flavonoids, chlorophylls, phenolic compounds and antioxidant activity in fresh and cooked broccoli (*Brassica oleracea* var. Avenger) and cauliflower (*Brassica oleracea* var. Alphina F1). *LWT - Food Science and Technology*, 63(1), 177–183. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.03.089>
- Dunford, N. T., & Temelli, F. (1996). *Effect of Supercritical CO 2 on Myrosinase Activity and Glucosinolate Degradation in Canola*.
- Embalajes Compostables con NatureFlex™*. (n.d.). Retrieved September 15, 2022, from <https://www.natureflex.com/es/>
- EUR-Lex - 4393034 - EN - EUR-Lex*. (n.d.). Retrieved July 19, 2023, from <https://eur-lex.europa.eu/ES/legal-content/summary/single-use-plastics-fighting-the-impact-on-the-environment.html>
- Fagundes, C., Moraes, K., Pérez-Gago, M. B., Palou, L., Maraschin, M., & Monteiro, A. R. (2015). Effect of active modified atmosphere and cold storage on the postharvest quality of cherry tomatoes. *Postharvest Biology and Technology*, 109, 73–81. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2015.05.017>
- FAOSTAT*. (n.d.). Retrieved July 20, 2022, from <https://www.fao.org/faostat/en/#home>
- Fernández-león, M. F., Fernández-león, A. M., Lozano, M., Ayuso, M. C., Amodio, M. L., & Colelli, G. (2013). Retention of quality and functional values of broccoli ‘Parthenon’ stored in modified atmosphere packaging. *Food Control*, 31(2), 302–313. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.10.012>
- Fernández-León, M. F., Fernández-León, A. M., Lozano, M., Ayuso, M. C., Amodio, M. L., Colelli, G., & González-Gómez, D. (2013). Retention of quality and functional values of broccoli “Parthenon” stored in modified atmosphere packaging. *Food Control*, 31(2), 302–313. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.10.012>
- Fernández-León, M. F., Fernández-León, A. M., Lozano, M., Ayuso, M. C., & González-Gómez, D. (2013). Altered commercial controlled atmosphere storage conditions for “Parthenon” broccoli plants (*Brassica oleracea* L. var. italica). Influence on the outer quality parameters and on the health-promoting compounds. *LWT - Food Science and Technology*, 50(2), 665–672. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.07.028>
- Floegel, A., Kim, D., Chung, S., Koo, S. I., & Chun, O. K. (2011). Journal of Food Composition and Analysis Comparison of ABTS / DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods §. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24(7), 1043–1048. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2011.01.008>
- Fonseca, S. C., Oliveira, F. A. R., & Brecht, J. K. (2002). *Modelling respiration rate of fresh fruits and vegetables for modified atmosphere packages : a review*. 52, 99–119.
- Fonseca, S. C., Oliveira, F. A. R., Lino, I. B. M., Brecht, J. K., & Chau, K. v. (2000).

- Modelling O₂ and CO₂ exchange for development of perforation-mediated modified atmosphere packaging. *Journal of Food Engineering*, 43(1), 9–15. [https://doi.org/10.1016/S0260-8774\(99\)00122-3](https://doi.org/10.1016/S0260-8774(99)00122-3)
- FoodData Central. (n.d.). Retrieved July 20, 2022, from <https://fdc.nal.usda.gov/fdc-app.html#/food-details/1103170/nutrients>
- Forecast Report on Global Fruit and Vegetable Processing. (n.d.). Retrieved July 6, 2022, from <https://www.globenewswire.com/news-release/2022/05/23/2448642/0/en/Forecast-Report-on-Global-Fruit-and-Vegetable-Processing-Market-Size-Share-2022-2028-Will-Hit-US-530-Billion-With-a-CAGR-of-7-5-Industry-Trends-Demand-Companies-Sales-Analysis-Fact.html>
- Francisco, M., Velasco, P., Moreno, D. A., García-Viguera, C., & Cartea, M. E. (2010). Cooking methods of Brassica rapa affect the preservation of glucosinolates, phenolics and vitamin C. *Food Research International*, 43(5), 1455–1463. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.04.024>
- Gao, J., Si, Y., Zhu, Y., Luo, F., & Yan, S. (2018). Temperature abuse timing affects the rate of quality deterioration of postharvest broccoli during different pre-storage stages. *Scientia Horticulturae*, 227, 207–212. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.09.034>
- Garavito, J., Mendoza, S. M., & Castellanos, D. A. (2022). Configuration of biodegradable equilibrium modified atmosphere packages, including a moisture absorber for fresh cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.) fruits. *Journal of Food Engineering*, 314. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2021.110761>
- García Benzal, J. D., Aiello, P., Moreno, D. A., García Viguera, C., & Villaño, D. (2022). Vitamins. In *Nutraceutical and Functional Food Components* (pp. 183–241). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-85052-0.00004-0>
- García, C. J., García-Villalba, R., Moreno, D. A., & Tomás-Barberán, F. A. (2022). Gut Microbiota Interactions With Dietary Terpenoids and Nitrogen-Containing Phytochemicals. In *Comprehensive Gut Microbiota* (pp. 124–148). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819265-8.00081-4>
- García-Ibañez, P., Ben-Romdhane, O., & Moreno, D. A. (2022). Glucosinolates and their bioactive metabolites as functional compounds modulating inflammation. In *Current Advances for Development of Functional Foods Modulating Inflammation and Oxidative Stress* (pp. 189–204). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823482-2.00017-0>
- García-Ibañez, P., Moreno, D. A., & Carvajal, M. (2022). Nanoencapsulation of Bimi® extracts increases its bioaccessibility after in vitro digestion and evaluation of its activity in hepatocyte metabolism. *Food Chemistry*, 385, 132680. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2022.132680>
- Ghani, U. (2020). Polyphenols. In *Alpha-Glucosidase Inhibitors* (pp. 61–100). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102779-0.00003-4>
- González-Buesa, J., Ferrer-Mairal, A., Oria, R., & Salvador, M. L. (2009a). A mathematical model for packaging with microperforated films of fresh-cut fruits and vegetables. *Journal of Food Engineering*, 95(1), 158–165. <https://doi.org/10.1016/J.JFOODENG.2009.04.025>
- González-Buesa, J., Ferrer-Mairal, A., Oria, R., & Salvador, M. L. (2009b). A mathematical model for packaging with microperforated films of fresh-cut fruits and vegetables. *Journal of Food Engineering*, 95(1), 158–165.

- <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2009.04.025>
- González-Buesa, J., Ferrer-Mairal, A., Oria, R., & Salvador, M. L. (2013). Alternative method for determining O₂ and CO₂ transmission rates through microperforated films for modified atmosphere packs. *Packaging Technology and Science*, 26(7), 413–421. <https://doi.org/10.1002/pts.1988>
- González-Buesa, J., & Salvador, M. L. (2022). A multiphysics approach for modeling gas exchange in microperforated films for modified atmosphere packaging of respiring products. *Food Packaging and Shelf Life*, 31, 100797. <https://doi.org/10.1016/j.FPSL.2021.100797>
- Guan, Y., Hu, W., Jiang, A., Xu, Y., Zhao, M., Yu, J., Ji, Y., Sarengaowa, Yang, X., & Feng, K. (2020). The effect of cutting style on the biosynthesis of phenolics and cellular antioxidant capacity in wounded broccoli. *Food Research International*, 137, 109565. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2020.109565>
- Guevara, J. C., Yahia, E. M., Beaudry, R. M., & Cedeño, L. (2006). Modeling the influence of temperature and relative humidity on respiration rate of prickly pear cactus cladodes. *Postharvest Biology and Technology*, 41(3), 260–265. <https://doi.org/10.1016/J.POSTHARVBIO.2006.04.012>
- Guijarro-Real, C., Fita, A., Prohens, J., & Moreno, D. A. (2022a). Conventional and Innovative Processing in the Stability of Glucosinolates. In *Nutraceutical and Functional Food Components* (pp. 411–460). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-85052-0.00010-6>
- Guijarro-Real, C., Fita, A., Prohens, J., & Moreno, D. A. (2022b). Conventional and Innovative Processing in the Stability of Glucosinolates. In *Nutraceutical and Functional Food Components* (pp. 411–460). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-85052-0.00010-6>
- Guo, Q., Sun, D. W., Cheng, J. H., & Han, Z. (2017a). Microwave processing techniques and their recent applications in the food industry. *Trends in Food Science and Technology*, 67, 236–247. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.07.007>
- Guo, Q., Sun, D.-W., Cheng, J.-H., & Han, Z. (2017b). Microwave processing techniques and their recent applications in the food industry. *Trends in Food Science & Technology*, 67, 236–247. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.07.007>
- Harbaum, B., Hubbermann, E. M., Zhu, Z., & Schwarz, K. (2007). Impact of Fermentation on Phenolic Compounds in Leaves of Pak Choi (*Brassica campestris* L. ssp. *chinensis* var. *communis*) and Chinese Leaf Mustard (*Brassica juncea* Coss). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(1), 148–157. <https://doi.org/10.1021/JF0724280>
- Hasperué, J. H., Lemoine, L., Vicente, A. R., Chaves, A. R., & Martínez, G. A. (2015). Postharvest Biology and Technology Postharvest senescence of fl orets from primary and secondary broccoli in fl orescences. *Postharvest Biology and Technology*, 104, 42–47. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2015.02.015>
- He, Q., & Xiao, K. (2018). Quality of broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*) in modified atmosphere packaging made by gas barrier-gas promoter blending materials. *Postharvest Biology and Technology*, 144, 63–69. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2018.05.013>
- Hennig, K., & Verkerk, R. (2014). Food science meets plant science : A case study on improved nutritional quality by breeding for glucosinolate retention during food processing. *Trends in Food Science & Technology*, 35(1), 61–68.

- <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2013.10.006>
 Horticulture Innovation Australia, n. d. (n.d.). *Horticulture Innovation Australia, n.d.*
- Houghton, C. A. (2019). Sulforaphane: Its “Coming of Age” as a Clinically Relevant Nutraceutical in the Prevention and Treatment of Chronic Disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019, 1–27.
<https://doi.org/10.1155/2019/2716870>
- Howard, L. A., Jeffery, E. H., Wallig, M. A., & Klein, B. P. (1997). Retention of Phytochemicals in Fresh and Processed Broccoli. *Journal of Food Science*, 62(6), 1098–1104. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2621.1997.TB12221.X>
- Huang, H., Wang, D., Belwal, T., Dong, L., Lu, L., Zou, Y., Li, L., Xu, Y., & Luo, Z. (2021). A novel W/O/W double emulsion co-delivering brassinolide and cinnamon essential oil delayed the senescence of broccoli via regulating chlorophyll degradation and energy metabolism. *Food Chemistry*, 356, 129704.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129704>
- Hussain, M. J., Karim, A. J. M. S., Solaiman, A. R. M., Islam, M. S., & Rahman, M. (2021). Integrated effect of inorganic and organic nitrogen sources on nutrient uptake and crop quality of broccoli. *Agriculture and Natural Resources*, 55(1), 71–80. <https://doi.org/10.34044/j.anres.2021.55.1.10>
- Hussein, Z., Caleb, O. J., & Opara, U. L. (2015). Perforation-mediated modified atmosphere packaging of fresh and minimally processed produce—A review. *Food Packaging and Shelf Life*, 6, 7–20.
<https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2015.08.003>
- Ierna, A., Rizzarelli, P., Malvuccio, A., & Rapisarda, M. (2017a). Effect of different anti-browning agents on quality of minimally processed early potatoes packaged on a compostable film. *LWT - Food Science and Technology*, 85, 434–439. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.03.043>
- Ierna, A., Rizzarelli, P., Malvuccio, A., & Rapisarda, M. (2017b). Effect of different anti-browning agents on quality of minimally processed early potatoes packaged on a compostable film. *LWT - Food Science and Technology*, 85, 434–439. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.03.043>
- Ilahy, R., Tlili, I., Pék, Z., Montefusco, A., Siddiqui, M. W., Homa, F., Hdidder, C., R’Him, T., Lajos, H., & Lenucci, M. S. (2020). Pre- and Post-harvest Factors Affecting Glucosinolate Content in Broccoli. *Frontiers in Nutrition*, 7.
<https://doi.org/10.3389/fnut.2020.00147>
- Iqbal, M. J., Fakhra, M., Alyas, T., & Farooqi, A. A. (2022). Metastasis inhibitory role of hydroxycinnamic acid and its derivatives. In *Unraveling the Complexities of Metastasis* (pp. 235–240). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821789-4.00016-3>
- Jacobo-Velázquez, D. A., & Cisneros-Zevallos, L. (2012). An Alternative Use of Horticultural Crops: Stressed Plants as Biofactories of Bioactive Phenolic Compounds. *Agriculture*, 2(3), 259–271.
<https://doi.org/10.3390/agriculture2030259>
- Jacobsson, A., Nielsen, T., & Sjöholm, I. (2004). Effects of type of packaging material on shelf-life of fresh broccoli by means of changes in weight, colour and texture. *European Food Research and Technology*, 218(2), 157–163.
<https://doi.org/10.1007/s00217-003-0820-2>
- Jacxsens, L., Devlieghere, F., & Debevere, J. (2002). *Predictive modelling for packaging design : equilibrium modified atmosphere packages of fresh-cut vegetables subjected to a simulated distribution chain*. 73, 331–341.

- Jia, C. G., Xu, C. J., Wei, J., Yuan, J., Yuan, G. F., Wang, B. L., & Wang, Q. M. (2009). Effect of modified atmosphere packaging on visual quality and glucosinolates of broccoli florets. *Food Chemistry*, *114*(1), 28–37. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.09.009>
- Jiang, Y., Fang, Y., Ye, Y., Xu, X., Wang, B., Gu, J., Aschner, M., Chen, J., & Lu, R. (2019). Anti-Cancer Effects of 3, 3'-Diindolylmethane on Human Hepatocellular Carcinoma Cells Is Enhanced by Calcium Ionophore: The Role of Cytosolic Ca²⁺ and p38 MAPK. *Frontiers in Pharmacology*, *10*. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01167>
- Jones, R. B., Faragher, J. D., & Winkler, S. (2006). A review of the influence of postharvest treatments on quality and glucosinolate content in broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) heads. *Postharvest Biology and Technology*, *41*(1), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2006.03.003>
- Jones, R. B., Frisina, C. L., Winkler, S., Imsic, M., & Tomkins, R. B. (2010). Cooking method significantly effects glucosinolate content and sulforaphane production in broccoli florets. *Food Chemistry*, *123*(2), 237–242. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.04.016>
- Khan, M. R., di Giuseppe, F. A., Torrieri, E., & Sadiq, M. B. (2021). Recent advances in biopolymeric antioxidant films and coatings for preservation of nutritional quality of minimally processed fruits and vegetables. *Food Packaging and Shelf Life*, *30*, 100752. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2021.100752>
- Latté, K. P., Appel, K. E., & Lampen, A. (2011). Health benefits and possible risks of broccoli – An overview. *Food and Chemical Toxicology*, *49*(12), 3287–3309. <https://doi.org/10.1016/j.FCT.2011.08.019>
- Lee, D. S. (2021). *Modified atmosphere packaging of foods: Principles and applications*. John Wiley and Sons.
- Lee, J. G., Lim, S., Kim, J., & Lee, E. J. (2017). The mechanism of deterioration of the glucosinolate-myrosinase system in radish roots during cold storage after harvest. *Food Chemistry*, *233*, 60–68. <https://doi.org/10.1016/j.FOODCHEM.2017.04.104>
- Ley N° 19655. (n.d.). Retrieved April 9, 2023, from <https://www.impo.com.uy/bases/leyes/19655-2018>
- Li, H., Xia, Y., Liu, H. Y., Guo, H., He, X. Q., Liu, Y., Wu, D. T., Mai, Y. H., Li, H. bin, Zou, L., & Gan, R. Y. (2022). Nutritional values, beneficial effects, and food applications of broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica* Plenck). In *Trends in Food Science and Technology* (Vol. 119, pp. 288–308). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.12.015>
- Liburdi, K., Benucci, I., & Esti, M. (2019). Effect of microwave power and blanching time in relation to different geometric shapes of vegetables. *LWT*, *99*, 497–504. <https://doi.org/10.1016/j.LWT.2018.10.029>
- Lichtenthaler, H. K. (1987). [34] *Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes* (pp. 350–382). [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(87\)48036-1](https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)48036-1)
- Lim, S., Lee, E. J., & Kim, J. (2015). Decreased sulforaphane concentration and reduced myrosinase activity of radish (*Raphanus sativus* L.) root during cold storage. *Postharvest Biology and Technology*, *100*, 219–225. <https://doi.org/10.1016/j.POSTHARVBIO.2014.10.007>
- Lima, A. M. S., dos Santos, L. O., David, J. M., & Ferreira, S. L. C. (2019). Mineral content in mustard leaves according to the cooking method. *Food Chemistry*,

- 273, 172–177. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2017.12.042>
- Liu, B., Tao, Y., Manickam, S., Li, D., Han, Y., Yu, Y., & Liu, D. (2022). Influence of sequential exogenous pretreatment and contact ultrasound-assisted air drying on the metabolic pathway of glucoraphanin in broccoli florets. *Ultrasonics Sonochemistry*, *84*, 105977. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2022.105977>
- Liu, Y., Ahmed, S., Sameen, D. E., Wang, Y., Lu, R., Dai, J., Li, S., & Qin, W. (2021a). A review of cellulose and its derivatives in biopolymer-based for food packaging application. *Trends in Food Science & Technology*, *112*, 532–546. <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2021.04.016>
- Liu, Y., Ahmed, S., Sameen, D. E., Wang, Y., Lu, R., Dai, J., Li, S., & Qin, W. (2021b). A review of cellulose and its derivatives in biopolymer-based for food packaging application. *Trends in Food Science & Technology*, *112*, 532–546. <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2021.04.016>
- López-Berenguer, C., Carvajal, M., Moreno, D. A., & García-Viguera, C. (2007). Effects of microwave cooking conditions on bioactive compounds present in broccoli inflorescences. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *55*(24), 10001–10007. <https://doi.org/10.1021/jf071680t>
- López-Hernández, A. A., Ortega-Villarreal, A. S., Vázquez Rodríguez, J. A., López-Cabanillas Lomelí, M., & González-Martínez, B. E. (2022). Application of different cooking methods to improve nutritional quality of broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) regarding its compounds content with antioxidant activity. *International Journal of Gastronomy and Food Science*, *28*, 100510. <https://doi.org/10.1016/j.ijgfs.2022.100510>
- López-Pérez, L., Martínez-Ballesta, M. del C., Maurel, C., & Carvajal, M. (2009). Changes in plasma membrane lipids, aquaporins and proton pump of broccoli roots, as an adaptation mechanism to salinity. *Phytochemistry*, *70*(4), 492–500. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2009.01.014>
- Lucera, A., Costa, C., Mastromatteo, M., Conte, A., & Nobile, M. A. Del. (2011). Fresh-cut broccoli florets shelf-life as affected by packaging film mass transport properties. *Journal of Food Engineering*, *102*(2), 122–129. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.08.004>
- Ma, X., Wang, Y., Wang, J., & Xu, Y. (2016). Effect of PBAT on Property of PLA/PHB Film Used for Fruits and Vegetables. *MATEC Web of Conferences*, *88*. <https://doi.org/10.1051/mateconf/20178802009>
- Macedo, I. S. M., Sousa-Gallagher, M. J., Oliveira, J. C., & Byrne, E. P. (2013). Quality by design for packaging of granola breakfast product. *Food Control*, *29*(2), 438–443. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.05.045>
- Madonna, M., Caleb, O. J., Sivakumar, D., & Mahajan, P. V. (2018). Understanding the physiological response of fresh-cut cauliflower for developing a suitable packaging system. *Food Packaging and Shelf Life*, *17*(June), 179–186. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2018.07.002>
- Mahajan, P. V., & Lee, D. S. (2023). Modified atmosphere and moisture condensation in packaged fresh produce: Scientific efforts and commercial success. *Postharvest Biology and Technology*, *198*, 112235. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2022.112235>
- Makino, Y., Nishimura, Y., Oshita, S., Mizosoe, T., & Akihiro, T. (2018). Storage in high-barrier pouches increases the sulforaphane concentration in broccoli florets. *PLoS ONE*, *13*(2), 1–12.

- <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192342>
- Malekzadeh, P., Hatamnia, A. A., & Tiznado-Hernández, M. E. (2023). Arginine catabolism induced by exogenous arginine treatment reduces the loss of green color rate in broccoli florets. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, *124*, 101973. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2023.101973>
- Mangaraj, S., Yadav, A., Bal, L. M., Dash, S. K., & Mahanti, N. K. (2018). Application of Biodegradable Polymers in Food Packaging Industry: A Comprehensive Review. *Journal of Packaging Technology and Research* *2018* *3:1*, 3(1), 77–96. <https://doi.org/10.1007/S41783-018-0049-Y>
- Market – European Bioplastics e.V. (n.d.). Retrieved July 12, 2022, from <https://www.european-bioplastics.org/market/>
- Mashabela, M., Mahajan, P. V., & Sivakumar, D. (2019). Influence of different types of modified atmosphere packaging films and storage time on quality and bioactive compounds in fresh-cut cauliflower. *Food Packaging and Shelf Life*, *22*(July). <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2019.100374>
- Mastrandrea, L., Amodio, M. L., de Chiara, M. L. V., Pati, S., & Colelli, G. (2017). Effect of temperature abuse and improper atmosphere packaging on volatile profile and quality of rocket leaves. *Food Packaging and Shelf Life*, *14*(July), 59–65. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2017.08.004>
- Matar, C., Salou, T., Hélias, A., Pénicaud, C., Gaucel, S., Gontard, N., Guilbert, S., & Guillard, V. (2021). Benefit of modified atmosphere packaging on the overall environmental impact of packed strawberries. *Postharvest Biology and Technology*, *177*, 111521. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2021.111521>
- Matthews, C., Moran, F., & Jaiswal, A. K. (2021). A review on European Union's strategy for plastics in a circular economy and its impact on food safety. *Journal of Cleaner Production*, *283*, 125263. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.125263>
- Medina, S., Domínguez-perles, R., Moreno, D. A., García-viguera, C., Ferreres, F., Ignacio, J., & Gil-izquierdo, Á. (2015). The intake of broccoli sprouts modulates the inflammatory and vascular prostanoids but not the oxidative stress-related isoprostanes in healthy humans. *FOOD CHEMISTRY*, *173*, 1187–1194. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.10.152>
- Mena, P., García-Viguera, C., Navarro-Rico, J., Moreno, D. A., Bartual, J., Saura, D., & Martí, N. (2011). Phytochemical characterisation for industrial use of pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars grown in Spain. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *91*(10), 1893–1906. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4411>
- Mistriotis, A., Briassoulis, D., Giannoulis, A., & D'Aquino, S. (2016). Design of biodegradable bio-based equilibrium modified atmosphere packaging (EMAP) for fresh fruits and vegetables by using micro-perforated poly-lactic acid (PLA) films. *Postharvest Biology and Technology*, *111*(2016), 380–389. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2015.09.022>
- Moreno, D. A., Carvajal, M., & Garc, C. (2006). *Chemical and biological characterisation of nutraceutical compounds of broccoli*. *41*, 1508–1522. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2006.04.003>
- Moreno, D. A., & García-Vigueras, C. (2008). *El brócoli fuente de ingredientes funcionales: glucosinolatos*. Alimentación, Nutrición y Salud.
- Ncube, L. K., Ude, A. U., Ogunmuyiwa, E. N., Zulkifli, R., & Beas, I. N. (2021). An

- Overview of Plastic Waste Generation and Management in Food Packaging Industries. *Recycling*, 6(1), 12. <https://doi.org/10.3390/recycling6010012>
- Ndraha, N., Hsiao, H. I., Vlajic, J., Yang, M. F., & Lin, H. T. V. (2018). Time-temperature abuse in the food cold chain: Review of issues, challenges, and recommendations. In *Food Control* (Vol. 89, pp. 12–21). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.01.027>
- Nimitkeatkai, H., Techavuthiporn, C., Boonyaritthongchai, P., & Supapvanich, S. (2022). Commercial active packaging maintaining physicochemical qualities of carambola fruit during cold storage. *Food Packaging and Shelf Life*, 32. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2022.100834>
- Nunes, M. C. N., Emond, J. P., Rauth, M., Dea, S., & Chau, K. v. (2009). Environmental conditions encountered during typical consumer retail display affect fruit and vegetable quality and waste. *Postharvest Biology and Technology*, 51, 232–241. <https://doi.org/doi.org/10.1016/j.postharvbio.2008.07.016>
- Núñez-Sánchez, M. Á., Martínez-Sánchez, M. A., Verdejo-Sánchez, M., García-Ibáñez, P., Oliva Bolarín, A., Ramos-Molina, B., Moreno, D. A., & Ruiz-Alcaraz, A. J. (2022). Anti-Leukemic Activity of Brassica-Derived Bioactive Compounds in HL-60 Myeloid Leukemia Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(21), 13400. <https://doi.org/10.3390/ijms232113400>
- Oerlemans, K., Barrett, D. M., Suades, C. B., Verkerk, R., & Dekker, M. (2006). Thermal degradation of glucosinolates in red cabbage. *Food Chemistry*, 95(1), 19–29. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2004.12.013>
- Okugawa, A., Yuguchi, Y., Hayakawa, D., Ueno, F., Hatai, K., & Yamane, C. (2023). Oxygen permeability of regenerated cellulose films with different water regains. *Carbohydrate Polymers*, 313, 120849. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2023.120849>
- Oliviero, T., Verkerk, R., & Dekker, M. (2012). Effect of water content and temperature on glucosinolate degradation kinetics in broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*). *Food Chemistry*, 132(4), 2037–2045. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.12.045>
- Opara, U. L., Caleb, O. J., & Belay, Z. A. (2019a). Modified atmosphere packaging for food preservation. In *Food Quality and Shelf Life* (pp. 235–259). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817190-5.00007-0>
- Opara, U. L., Caleb, O. J., & Belay, Z. A. (2019b). Modified atmosphere packaging for food preservation. In *Food Quality and Shelf Life* (pp. 235–259). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817190-5.00007-0>
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura: Cinco razones para consumir brócoli | FAO en Venezuela | Продовольственная и сельскохозяйственная организация Объединенных Наций. (n.d.). Retrieved July 20, 2022, from <https://www.fao.org/venezuela/noticias/detail-events/ru/c/1437784/>
- Ou, B., Huang, D., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J. A., & Deemer, E. K. (2002). Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: A comparative study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(11), 3122–3128. <https://doi.org/10.1021/jf0116606>
- Palani, K., Harbaum-Piayda, B., Meske, D., Keppler, J. K., Bockelmann, W., Heller, K. J., & Schwarz, K. (2016). Influence of fermentation on glucosinolates and glucobrassicin degradation products in sauerkraut. *Food Chemistry*, 190, 755–

762. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.06.012>
- Pardini, A., Tamasi, G., De Rocco, F., Bonechi, C., Consumi, M., Leone, G., Magnani, A., & Rossi, C. (2021). Kinetics of glucosinolate hydrolysis by myrosinase in Brassicaceae tissues: A high-performance liquid chromatography approach. *Food Chemistry*, 355, 129634. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129634>
- Patanè, C., Malvuccio, A., Saita, A., Rizzarelli, P., Siracusa, L., Rizzo, V., & Muratore, G. (2019). Nutritional changes during storage in fresh-cut long storage tomato as affected by biocompostable polylactide and cellulose based packaging. *LWT*, 101, 618–624. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.11.069>
- Paulsen, E., Barrios, S., Baenas, N., Moreno, D. A., Heinzen, H., & Lema, P. (2018). Effect of temperature on glucosinolate content and shelf life of ready-to-eat broccoli florets packaged in passive modified atmosphere. *Postharvest Biology and Technology*, 138(January), 125–133. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2018.01.006>
- Paulsen, E., Romero, M. E., Lema, P., López, M. D., García-Viguera, C., & Moreno, D. A. (2021). Foods and supplements. In *Food Waste Recovery* (pp. 483–501). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-820563-1.00012-3>
- Pellegrini, N., Chiavaro, E., Gardana, C., Mazzeo, T., Contino, D., Gallo, M., Riso, P., Fogliano, V., & Porrini, M. (2010). Effect of different cooking methods on color, phytochemical concentration, and antioxidant capacity of raw and frozen brassica vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(7), 4310–4321. <https://doi.org/10.1021/jf904306r>
- Pereira, M. J., Amaro, A. L., Oliveira, A., & Pintado, M. (2019). Bioactive compounds in ready-to-eat rocket leaves as affected by oxygen partial pressure and storage time: A kinetic modelling. *Postharvest Biology and Technology*, 158, 110985. <https://doi.org/10.1016/J.POSTHARVBIO.2019.110985>
- Pérez-balibrea, S., Moreno, D. A., & García-viguera, C. (2011). Genotypic effects on the phytochemical quality of seeds and sprouts from commercial broccoli cultivars. 125, 348–354. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.09.004>
- Pérez-Balibrea, S., Moreno, D. A., & García-Viguera, C. (2011). Genotypic effects on the phytochemical quality of seeds and sprouts from commercial broccoli cultivars. *Food Chemistry*, 125(2), 348–354. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2010.09.004>
- Pietrosanto, A., Scarfato, P., Di Maio, L., Nobile, M. R., & Incarnato, L. (2020). Evaluation of the suitability of poly(lactide)/poly(butylene-adipate-co-terephthalate) blown films for chilled and frozen food packaging applications. *Polymers*, 12(4). <https://doi.org/10.3390/POLYM12040804>
- Qu, P., Zhang, M., Fan, K., & Guo, Z. (2022). Microporous modified atmosphere packaging to extend shelf life of fresh foods: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 62(1), 51–65. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1811635>
- Quirante-Moya, S., García-Ibañez, P., Quirante-Moya, F., Villaño, D., & Moreno, D. A. (2020). The Role of Brassica Bioactives on Human Health: Are We Studying It the Right Way? *Molecules*, 25(7), 1591. <https://doi.org/10.3390/molecules25071591>
- Raffo, A., & Paoletti, F. (2022). Fresh-Cut Vegetables Processing : Environmental Sustainability and Food Safety Issues in a Comprehensive Perspective. *Front. Sustain. Food Syst.*, 5(January). <https://doi.org/10.3389/fsufs.2021.681459>

- Ramirez, D., Abellán-Victorio, A., Beretta, V., Camargo, A., & Moreno, D. A. (2020a). Functional Ingredients From Brassicaceae Species: Overview and Perspectives. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(6), 1998. <https://doi.org/10.3390/ijms21061998>
- Ramirez, D., Abellán-Victorio, A., Beretta, V., Camargo, A., & Moreno, D. A. (2020b). Functional Ingredients From Brassicaceae Species: Overview and Perspectives. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(6), 1998. <https://doi.org/10.3390/ijms21061998>
- Ramos, B., Miller, F., Brandão, T., Teixeira, P., & Silva, C. (2013). Fresh fruits and vegetables — An overview on applied methodologies to improve its quality and safety. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2013.07.002>
- Rangkadilok, N., Tomkins, B., Nicolas, M. E., Premier, R. R., Bennett, R. N., Eagling, D. R., & Taylor, P. W. J. (2002). The effect of post-harvest and packaging treatments on glucoraphanin concentration in broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(25), 7386–7391. <https://doi.org/10.1021/JF0203592>
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). *Antioxidant activity applying an improved ABTS padical cation decolorization assay*.
- Regier, M. (2017). Microwavable Food Packaging. *Reference Module in Food Science*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.21414-5>
- Rehan, M., Angelo, F., Torrieri, E., & Bilal, M. (2021). Recent advances in biopolymeric antioxidant films and coatings for preservation of nutritional quality of minimally processed fruits and vegetables. *Food Packaging and Shelf Life*, 30(July), 100752. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2021.100752>
- Reishofer, D., Resel, R., Sattelkow, J., Fischer, W. J., Niegelhell, K., Mohan, T., Kleinschek, K. S., Amenitsch, H., Plank, H., Tammelín, T., Kontturi, E., & Spirk, S. (2022). Humidity Response of Cellulose Thin Films. *Biomacromolecules*, 23(3), 1148–1157. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.1c01446>
- Robertson, G. L. (2016). *Food Packaging*. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/b21347>
- Rodrigues, A. S., & Rosa, E. A. S. (1999). *Effect of post-harvest treatments on the level of glucosinolates in broccoli*. 1032(November 1998).
- Rodríguez-Hernández, M. D. C., Moreno, D. A., Carvajal, M., & Martínez-Ballesta, M. D. C. (2014). Genotype influences sulfur metabolism in broccoli (*Brassica oleracea* L.) under elevated CO₂ and NaCl stress. In *Plant and Cell Physiology* (Vol. 55, Issue 12, pp. 2047–2059). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcu130>
- Ruiz, A., Aguilera, A., Ercoli, S., Parada, J., Winterhalter, P., Contreras, B., & Cornejo, P. (2018). Effect of the frying process on the composition of hydroxycinnamic acid derivatives and antioxidant activity in flesh colored potatoes. *Food Chemistry*, 268(March), 577–584. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.06.116>
- Ruiz-Alcaraz, A. J., Martínez-Sánchez, M. A., García-Peñarrubia, P., Martínez-Esparza, M., Ramos-Molina, B., & Moreno, D. A. (2022). Analysis of the anti-inflammatory potential of Brassica bioactive compounds in a human macrophage-like cell model derived from HL-60 cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 149, 112804.

- <https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2022.112804>
- Rybarczyk-plonska, A., Fiskaa, S., Iren, G., Borge, A., Bengtsson, G. B., Kåre, M., & Wold, A. (2016). Postharvest Biology and Technology Glucosinolates in broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*) as affected by postharvest temperature and radiation treatments. *Postharvest Biology and Technology*, *116*, 16–25. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2015.12.010>
- Saltveit, M. E. (2019). Respiratory Metabolism. *Postharvest Physiology and Biochemistry of Fruits and Vegetables*, 73–91. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813278-4.00004-X>
- Sandhya. (2010). Modified atmosphere packaging of fresh produce: Current status and future needs. *LWT - Food Science and Technology*, *43*(3), 381–392. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2009.05.018>
- Schouten, R. E., Zhang, X., Verkerk, R., Verschoor, J. A., Otma, E. C., Tijskens, L. M. M., & van Kooten, O. (2009). Modelling the level of the major glucosinolates in broccoli as affected by controlled atmosphere and temperature. *Postharvest Biology and Technology*, *53*(1–2), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2009.03.001>
- Schouten, R. E., Zhang, X., Verschoor, J. A., Otma, E. C., Tijskens, L. M. M., & van Kooten, O. (2009). Development of colour of broccoli heads as affected by controlled atmosphere storage and temperature. *Postharvest Biology and Technology*, *51*(1), 27–35. <https://doi.org/10.1016/J.POSTHARVBIO.2008.06.005>
- Schreiner, M., Peters, P., & Krumbein, A. (2007). Changes of glucosinolates in mixed fresh-cut broccoli and cauliflower florets in modified atmosphere packaging. *Journal of Food Science*, *72*(8). <https://doi.org/10.1111/J.1750-3841.2007.00506.X>
- Serna-Escolano, V., Martínez-Romero, D., Giménez, M. J., Serrano, M., García-Martínez, S., Valero, D., Valverde, J. M., & Zapata, P. J. (2021). Enhancing antioxidant systems by preharvest treatments with methyl jasmonate and salicylic acid leads to maintain lemon quality during cold storage. *Food Chemistry*, *338*(September 2020), 128044. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128044>
- Serrano, M., Martinez-romero, D., & Guill, F. (2006). *Maintenance of broccoli quality and functional properties during cold storage as affected by modified atmosphere packaging*. *39*, 61–68. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2005.08.004>
- Shaikh, S., Yaqoob, M., & Aggarwal, P. (2021a). An overview of biodegradable packaging in food industry. *Current Research in Food Science*, *4*, 503–520. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2021.07.005>
- Shaikh, S., Yaqoob, M., & Aggarwal, P. (2021b). An overview of biodegradable packaging in food industry. *Current Research in Food Science*, *4*, 503–520. <https://doi.org/10.1016/J.CRFS.2021.07.005>
- Shakeel, M., Khan, S. N., Saleem, Y., Burgess, P. J., & Shafiq, S. (2019). Colour, water and chlorophyll loss in harvested broccoli (*Brassica oleracea* L. *Italica*) under ambient conditions in Pakistan. *Scientia Horticulturae*, *246*, 858–861. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.11.041>
- Siddiq, M., & Uebersax, M. A. (Eds.). (2018). *Handbook of Vegetables and Vegetable Processing*. John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781119098935>
- Siegenthaler, K. O., Künkel, A., Skupin, G., & Yamamoto, M. (2011). *Ecoflex® and*

- Ecovio®: Biodegradable, Performance-Enabling Plastics*. 91–136.
https://doi.org/10.1007/12_2010_106
- Siomos, A. S., Koularmanis, K., & Tsouvaltzis, P. (2022). The Impacts of the Emerging Climate Change on Broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica* Plenck.) Crop. *Horticulturae*, 8(11). <https://doi.org/10.3390/horticulturae8111032>
- Siracusa, V., Rocculi, P., Romani, S., & Rosa, M. D. (2008). Biodegradable polymers for food packaging: a review. *Trends in Food Science and Technology*, 19(12), 634–643. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2008.07.003>
- Soares, A., Carrascosa, C., & Raposo, A. (2017). Influence of Different Cooking Methods on the Concentration of Glucosinolates and Vitamin C in Broccoli. *Food and Bioprocess Technology*, 10(8), 1387–1411. <https://doi.org/10.1007/s11947-017-1930-3>
- Sønderby, I. E., Geu-Flores, F., & Halkier, B. A. (2010). Biosynthesis of glucosinolates - gene discovery and beyond. *Trends in Plant Science*, 15(5), 283–290. <https://doi.org/10.1016/J.TPLANTS.2010.02.005>
- Song, L., & Thornalley, P. J. (2007). Effect of storage, processing and cooking on glucosinolate content of Brassica vegetables. *Food and Chemical Toxicology*, 45(2), 216–224. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2006.07.021>
- Spanish Cauliflower and Broccoli Exports Rocket to Record Highs - Global Trade Magazine*. (n.d.). Retrieved July 18, 2023, from <https://www.globaltrademag.com/spanish-cauliflower-and-broccoli-exports-rocket-to-record-highs/>
- Starzyńska, A., Leja, M., & Mareczek, A. (2003). Physiological changes in the antioxidant system of broccoli flower buds senescing during short-term storage, related to temperature and packaging. *Plant Science*, 165(6), 1387–1395. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2003.07.004>
- Sun, J., Wang, Y., Pang, X., Tian, S., Hu, Q., Li, X., Liu, J., Wang, J., & Lu, Y. (2021). The effect of processing and cooking on glucoraphanin and sulforaphane in brassica vegetables. *Food Chemistry*, 360, 130007. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2021.130007>
- Tabart, J., Pincemail, J., Kevers, C., Defraigne, J. O., & Dommes, J. (2018). Processing effects on antioxidant, glucosinolate, and sulforaphane contents in broccoli and red cabbage. *European Food Research and Technology*, 244(12), 2085–2094. <https://doi.org/10.1007/s00217-018-3126-0>
- Tavares-da-Silva, E. J., Varela, C. L., Pires, A. S., Encarnação, J. C., Abrantes, A. M., Botelho, M. F., Carvalho, R. A., Proença, C., Freitas, M., Fernandes, E., & Roleira, F. M. F. (2016). Combined dual effect of modulation of human neutrophils' oxidative burst and inhibition of colon cancer cells proliferation by hydroxycinnamic acid derivatives. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 24(16), 3556–3564. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2016.05.065>
- Techavuthiporn, C., Thammawong, M., & Nakano, K. (2021). Effect of short-term anoxia treatment on endogenous ethanol and postharvest responses of broccoli florets during storage at ambient temperature. *Scientia Horticulturae*, 277, 109813. <https://doi.org/10.1016/J.SCIENTA.2020.109813>
- Tetteh, O. N. A., Ulrichs, C., Huyskens-Keil, S., Mewis, I., Amaglo, N. K., Oduro, I. N., Adarkwah, C., Obeng-Ofori, D., & Förster, N. (2019). Effects of harvest techniques and drying methods on the stability of glucosinolates in *Moringa oleifera* leaves during post-harvest. *Scientia Horticulturae*, 246, 998–1004. <https://doi.org/10.1016/J.SCIENTA.2018.11.089>

- Toivonen, P. M. A., & Brummell, D. A. (2008a). Biochemical bases of appearance and texture changes in fresh-cut fruit and vegetables. *Postharvest Biology and Technology*, *48*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.POSTHARVBIO.2007.09.004>
- Toivonen, P. M. A., & Brummell, D. A. (2008b). Biochemical bases of appearance and texture changes in fresh-cut fruit and vegetables. *Postharvest Biology and Technology*, *48*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2007.09.004>
- Torres-Contreras, A. M., Nair, V., Cisneros-Zevallos, L., & Jacobo-Velázquez, D. A. (2017). Stability of bioactive compounds in broccoli as affected by cutting styles and storage time. *Molecules*, *22*(4), 1–15. <https://doi.org/10.3390/molecules22040636>
- Ucam-Santander, C. (2018). *ALIMENTOS DE LA REGIÓN DE MURCIA: BRÓCOLI*.
- Upadhyay, A., Kumar, P., Kardam, S. K., & Gaikwad, K. K. (2022). Ethylene scavenging film based on corn starch-gum acacia impregnated with sepiolite clay and its effect on quality of fresh broccoli florets. *Food Bioscience*, *46*, 101556. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.101556>
- Vallejo, F., Tomás-Barberán, F. A., & García-Viguera, C. (2003a). Phenolic compound contents in edible parts of broccoli inflorescences after domestic cooking. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *83*(14), 1511–1516. <https://doi.org/10.1002/jsfa.1585>
- Vallejo, F., Tomás-Barberán, F., & García-Viguera, C. (2003b). Health-promoting compounds in broccoli as influenced by refrigerated transport and retail sale period. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *51*(10), 3029–3034. <https://doi.org/10.1021/JF021065J>
- Vegetables, brassica; cauliflowers and headed broccoli, fresh or chilled exports by country /2018*. (n.d.). Retrieved July 18, 2023, from <https://wits.worldbank.org/trade/comtrade/en/country/ALL/year/2018/tradeflow/Exports/partner/WLD/product/070410>
- Verkerk, R., Dekker, M., & Jongen, W. M. F. (2001). Post-harvest increase of indolyl glucosinolates in response to chopping and storage of Brassica vegetables. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *81*(9), 953–958. <https://doi.org/10.1002/JSFA.854>
- Verkerk, R., Schreiner, M., Krumbein, A., Ciska, E., Holst, B., Rowland, I., De Schrijver, R., Hansen, M., Gerhäuser, C., Mithen, R., & Dekker, M. (2009). Glucosinolates in Brassica vegetables: The influence of the food supply chain on intake, bioavailability and human health. *Molecular Nutrition & Food Research*, *53*(S2), S219–S219. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200800065>
- Villaño, D., López-Chillón, M. T., Zafrilla, P., & Moreno, D. A. (2019). Bioavailability of broccoli sprouts in different human overweight populations. *Journal of Functional Foods*, *59*, 337–344. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.05.052>
- Villarreal-García, D., Nair, V., Cisneros-Zevallos, L., & Jacobo-Velázquez, D. A. (2016). Plants as biofactories: Postharvest stress-induced accumulation of phenolic compounds and glucosinolates in broccoli subjected to wounding stress and exogenous phytohormones. *Frontiers in Plant Science*, *7*(FEB2016), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00045>
- Wiesner-Reinhold, M., Nickel, M., Graefe, J., Schreiner, M., & Hanschen, F. S. (2021). CO₂treatment increases glucosinolate hydrolysis products in two *Arabidopsis thaliana* accessions. *Journal of Applied Botany and Food Quality*, *94*, 16–29. <https://doi.org/10.5073/JABFQ.2021.094.003>

- Winkler, S., Faragher, J., Franz, P., Imsic, M., & Jones, R. (2007). *Glucoraphanin and flavonoid levels remain stable during simulated transport and marketing of broccoli (Brassica oleracea var . italica) heads*. 43, 89–94. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2006.08.001>
- Wu, X., Zhao, Y., Haytowitz, D. B., Chen, P., & Pehrsson, P. R. (2019). Effects of domestic cooking on flavonoids in broccoli and calculation of retention factors. *Heliyon*, 5(3), e01310. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01310>
- Xie, C., Tang, J., Xiao, J., Geng, X., & Guo, L. (2022). Purple light-emitting diode (LED) lights controls chlorophyll degradation and enhances nutraceutical quality of postharvest broccoli florets. *Scientia Horticulturae*, 294, 110768. <https://doi.org/10.1016/J.SCIENTA.2021.110768>
- Xu, Y., Chen, Y., Cao, Y., Xia, W., & Jiang, Q. (2016). Application of simultaneous combination of microwave and steam cooking to improve nutritional quality of cooked purple sweet potatoes and saving time. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 36, 303–310. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2016.07.014>
- Yábar, E., Pedreschi, R., Chirinos, R., & Campos, D. (2011). Glucosinolate content and myrosinase activity evolution in three maca (*Lepidium meyenii* Walp.) ecotypes during preharvest, harvest and postharvest drying. *Food Chemistry*, 127(4), 1576–1583. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2011.02.021>
- Yahia, E. M. (2019). Introduction. In *Postharvest Technology of Perishable Horticultural Commodities* (pp. 1–41). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813276-0.00001-8>
- Yahia, E. M., Gardea-Béjar, A., Ornelas-Paz, J. de J., Maya-Meraz, I. O., Rodríguez-Roque, M. J., Rios-Velasco, C., Ornelas-Paz, J., & Salas-Marina, M. A. (2019). Preharvest Factors Affecting Postharvest Quality. In *Postharvest Technology of Perishable Horticultural Commodities* (pp. 99–128). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813276-0.00004-3>
- Yahya, H. N., Lignou, S., Wagstaff, C., & Bell, L. (2019). Changes in bacterial loads, gas composition, volatile organic compounds, and glucosinolates of fresh bagged Ready-To-Eat rocket under different shelf life treatment scenarios. *Postharvest Biology and Technology*, 148, 107–119. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2018.10.021>
- Yamauchi, N., Harada, K., & Watada, A. E. (1997). In vitro chlorophyll degradation in stored broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica* Plen.) florets. *Postharvest Biology and Technology*, 12(3), 239–245. [https://doi.org/10.1016/S0925-5214\(97\)00063-X](https://doi.org/10.1016/S0925-5214(97)00063-X)
- Yang, Q., Luo, M., Zhou, Q., Zhao, Y., Chen, J., & Ji, S. (2023). Insights into the loss of glucoraphanin in post-harvested broccoli—Possible involvement of the declined supply capacity of sulfur donor. *Plant Science*, 328, 111580. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2022.111580>
- Yang, Q., Zhou, Q., Zhou, X., Fang, H., Zhao, Y., Wei, B., & Ji, S. (2022). Insights into profiling of glucosinolates and genes involved in its metabolic pathway accompanying post-harvest yellowing of broccoli. *Postharvest Biology and Technology*, 185, 111780. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2021.111780>
- Ye, Y., Fang, Y., Xu, W., Wang, Q., Zhou, J., & Lu, R. (2016). 3,3'-Diindolylmethane induces anti-human gastric cancer cells by the miR-30e-ATG5 modulating autophagy. *Biochemical Pharmacology*, 115, 77–84.

- <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2016.06.018>
- Yi, G.-E., Robin, A., Yang, K., Park, J.-I., Hwang, B., & Nou, I.-S. (2016). Exogenous Methyl Jasmonate and Salicylic Acid Induce Subspecies-Specific Patterns of Glucosinolate Accumulation and Gene Expression in *Brassica oleracea* L. *Molecules*, *21*(10), 1417. <https://doi.org/10.3390/molecules21101417>
- Yildiz, F., & Wiley, R. C. (Eds.). (2017a). *Minimally Processed Refrigerated Fruits and Vegetables*. Springer US. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7018-6>
- Yildiz, F., & Wiley, R. C. (Eds.). (2017b). *Minimally Processed Refrigerated Fruits and Vegetables*. Springer US. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7018-6>
- Yousuf, B., Deshi, V., Ozturk, B., & Siddiqui, M. W. (2020). Fresh-cut fruits and vegetables: Quality issues and safety concerns. In *Fresh-Cut Fruits and Vegetables* (pp. 1–15). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816184-5.00001-X>
- Yuan, G. F., Sun, B., Yuan, J., & Wang, Q. M. (2009). Effects of different cooking methods on health-promoting compounds of broccoli. *Journal of Zhejiang University: Science B*, *10*(8), 580–588. <https://doi.org/10.1631/jzus.B0920051>
- Yuan, G., Sun, B., Yuan, J., & Wang, Q. (2010). Effect of 1-methylcyclopropene on shelf life, visual quality, antioxidant enzymes and health-promoting compounds in broccoli florets. *Food Chemistry*, *118*(3), 774–781. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.05.062>
- Yuan, S., Zuo, J., Li, X., Fan, X., Li, X., Wang, Q., & Zheng, S. (2021). Micro-perforated packaging delays leaf yellowing and maintains flavor of postharvest pak choi (*Brassica rapa* subsp. *chinensis*) following low-temperature storage. *Food Packaging and Shelf Life*, *29*, 100681. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2021.100681>
- Zeng, W., Vorst, K., Brown, W., Marks, B. P., Jeong, S., Pérez-Rodríguez, F., & Ryser, E. T. (2014). Growth of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* in packaged fresh-cut romaine mix at fluctuating temperatures during commercial transport, retail storage, and display. *Journal of Food Protection*, *77*(2), 197–206. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-13-117>
- Zhang, R., Lan, W., Ding, J., Ahmed, S., Qin, W., He, L., & Liu, Y. (2019). Effect of PLA/PBAT antibacterial film on storage quality of passion fruit during the shelf-life. *Molecules*, *24*(18). <https://doi.org/10.3390/molecules24183378>
- Zhang, Y., Ma, Y., Guo, Y., Yang, M., Fu, R., Chen, Y., & Sun, Y. (2021). Comprehensive insight into the chlorophyll degradation mechanism of postharvest broccoli heads under elevated O₂ controlled atmosphere. *Scientia Horticulturae*, *288*, 110395. <https://doi.org/10.1016/J.SCIENTA.2021.110395>
- Zhao, C., Liu, Y., Lai, S., Cao, H., Guan, Y., San Cheang, W., Liu, B., Zhao, K., Miao, S., Riviere, C., Capanoglu, E., & Xiao, J. (2019). Effects of domestic cooking process on the chemical and biological properties of dietary phytochemicals. *Trends in Food Science and Technology*, *85*(January), 55–66. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.01.004>
- Zhong, X., Dolan, K. D., & Almenar, E. (2015). Effect of steamable bag microwaving versus traditional cooking methods on nutritional preservation and physical properties of frozen vegetables: A case study on broccoli (*Brassica oleracea*). *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, *31*, 116–122. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2015.07.002>
- Zhong, X., Siddiq, M., Sogi, D. S., Harte, B., Dolan, K. D., & Almenar, E. (2017). Effect of microwave steamable bag design on the preservation of ascorbic acid and

antioxidant capacity and on the physical properties of cooked frozen vegetables: A case study on broccoli (*Brassica oleracea*). *LWT - Food Science and Technology*, 83, 165–171. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.05.018>