



UNIVERSIDAD DE
SANTIAGO DE COMPOSTELA

EVALUACIÓN DE PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICOS EN GRELO (*Brassica rapa*, L.) TRAS LA OPTIMIZACIÓN Y APLICACIÓN DEL PROCESO DE CONGELACIÓN



Alicia del Carmen Mondragón Portocarrero

TESIS DOCTORAL

2006



UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

**EVALUACIÓN DE PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICOS
EN GRELO (*Brassica rapa*, L.) TRAS LA OPTIMIZACIÓN
Y APLICACIÓN DEL PROCESO DE CONGELACIÓN**

Alicia del Carmen Mondragón Portocarrero

TESIS DOCTORAL

2006

Dra. PILAR BERMEJO BARRERA, Catedrática de Universidad y Directora del Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología de la Universidad de Santiago de Compostela

INFORMA QUE:

ALICIA DEL CARMEN MONDRAGÓN PORTOCARRERO ha realizado en este departamento, bajo la dirección de la Dra. M^a ANGELES ROMERO RODRÍGUEZ, Dra. M^a LOURDES VÁZQUEZ ODÉRIZ y Dr. ENRIQUE ARBONES MACIÑEIRA, el trabajo titulado “**Evaluación de parámetros físico-químicos en grelo (*Brassica rapa*, L.) tras la optimización y aplicación del proceso de congelación**”, que presenta para optar al grado de Doctora en Ciencia y Tecnología de los Alimentos.

Y para que así conste, firma la presente en Santiago de Compostela, en abril de 2006.

Fdo. **Dra. Pilar Bermejo Barrera**

Dra. M^a ANGELES ROMERO RODRIGUEZ y Dra. M^a LOURDES VÁZQUEZ ODÉRIZ, Profesoras Titulares de Universidad del Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología y **Dr. ENRIQUE ARBONES MACIÑEIRA**, Profesor Titular del Departamento de Ingeniería Agroforestal, de la Universidad de Santiago de Compostela

AUTORIZAN:

A la presentación de la memoria titulada “Evaluación de parámetros físico-químicos en grelo (*Brassica rapa*, L.) tras la optimización y aplicación del proceso de congelación”, realizada bajo su dirección, por **ALICIA DEL CARMEN MONDRAGÓN PORTOCARRERO**, en los laboratorios de Tecnología de los Alimentos, de Nutrición y Bromatología y en la nave de Industrias Agrarias y Alimentarias, del Campus de Lugo, para optar al grado de Doctora en Ciencia y Tecnología de los Alimentos.

Y para que así conste, firman la presente en Lugo, en abril de 2006.

**Fdo. Dra. M^a Angeles
Romero Rodríguez**

**Fdo. Dra. M^a Lourdes
Vázquez Odériz**

**Fdo. Dr. Enrique
Arbones Maciñeira**

Fdo. Alicia del Carmen Mondragón Portocarrero

DEDICATORIAS

✿ A **DIOS**, por darme la oportunidad de vivir, por brindarme momentos buenos para sonreír, y momentos no tan buenos para luchar, porque nunca te olvidas de mí...gracias Señor ✿

♥♥ A mis padres, **Carmelita y Mario**, por ser un ejemplo constante de amor y superación para mi persona, por todos los momentos compartidos y por brindarme siempre todo su amor, cariño, apoyo y ayuda. Los amo y los admiro muchísimo. Gracias a mi estupenda y amada amiga **Chaparrita**, tú sabes que eres la mejor y lo vales todo para mí ♥♥

♥ A mi querido **José Manuel**, porque ha sabido estar conmigo en las buenas y en las malas, por el día a día, por su amor y porque se ha convertido en una persona importantísima en mi vida. Tuve que salir a buscarte muy lejos, pero...te encontré, gracias corazón. ¡Muac....I love! ♥

🎵 A **Rodolfo Darío, Delia Angélica, Mario Alberto y Mario Chicas**, mis hermanos queridos, por todo lo que hemos vivido juntos, por el cariño y amor que nos tenemos. A **July**, mi cuñada y amiga, por sus consejos, su cariño y su excelente trato hacia toda la familia 🎵

🎵 A **Vanessa, Grace, Chabelita, Paulina, Galilea y Mario Alberto**, mis preciosos sobrinos, por sus regalitos, sus travesuras, sus recuerdos y su cariño inmenso. Los quiero mucho 🎵

AGRADECIMIENTOS

A **PROMEP-SEP** (Programa de Mejoramiento del Profesorado de la Secretaría de Educación Pública, en México) por la beca de 3 años concedida para llevar a cabo mis estudios de doctorado y a la **Universidad del Estado de Hidalgo**, por otorgarme el permiso laboral y continuar apoyándome económicamente cuando mi beca finalizó.

A la **Dra. M^a Ángeles Romero Rodríguez** y **Dra. M^a Lourdes Vázquez Odériz**, muchas gracias por haberme aceptado para trabajar en su laboratorio, por la confianza depositada en mi persona y por la independencia que me dejaron tener, ya que eso hizo más sólida mi formación científica. Asimismo, gracias por su rapidez y eficacia en revisar la tesis.

Al **Dr. Enrique Arbones Maciñeira**, por su trato tan cordial y por su ayuda en la puesta a punto e industrialización de los grelos.

A **José Manuel Miranda López**, por ayudarme en el día a día, en la industrialización de los grelos, en los experimentos, en el APCC, en la microbiología, en el lavado de material, en la escritura, en la impresión y en todo lo relacionado con la tesis, la cual también es un logro suyo. Mil gracias porque vales muchísimo, por ser como eres.

A las **personas integrantes del Tribunal de Tesis**, gracias por leer mi tesis y realizar los comentarios pertinentes, todo sirve para acrecentar mi formación.

Al **Dr. Jesús Simal Lozano**, por ser mi primer contacto con la Universidad de Santiago de Compostela, por su cortesía y trato amable.

Al **Dr. Paulo Cartaxana**, investigador del Instituto de Oceanografía de la Universidad de Lisboa, por su asesoramiento en la extracción de pigmentos y por el material bibliográfico que me envió, aún más, por su amabilidad al contestar mis correos electrónicos.

Al Dr. Ramiro Barcia Vieitez, por su asesoría en la extracción y determinación de actividad enzimática, por prestarme reactivos y por su trato tan agradable.

A los Drs. del LHICA: Dr. Alberto Cepeda Sáez, por permitirme usar algunos de sus equipos. A la Dra. Cristina Fente Sampayo, por su cordialidad y asesoramiento en resolver algunos problemas del HPLC, y por prestarme material de laboratorio. A la Dra. Beatriz Vázquez Belda, por su asesoría y excelente disposición en ayudarme con el tema del APPCC, muchas gracias Bea por tu amabilidad. Al Dr. Carlos M. Franco Abuín, por prestarme reactivos y material de laboratorio, pero más por su simpatía y buen trato hacia mi persona.

A la Dra. Pilar Calo Mata, por ser tan agradable, por sus consejos y por la amistad. Al Dr. Manuel Vázquez Vázquez, por sus charlas y consejos en el desarrollo de experimentos y demás. Al Dr. Juan Manuel Mesas Mesas, por su afabilidad, sus comentarios y por permitirme usar sus equipos. Al Dr. Luciano Sánchez García, por dejarme usar el rotavapor y por su simpatía.

Al Dr. Manuel Lolo, por ser la primera persona que me orientó en el manejo correcto del HPLC, mil gracias por toda su ayuda, sus recomendaciones y su paciencia en enseñarme.

A Noelia, porque juntas nos convertimos en procesadoras de grelos, porque siempre tuvo ánimo para trabajar en equipo conmigo, y porque nunca perdió la sonrisa y el optimismo, gracias por todo Noe.

Al recién Doctor Javier Añorve Morga, Javi, mi amigo y compañero de trabajo en la Universidad del Estado de Hidalgo, porque juntos iniciamos esta aventura en el doctorado, gracias por los viajes, los consejos y la amistad que espero perdure por muchísimo tiempo.

A la Sra. Mercedes Varela González, por permitirme vivir en su casa y tratarme como de su familia, por todos sus consejos, su ayuda, su generosidad, por su cariño hacia mí y por dejarme disfrutar sus ricos guisos y pastelitos, por todo lo estupenda persona que es.

A la Sra. Pilar, al Sr. Manuel y a Justo, por haberme abierto las puertas de su casa en Ribeira y dejarme ser una más de la familia, por su ayuda, su cariño, su apoyo y por permitirme saborear sus deliciosos mariscos gallegos.

A mis amigas y ex compañeras de laboratorio: Sonia, porque fue la primer amiga que encontré en Lugo, por las charlas, por su apoyo y amistad; Estibaliz, por su optimismo, su cariño, su ayuda y por su orientación en lo relacionado al APPCC; Silvia, por su sonrisa permanente y por escucharme en momentos difíciles, Jeannette, por la amistad y los momentos compartidos; y Cristina, por sus charlas tan amenas y simpáticas.

A la amiga española más pequeñita, Paula, gracias por sus dibujos, sus flores y su dulzura.

A Mar Mojo Flores, representante de LEBORIZ, y una amiga encantadora, gracias por los consejos, la ayuda y las conversaciones tan amenas, por toda su sencillez y simpatía.

A Manuel Miguélez Vila, responsable de CIENYTECH, por toda su ayuda en lo relacionado a HPLC y demás material de laboratorio. Por su excelente disposición, pero aún más importante, por su amistad, sus mensajes de ánimo, por permitirme ser su amiga y ser tan agradable. Gracias, gracias, gracias.

A Rubén Seara Escudero, también responsable de CIENYTECH, por su apoyo y consejos en el tema de HPLC, por su amabilidad y excelente trato.

A **José Luis Fernández Perejón**, por su colaboración en el transporte de los grelos, en las catas de los mismos y en general, por su apoyo y compañerismo. A **Suso, Elena** y muy en especial a **Belén**, por ayudarme a optimizar la industrialización de los grelos. A **Marlene** (en especial), **Alberto, Arancha, Luis Eduardo y Loli**, mis últimos compañeros de laboratorio, por el trabajo compartido, y porque de cada uno aprendí algo más.

A los chicos del servicio técnico de la USC: **Eduardo y Gonzalo**, por sus consejos y ayuda con el HPLC, y por su disposición y trato tan respetuoso y amable; **Fran** por su simpatía y sonrisa contagiosa, **Santi y Javier** por su cordialidad. Casi formaron parte del laboratorio por todas las semanas que nos visitaron, mil gracias por arreglar los equipos y demás desperfectos, también por las charlas tan amenas.

A las chicas del FEDER, **Lucía, Marién y Noelia**, por toda su ayuda con el liofilizador y demás experimentos, pero aún más, por su simpatía y amabilidad. A **Alba**, por su cordialidad y por permitirme usar la ultracentrífuga y enseñarme su funcionamiento.

A **Nacho**, encargado del servicio de informática, por su ayuda con los ordenadores y programas informáticos, más aún, por su buen trato y simpatía.

A **Rafael**, responsable de la Secretaría del Departamento de Química Analítica, por su gran amabilidad y paciencia, por toda su ayuda.

A las señoras **Elsa, Inés, Mercedes, Teresa, Teresa Camaño, Esther, Lola y Manolita** porque siempre tuvieron un momentito para saludarme y brindarme una sonrisa.

A **Victor Vázquez Patiño**, representante de BOENTE, por su servicio en el aporte de reactivos y material de laboratorio. A **Jordi Traveset y Maika López**, representantes de TEKNOKROMA, por su orientación con las columnas cromatográficas y en general, con lo relacionado al HPLC. A **Carlos Pérez y Alessandro Scapoli**, representantes de JASCO, por su

disposición a asesorarme con el HPLC, por sus folletos informativos del mismo, aún más, por su cortesía.

A **Arlando Samuel, Ananías Pascoal, y Fabião Jorge**, mis amigos mozambiqueños, por permitirme compartir sus comidas, sus costumbres y su música, muchas gracias por esos primeros meses.

A las chicas del LHIICA: **Carmen, Mónica, Chelo, Ana, Belén y Sandra**, por su ayuda en el préstamo de reactivos y por las charlas. A **Xesús Feas**, por los buenos momentos compartidos y su ayuda. A **Armando, Ternura y Enka**, por ser los primeros en recibirme en Lugo.

A las amigas y amigos que encontré en España: **Paty** (de Madrid), **Marta** (tecnología de alimentos), **Marta** (bioquímica), **Mónica, Marian, Manu, Marlene, Lupe, Marilú, Almudena, Encarna, Julián, Tino, Elisa, Manolito, Lúa, Juan, Fabricio, Andrés, Ricardo, Miguel y Alfredo**. Gracias por los ánimos y los buenos momentos.

A **Dalia, Jaime y Antonio**, por la bonita amistad que inició en Santiago y que espero perdure en México. Gracias porque siempre me recuerdan.

A **Elizabeth, Judith, Rosy y Chely**, mis amigas y compañeras del Centro de Investigaciones Químicas en México, por darme todo su apoyo para iniciar mi doctorado, por ayudarme con trámites y demás, pero aún más importante, por la amistad que inició hace tiempo y espero perdure por siempre. Con cariño para la pequeña **Eleni**.

A mis compañeros del Centro de Investigaciones Químicas de la Universidad del Estado de Hidalgo, en México, por sus buenos deseos hacia mi persona y por el trabajo compartido. A la **Lic. Luisa Elena Noriega Armenta**, responsable de Becas Internacionales, por su ayuda y total apoyo en el trámite de la beca, por sus correos llenos de ánimo y por la amistad que tenemos.

*A mis ex estudiantes de la licenciatura en química de alimentos, **Nora Elva, Juan Manuel, Israel Oswaldo y Jorge Santiago**, porque han sido los mejores estudiantes que he tenido, y porque han estado por correo electrónico siempre al pendiente de mí, brindándome ánimo y cariño. Gracias amigos, siempre hay que seguir luchando por superarse y alcanzar sus metas.*

*A la **familia Castillo Paredes**, especialmente a la **Sra. Panchita**, mi amiga querida, por recordarme siempre y por la excelente amistad que tenemos, mil gracias.*

*A mis amigos mexicanos de siempre, **Magda Pérez, Magda Manzano, Mony, Heriberto Figueroa y Armando Carrillo**, por darme todo su cariño y apoyo para seguir estudiando y superándome, por no olvidarse de mí, ¡que siga la amistad!*

*A **Polito, Lichito, Trompetolo, Asno, Tigre, Chucho, Chango y Petunio**, por todos los días y las noches que pasaron conmigo.*

*A mi país, **México**, porque al estar tan lejos he aprendido a valorarlo y a quererlo más, por sus costumbres, sus comidas y su gente, porque sé que no todo va bien, pero tenemos que salir adelante.*

*A **Galicia**, comunidad autónoma de España, por sus paisajes tan bellos y tan verdes, por su gente, sus costumbres y su rica comida. Porque la estancia fue muy tranquila y cómoda, a pesar del frío. Gracias **Lugo**.*

*Finalmente, y no menos importante, gracias a "**mi querido equipo de HPLC**" con el cual aprendí todo lo que ahora conozco del tema: "sufrimos" juntos los desperfectos, "lloramos" cuando las técnicas no salían y "celebramos" los buenos resultados. Gracias por aguantar los cientos de pinchazos y por soportar todos los "adornos" que te coloqué.*

To thank everyone who has touched my life.

I know who they are and so do they.

I thank them for their enthusiasm, love, affection

and tremendous hard work,

These are things one never forgets

Phil Collins

ÍNDICE GENERAL

Abreviaturas.....	i
Índice de figuras.....	iii
Índice de tablas.....	vii
INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Hortalizas.....	3
1.1.1. El nabo.....	4
1.2. El procesado de las hortalizas.....	12
1.2.1. Las operaciones preliminares.....	12
1.2.1.1. Recepción de hortalizas.....	13
1.2.1.2. Limpieza y lavado.....	13
1.2.1.3. Selección.....	15
1.2.1.4. Recorte.....	15
1.2.2. El escaldado.....	15
1.2.2.1. Problemas ligados al escaldado.....	18
1.2.2.2. Las técnicas de escaldado.....	20
1.2.3. La cocción.....	21
1.2.4. Enfriado y escurrido.....	26
1.2.5. El envasado a vacío.....	28
1.2.6. La congelación.....	29
1.2.7. El almacenamiento.....	30
1.3. Vitaminas.....	33
1.3.1. Tiamina (vitamina B ₁).....	34
1.3.2. Riboflavina (vitamina B ₂).....	37
1.3.3. Ácido ascórbico (vitamina C).....	40
1.4. Pigmentos.....	45
1.4.1. Carotenoides.....	45
1.4.2. Clorofilas.....	49
OBJETIVOS.....	53
MATERIAL Y MÉTODOS.....	57
3.1. Descripción de las instalaciones.....	59
3.1.1. Instalación de aire comprimido.....	60
3.1.1.1. Sistema de generación de aire comprimido.....	60
3.1.1.2. Red de distribución.....	62
3.1.2. Instalación eléctrica.....	62
3.1.3. Instalación de fontanería.....	63
3.1.4. Instalación de frío.....	63
3.1.5. Instalación de vapor.....	63
3.1.6. Instalación para la cocción.....	64
3.2. Descripción de los equipos.....	65
3.2.1. Equipo de lavado.....	65
3.2.1.1. Descripción.....	65
3.2.1.2. Funcionamiento.....	66
3.2.2. Equipo de escaldado.....	67

3.2.2.1. Descripción.....	67
3.2.2.2. Funcionamiento.....	68
3.2.3. Equipo de prensado.....	68
3.2.3.1. Descripción.....	68
3.2.3.2. Funcionamiento.....	71
3.2.4. Equipo de centrifugado.....	71
3.2.4.1. Descripción.....	72
3.2.4.2. Funcionamiento.....	73
3.2.5. Equipo de envasado.....	73
3.2.5.1. Descripción.....	73
3.2.5.2. Funcionamiento.....	74
3.3. Determinaciones analíticas.....	75
3.3.1. Determinaciones de actividad enzimática.....	75
3.3.1.1. Determinación de la actividad de la peroxidasa.....	75
3.3.1.2. Determinación de la actividad de la lipoxigenasa.....	78
3.3.2. Determinaciones físico-químicas.....	80
3.3.2.1. Determinación de actividad de agua.....	80
3.3.2.2. Determinación de humedad.....	81
3.3.2.3. Determinación de pH.....	82
3.3.2.4. Determinación de acidez titulable.....	83
3.3.2.5. Determinación de vitamina B ₁ (tiamina) y vitamina B ₂ (riboflavina).....	84
3.3.2.6. Determinación de vitamina C (AA y DHAA).....	88
3.3.2.7. Determinación de los parámetros de color CIE _{L*a*b*}	91
3.3.2.8. Determinación de pigmentos.....	93
3.3.2.9. Determinación de cenizas.....	97
3.3.2.10. Determinación de proteína.....	98
3.3.2.11. Determinación de fenoles totales.....	101
3.3.2.12. Determinación de actividad reductora.....	103
3.3.3. Determinaciones microbiológicas.....	104
3.3.3.1. Aerobios mesófilos.....	106
3.3.3.2. Enterobacteriáceas.....	106
3.3.3.3. <i>Escherichia coli</i>	107
3.3.3.4. <i>Staphylococcus aureus</i>	107
3.3.3.5. <i>Listeria monocytogenes</i>	108
3.3.3.6. <i>Salmonella spp</i>	109
3.3.3.7. <i>Clostridium perfringens</i>	110
3.4. Análisis estadístico.....	111
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	113
4.1. Optimización de las etapas del proceso de congelación en el grelo.....	115
4.1.1. Escaldado.....	115
4.1.1.1. Optimización del proceso a nivel de laboratorio.....	115
4.1.1.2. Optimización del proceso a nivel planta piloto.....	133
4.1.2. Cocción.....	132
4.1.3. Escurrido.....	135
4.1.3.1. Prensado.....	135
4.1.3.2. Centrifugado.....	136

4.2. Aplicación del proceso de congelación al grelo escaldado y al grelo cocido.....	139
4.2.1. Etapas del proceso de congelación.....	139
4.2.2. Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (APPCC).....	146
4.2.2.1. Grello escaldado congelado.....	148
4.2.2.2. Grello cocido congelado.....	156
4.3. Puesta a punto de métodos analíticos.....	163
4.3.1. Vitaminas B ₁ y B ₂ (tiamina y riboflavina).....	163
4.3.1.1. Condiciones cromatográficas.....	163
4.3.1.2. Extracción de las vitaminas.....	166
4.3.1.3. Extracción en fase sólida (EFS).....	169
4.3.1.4. Separación cromatográfica de tiamina y riboflavina.....	170
4.3.1.5. Parámetros de validación del método.....	170
4.3.1.6. Cromatogramas.....	175
4.3.2. Ácido ascórbico y ácido dehidroascórbico.....	178
4.3.2.1. Condiciones cromatográficas.....	178
4.3.2.2. Extracción del ácido ascórbico.....	179
4.3.2.3. Reacción de reducción del DHAA.....	179
4.3.2.4. Parámetros de validación del método.....	180
4.3.2.5. Cromatogramas.....	182
4.3.3. Pigmentos.....	183
4.3.3.1. Condiciones cromatográficas.....	183
4.3.3.2. Extracción de los pigmentos.....	186
4.3.3.3. Parámetros de validación del método.....	187
4.3.3.4. Cromatogramas.....	195
4.3.4. Fenoles totales.....	199
4.4. Resultados de determinaciones analíticas.....	201
4.4.1. Determinación de enzimas.....	202
4.4.1.1. Enzima peroxidasa (POD).....	202
4.4.1.2. Enzima lipoxigenasa (LOX).....	205
4.4.2. Determinaciones físico-químicas.....	208
4.4.2.1. Actividad de agua (a_w).....	213
4.4.2.2. Humedad.....	214
4.4.2.3. pH.....	215
4.4.2.4. Acidez titulable.....	217
4.4.2.5. Vitamina B ₁ (tiamina) y vitamina B ₂ (riboflavina).....	218
4.4.2.6. Vitamina C (AA y DHAA).....	223
4.4.2.7. Parámetros de color CIE _{L*a*b*}	229
4.4.2.8. Pigmentos.....	235
4.4.2.9. Cenizas.....	248
4.4.2.10. Proteína.....	249
4.4.2.11. Fenoles totales.....	249
4.4.2.12. Actividad reductora.....	251
4.4.3. Determinaciones microbiológicas.....	252
CONCLUSIONES	255
BIBLIOGRAFÍA	259

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	El nabo (<i>Brassica rapa</i> , L.).....	4
Figura 2.	Platos típicos gallegos.....	6
Figura 3.	Recolección de grelos.....	10
Figura 4.	Estructura de vitamina B ₁	34
Figura 5.	Fuentes de vitamina B ₁	36
Figura 6.	Estructura de vitamina B ₂	37
Figura 7.	Fuentes de vitamina B ₂	39
Figura 8.	Estructura del ácido ascórbico.....	40
Figura 9.	Oxidación del ácido ascórbico a ácido dehidroascórbico.....	41
Figura 10.	Fuentes de vitamina C.....	43
Figura 11.	Estructura del β -caroteno.....	46
Figura 12.	Estructura de luteína.....	47
Figura 13.	Fuentes de carotenoides.....	48
Figura 14.	Estructuras de clorofila a y clorofila b.....	49
Figura 15.	Fuentes de clorofilas.....	51
Figura 16.	Sistema de generación de aire comprimido.....	60
Figura 17.	Cámaras frigoríficas.....	63
Figura 18.	Caldera.....	64
Figura 19.	Quemadores-paelleros.....	64
Figura 20.	Equipo de lavado.....	65
Figura 21.	Equipo de escaldado.....	67
Figura 22.	Equipo de prensado.....	69
Figura 23.	Equipo de centrifugado.....	71
Figura 24.	Equipo de envasado.....	74
Figura 25.	Representación del espacio de color CIE _{L*a*b*}	93
Figura 26.	Evolución del contenido de vitamina C en grelo fresco y expuesto a 4 métodos de escaldado.....	121
Figura 27.	Evolución del pH en grelo fresco y expuesto a 4 métodos de escaldado.....	123
Figura 28.	Evolución de la acidez titulable en grelo fresco y expuesto a 4 métodos de escaldado.....	125
Figura 29.	Evolución del contenido de humedad en grelo fresco y expuesto a 4 métodos de escaldado.....	127
Figura 30.	Evolución de la luminosidad (L*) en grelo fresco y expuesto a 4 métodos de escaldado.....	128
Figura 31.	Evolución de la cromaticidad (C*) en grelo fresco y expuesto a 4 métodos de escaldado.....	130
Figura 32.	Evolución del tono (H°) en grelo fresco y expuesto a 4 métodos de escaldado.....	132
Figura 33.	Recepción.....	140
Figura 34.	Selección y clasificación.....	140
Figura 35.	Corte.....	141
Figura 36.	Limpieza y lavado.....	141

Figura 37.	Escaldado.....	142
Figura 38.	Cocción.....	142
Figura 39.	Enfriado.....	143
Figura 40.	Prensado.....	143
Figura 41.	Envasado.....	144
Figura 42.	Producto envasado al vacío.....	144
Figura 43.	Almacenamiento en congelación.....	145
Figura 44.	Diagrama de flujo del proceso de fabricación de grelo escaldado y congelado.....	150
Figura 45.	Diagrama de flujo del proceso de fabricación de grelo cocido y congelado.....	157
Figura 46.	Efecto del pH de la fase móvil sobre los tiempos de retención y las áreas de vitaminas B ₁ y B ₂	165
Figura 47.	Cromatogramas de a) una mezcla patrón de vitaminas B ₁ y B ₂ y b) 1 mL de agua milli-Q tratado como una muestra.....	167
Figura 48.	Determinación a) simultánea y b) por separado, de tiamina y riboflavina.....	170
Figura 49.	Recta de calibración para tiamina.....	172
Figura 50.	Recta de calibración para riboflavina.....	175
Figura 51.	Cromatograma de un patrón de tiamina.....	176
Figura 52.	Cromatograma de un patrón de riboflavina.....	176
Figura 53.	Cromatogramas de tiamina en muestras de a) grelo fresco, b) grelo escaldado y c) grelo cocido.....	177
Figura 54.	Cromatogramas de riboflavina en muestras de a) grelo fresco, b) grelo escaldado y c) grelo cocido.....	177
Figura 55.	Espectro de absorción del ácido ascórbico.....	178
Figura 56.	Recta de calibración para ácido ascórbico.....	181
Figura 57.	Cromatograma de un patrón de ácido ascórbico.....	182
Figura 58.	Cromatogramas de ácido ascórbico en muestras de a) grelo fresco, b) grelo escaldado y c) grelo cocido.....	183
Figura 59.	Espectro de absorción de luteína.....	184
Figura 60.	Espectro de absorción del β -caroteno.....	184
Figura 61.	Espectros de absorción de clorofila a y clorofila b.....	185
Figura 62.	Espectros de absorción de feofitina a y feofitina b.....	185
Figura 63.	Recta de calibración para luteína.....	191
Figura 64.	Recta de calibración para β -caroteno.....	192
Figura 65.	Recta de calibración para clorofila a.....	193
Figura 66.	Recta de calibración para clorofila b.....	193
Figura 67.	Recta de calibración para feofitina a.....	194
Figura 68.	Recta de calibración para feofitina b.....	195
Figura 69.	Cromatogramas de patrones de luteína, β -caroteno, clorofila a y clorofila b.....	196
Figura 70.	Cromatogramas de patrones de feofitina a y feofitina b.....	196
Figura 71.	Cromatogramas a 450 nm en muestras de a) grelo fresco, b) grelo escaldado y c) grelo cocido.....	197
Figura 72.	Cromatogramas a 430 nm en muestras de a) grelo fresco, b) grelo escaldado y c) grelo cocido.....	197

Figura 73.	Cromatogramas a 460 nm en muestras de a) grelo fresco, b) grelo escaldado y c) grelo cocido.....	198
Figura 74.	Cromatogramas a 405 nm en muestras de a) grelo fresco, b) grelo escaldado y c) grelo cocido.....	198
Figura 75.	Cromatogramas a 432 nm en muestras de a) grelo fresco, b) grelo escaldado y c) grelo cocido.....	199
Figura 76.	Recta de calibración para ácido tánico.....	200
Figura 77.	Aspecto de los grelos escaldados y cocidos tras la descongelación.....	201
Figura 78.	Cinética enzimática de la peroxidasa en grelo fresco y grelo escaldado.....	203
Figura 79.	Evolución en la actividad de la peroxidasa en grelo escaldado durante el almacenamiento a temperatura de congelación.....	205
Figura 80.	Evolución en la actividad de la lipoxigenasa en grelo escaldado durante el almacenamiento a temperatura de congelación.....	207
Figura 81.	Evolución de la actividad de agua en grelo escaldado y grelo cocido durante el almacenamiento a temperatura de congelación...	214
Figura 82.	Evolución de la humedad en grelo escaldado y grelo cocido durante el almacenamiento a temperatura de congelación.....	215
Figura 83.	Evolución del pH en grelo escaldado y grelo cocido durante el almacenamiento a temperatura de congelación.....	217
Figura 84.	Evolución de la acidez titulable en grelo escaldado y grelo cocido durante el almacenamiento a temperatura de congelación....	218
Figura 85.	Evolución de la vitamina B ₁ en grelo escaldado y grelo cocido durante el almacenamiento a temperatura de congelación.....	221
Figura 86.	Evolución de la vitamina B ₂ en grelo escaldado y grelo cocido durante el almacenamiento a temperatura de congelación.....	223
Figura 87.	Evolución del AA y DHAA en grelo escaldado y grelo cocido durante el almacenamiento a temperatura de congelación.....	227
Figura 88.	Evolución de L* en grelo escaldado y grelo cocido durante el almacenamiento a temperatura de congelación.....	230
Figura 89.	Evolución de a*/b* en grelo escaldado y grelo cocido durante el almacenamiento a temperatura de congelación.....	232
Figura 90.	Evolución de H° en grelo escaldado y grelo cocido durante el almacenamiento a temperatura de congelación.....	234
Figura 91.	Evolución de C* en grelo escaldado y grelo cocido durante el almacenamiento a temperatura de congelación.....	235
Figura 92.	Evolución de la luteína en grelo escaldado y grelo cocido durante el almacenamiento a temperatura de congelación.....	238
Figura 93.	Evolución del β-caroteno en grelo escaldado y grelo cocido durante el almacenamiento a temperatura de congelación.....	240
Figura 94.	Evolución de la clorofila a en grelo escaldado y grelo cocido durante el almacenamiento a temperatura de congelación.....	243
Figura 95.	Evolución de la clorofila b en grelo escaldado y grelo cocido durante el almacenamiento a temperatura de congelación.....	244
Figura 96.	Evolución de la feofitina a en grelo escaldado y grelo cocido durante el almacenamiento a temperatura de congelación.....	246

Figura 97.	Evolución de la feofitina b en grelo escaldado y grelo cocido durante el almacenamiento a temperatura de congelación.....	247
Figura 98.	Evolución de fenoles totales en grelo escaldado y grelo cocido durante el almacenamiento a temperatura de congelación.....	251
Figura 99.	Evolución de la actividad reductora en grelo escaldado y grelo cocido durante el almacenamiento a temperatura de congelación...	252

ÍNDICE DE TABLAS

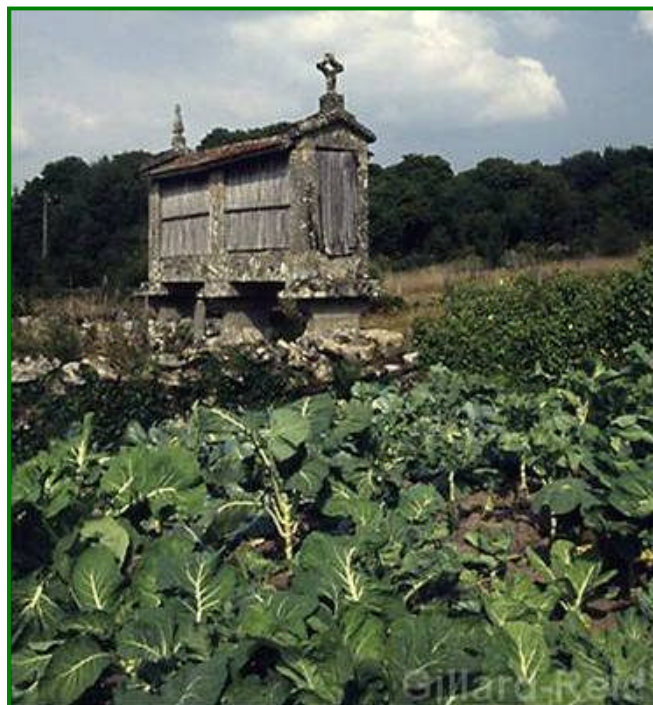
Tabla 1.	Composición de grelos y nabizas.....	11
Tabla 2.	Enzimas responsables del deterioro de la calidad de las hortalizas no escaldadas.....	18
Tabla 3.	Contenido en ácido ascórbico expresado en mg/kg en función de la forma de escaldado.....	19
Tabla 4.	Comparación del contenido en vitamina C de algunas hortalizas antes y después de hervirlas.....	25
Tabla 5.	Estabilidad de las vitaminas.....	25
Tabla 6.	Contenido en vitamina B ₁ de distintos alimentos.....	36
Tabla 7.	Contenido en vitamina B ₂ de distintos alimentos.....	39
Tabla 8.	Contenido en vitamina C de distintos alimentos.....	43
Tabla 9.	Nomenclatura para definir la variable “Nº de muestreo”.....	117
Tabla 10.	Cenizas en grelo fresco y expuesto a 4 métodos de escaldado.....	117
Tabla 11.	ANOVA de dos factores (tiempo de almacenamiento y método de escaldado, con interacción).....	118
Tabla 12.	ANOVA de un factor (método de escaldado).....	119
Tabla 13.	Vitamina C en grelo fresco y expuesto a 4 métodos de escaldado.....	120
Tabla 14.	pH en grelo fresco y expuesto a 4 métodos de escaldado.....	122
Tabla 15.	Acidez titulable en grelo fresco y expuesto a 4 métodos de escaldado.....	124
Tabla 16.	Humedad en grelo fresco y expuesto a 4 métodos de escaldado.....	126
Tabla 17.	Luminosidad (L*) en grelo fresco y expuesto a 4 métodos de escaldado.....	128
Tabla 18.	Cromaticidad (C*) en grelo fresco y expuesto a 4 métodos de escaldado.....	129
Tabla 19.	Tono (H°) en grelo fresco y expuesto a 4 métodos de escaldado.....	131
Tabla 20.	Resultados de la prueba de actividad de la peroxidasa.....	133
Tabla 21.	Valores de presión (P) y fuerza (F) ejercidos en las cubetas en función de la presión de trabajo.....	136
Tabla 22.	Velocidad de giro de la polea y del tambor en función de la frecuencia del motor.....	137
Tabla 23.	CUADRO DE GESTIÓN: Puntos Críticos de Control aplicables en la línea de producción de grelo escaldado y envasado a vacío.....	151
Tabla 24.	CUADRO DE GESTIÓN: Puntos Críticos de Control aplicables en la línea de producción de grelo cocido y envasado a vacío.....	158
Tabla 25.	Contenido en vitaminas B ₁ y B ₂ de muestras de nabizas (primer ensayo).....	168

Tabla 26.	Contenido en vitaminas B ₁ y B ₂ de muestras de nabiza (segundo ensayo).....	169
Tabla 27.	Datos de la recta de calibración para tiamina.....	172
Tabla 28.	Datos de la recta de calibración para riboflavina.....	174
Tabla 29.	Datos de la recta de calibración para ácido ascórbico.....	181
Tabla 30.	Datos de las rectas de calibración para luteína y β -caroteno.....	191
Tabla 31.	Datos de las rectas de calibración para clorofila a y clorofila b.....	192
Tabla 32.	Datos de las rectas de calibración para feofitina a y feofitina b.....	194
Tabla 33.	Datos de la recta de calibración para ácido tánico.....	200
Tabla 34.	Actividad de peroxidasa en grelo escaldado.....	204
Tabla 35.	Actividad de lipoxigenasa en grelo escaldado.....	206
Tabla 36.	ANOVA de dos factores (tratamiento térmico y tiempo de almacenamiento, con interacción).....	208
Tabla 37.	ANOVA de un factor (tiempo de almacenamiento) en grelo escaldado.....	209
Tabla 38.	ANOVA de un factor (tiempo de almacenamiento) en grelo cocido.....	210
Tabla 39.	Test t-Student entre el grelo fresco y el grelo escaldado.....	211
Tabla 40.	Test t-Student entre el grelo fresco y el grelo cocido.....	212
Tabla 41.	a _w y humedad en grelo escaldado y grelo cocido.....	213
Tabla 42.	pH y acidez en grelo escaldado y grelo cocido.....	216
Tabla 43.	Tiamina y riboflavina en grelo escaldado y grelo cocido.....	220
Tabla 44.	Ácido ascórbico y ácido dehidroascórbico en grelo escaldado y grelo cocido.....	224
Tabla 45.	Luminosidad y a*/b* en grelo escaldado y grelo cocido.....	230
Tabla 46.	Tono y cromaticidad en grelo escaldado y grelo cocido.....	233
Tabla 47.	Luteína y β -caroteno en grelo escaldado y grelo cocido.....	237
Tabla 48.	Clorofila a y clorofila b en grelo escaldado y grelo cocido.....	242
Tabla 49.	Feofitina-a y feofitina-b en grelo escaldado y grelo cocido.....	245
Tabla 50.	Cenizas y proteína en grelo escaldado y grelo cocido.....	248
Tabla 51.	Fenoles totales y actividad reductora en grelo escaldado y grelo cocido.....	250
Tabla 52.	Resultados microbiológicos obtenidos en grelo escaldado.....	254
Tabla 53.	Resultados microbiológicos obtenidos en grelo cocido.....	254

ABREVIATURAS

AA	ácido ascórbico
ác.	ácido
AISI	American Iron and Steel Institute
ANOVA	análisis de varianza
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
APPCC	Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control
a _w	actividad de agua
BHI	Agar Infusión-Cerebro-Corazón
BHT	2,6-di-ter-butil-4-metilfenol
BOE	Boletín Oficial del Estado
C*	cromaticidad
CAE	Código Alimentario Español
CE	Comunidad Europea
CIE	Commission Internationale de L'Eclairage
Cód.	código
col.	colaboradores
cont.	continuación
CPH/M	correctas prácticas de higiene y/o manipulación
CV	coeficiente de variación
D	dextrógiro
D+D	desinsectización mas desratización
DHAA	ácido dehidroascórbico
DIN	Deustch Industrie Normative
DOUE	Diario Oficial de la Unión Europea
DS	desviación estándar
DTT	ditiotreitol
E	método de escaldado
EFS	extracción en fase sólida
eq.	equivalentes
etc.	etcétera
EVA	copolímero etilenoacetato de vinilo
F	fuerza
FAD	flavin adenin dinucleótido
FAO	Food Agriculture Organization of the United Nations
FDA	Food Drug Administration
FMN	flavin mononucleótido
FP	fluorescencia
H°	tono
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HR	humedad relativa
HTST	High Temperature- Short Heating Time
IOM	Institute of Medicine
ISO	International Organization for Standardization

L	levógiro
L.	Linneo
L*	luminosidad
L+D	limpieza mas desinfección
LC	cromatografía líquida
LOX	lipoxigenasa
LSAMM	Agar Listeria Medio Selectivo Modificado
n	número de muestras
Nº	número
OBIS	Oxoid Biochemical Identification System
ODS	Octadecyl Silane
P	presión
PA	poliamida
PCA	Agar Cuenta en Placa
PCC	Punto Crítico de Control
PE	polietileno
PDA	photo diode array detector
PM	peso molecular
POD	peroxidasa
PP	polipropileno
PS	poliestireno
PVC	policloruro de vinilo
PVCD	policloruro de vinilideno
r	coeficiente de correlación
RD	Real Decreto
RDA	ración diaria recomendada
rpm	revoluciones por minuto
SPS	Agar Sulfito-Polimixina-Sulfadiazina
t	tiempo de almacenamiento
t ^a	temperatura
TIG	gas inerte tungsteno
TMP	tiamina monofosfato
TPP	tiamina pirofosfato
TTP	tiamina trifosfato
U	unidades
ufc	unidades formadoras de colonias
UNE	Una Norma Española
UNE-EN	Una Norma Española-Europe Normative
UV	ultravioleta
v/v	proporción volumen/volumen
VIS	visible
VRBD	Agar Bilis-Rojo-Violeta-Dextrosa
XLD	Agar Xilosa Lisina Desoxicolato



INTRODUCCIÓN

1.1. HORTALIZAS

La hortaliza se define como cualquier planta herbácea hortícola en sazón que se puede utilizar como alimento, ya sea en crudo o cocinada (CAE, 2001).

La denominación de “verdura” distingue a un grupo de hortalizas en las que la parte comestible está constituida por sus órganos verdes (hojas, tallos o inflorescencia) y la de “legumbres frescas” a los frutos y semillas no maduros de las hortalizas leguminosas (CAE, 2001).

Valor nutritivo de las hortalizas

La mayoría de las hortalizas contienen como mínimo un 60 % de agua y generalmente, más del 80 %. Su valor como fuente de macronutrientes (proteína, grasa, carbohidratos) es limitado aunque existen excepciones importantes. Las leguminosas, por ejemplo, son ricas en almidón y en proteína, mientras que los tubérculos son ricos en almidón. Con la excepción de leguminosas y tubérculos, el principal valor nutritivo de las hortalizas deriva de su contenido en micronutrientes (vitaminas y minerales), y de carbohidratos complejos difíciles de digerir (fibra), que tienen muy poco valor nutritivo aunque son importantes para la función intestinal (Conning, 1992; Candela y Astiasarán, 2000).

Como ya se ha mencionado, las hortalizas son preciadas fuentes de vitaminas como por ejemplo, de vitaminas del grupo B (B_1 o tiamina, B_2 o riboflavina, B_3 o niacina, B_6 o piridoxina, B_9 o ácido fólico, B_{12} o cobalamina), de vitamina C (ácido ascórbico) y de β -caroteno; asimismo aportan vitamina E y K. Estas vitaminas podrían jugar un papel preventivo frente a ciertos tipos de cáncer y, en el caso del β -caroteno, la actividad podría ser doble: por una parte la actividad vitamínica de su derivado, la vitamina A, y por otra la actividad antioxidante del mismo β -caroteno, que, frenando la oxidación del α -tocoferol (vitamina E), permitiría proteger algunos procesos de oxidación de los ácidos grasos insaturados de las membranas. Los tratamientos industriales destruyen una parte de las vitaminas, pero no más que las preparaciones culinarias habituales, de forma que

los productos transformados conservan un gran valor nutricional (Adragna-Bourgeois y Bourgeois, 2002).

1.1.1. El nabo



Figura 1. El nabo (*Brassica rapa*, L.)

Origen

Se cree que el origen del nabo (Figura 1) se sitúa en dos emplazamientos diferentes, uno en el área mediterránea y otro en una zona que abarca territorios de Afganistán y Pakistán. También existen referencias de esta planta en China, Grecia y Roma. En la Edad Media era frecuente encontrarla en las huertas de los monasterios. Su presencia en el continente americano es reciente ya que fue introducida por los emigrantes procedentes de Europa. En la actualidad se produce en las regiones templadas y frías de todo el mundo (Gisport, 1990).

Importancia económica

En Galicia el cultivo del nabo tiene una larga tradición y amplia distribución (Benavente, 1995); las variedades tiernas se utilizan para el consumo humano, mientras que las mayores son dedicadas a forraje para el ganado (<http://es.wikipedia.org/wiki/Nabo>, 06/01/2006).

Como alimento, destinado al consumo humano, esta hortaliza se utiliza bajo distintas denominaciones:

Las **nabizas**, conocidas también con el nombre de rabizas, son las primeras hojas de las plantas del nabo, muy tiernas y dulces. Cuando éstas ya son más grandes se cortan con parte del tallo y reciben el nombre de **cimóns**. A veces se le llama nabiza al propio nabo, cuando procede de tierras de secano y es pequeño (Benavente, 1995).

Los **grelos** son los tallos tiernos de la planta del nabo y sus hojas, justo antes de florecer o “*grelar*” (antes de que se vean los capullos de las flores), cuando la planta llega al final de su ciclo (Díaz, 1974; Parrilla, 1991).

El grelo es comestible mientras está tierno. Cuando la flor está desarrollada el grelo se endurece y ya no es posible su consumo. Un buen sistema para saber si el grelo es blando, o no, consiste en hacerle un corte transversal en su extremo. Si el centro está muy blanco (blanco nieve) el grelo no es comestible a causa de su dureza (<http://es.wikipedia.org/wiki/Nabo>, 06/01/2006).

En España, el principal productor y consumidor de grelos es Galicia. Según el Estudio Nacional de Nutrición y Alimentación, elaborado por el Instituto Nacional de Estadística, mientras el consumo medio de grelos en España es de solo 1.04 g por habitante, esta cifra se dispara en Galicia hasta alcanzar 6.72 g por habitante. Este dato pone de manifiesto un mayor consumo de verduras y hortalizas en Galicia (Llamazares, 2000; Varela y Moreiras, 2004; http://nutriserver.com/Divulgacion/Consumo_de_alimentos_ENNA_91/Galicia/Galicia.html, 05/04/2006).

El grelo es un ingrediente básico de los platos más famosos de la cocina tradicional gallega, tales como el lacón con grelos o el caldo gallego (Figura 2) (<http://www.marronglace.net/grelosdegalicia.htm>, 06/01/2006). Los grelos y nabizas son verduras muy frecuentes en los mercados gallegos durante el invierno, sin embargo cada vez es más frecuente encontrarlos en cualquier punto del país (http://www.consumer.es/web/es/alimentacion/aprender_a_comerbien, 06/01/2006).



Lacón con grelos



Caldo gallego

Figura 2. Platos típicos gallegos

Sus múltiples usos, se reflejan claramente en el refranero gallego (<http://www.marronglace.net/grelosdegalicia.htm>, 06/01/2006):

***“Do nabo sae a nabiza,
da nabiza sae o grelo.
Nabo, nabiza e máis grelo
trinidade do galego.
Son tres persoas distintas
un só Deus verdadeiro”***

Clasificación científica

Reino:	Plantae
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Orden:	Brassicales
Familia:	Brassicaceae
Género:	<i>Brassica</i>
Especie:	<i>rapa</i>
Variedad	<i>rapa</i>
Nombre binomial:	<i>Brassica rapa</i> , L.

Descripción botánica

El nabo es una hortaliza bianual, de raíz carnosa de forma esférica, fusiforme o aplastada, según la variedad (Tamaro, 1968). El tallo es robusto y con una altura que puede sobrepasar el metro y medio (Díaz, 1974).

Las hojas, que se asemejan a las de la mostaza, son de color verde claro. Las de la base y de la parte superior son distintas; las primeras, lobuladas o con forma de lira y provistas de peciolo; las superiores, lanceoladas y con borde dentado (Díaz, 1974).

Las flores se sitúan a la misma altura en los racimos, tienen de 1.5 a 2.0 cm de diámetro, son de color amarillo y tienen un cáliz de cuatro sépalos, cuatro pétalos opuestos dos a dos (característica de la familia) y seis estambres (Tamaro, 1968; Díaz, 1974).

Los frutos, de forma alargada, están formados por una especie de vainas casi cilíndricas, de 5 a 10 cm de longitud, con pico de 1 a 2 cm, un pedicelo de 1 a 3 cm y hasta veinte semillas por lóculo. Las semillas presentan forma globosa, tienen de 2.0 a 2.5 mm de diámetro, son ligeramente angulosas, y reticuladas o recubiertas de alvéolos, de un color que varía del castaño-rojizo al negruzco (Gisport, 1990), siendo su capacidad germinativa media de cuatro años (Maroto, 1995; Marín, 2004).

Características de cultivo

El nabo requiere climas templados, húmedos y también algo fríos (Tamaro, 1968). En climas muy suaves su desarrollo es más rápido por lo que no es apropiado para el aprovechamiento del grelo (Cordeiro y col., 1998). Las temperaturas elevadas provocan una floración precoz a costa del desarrollo y calidad de la raíz (Mainardi, 1985), el mismo efecto pueden producirlo las bajas temperaturas por lo que necesita un emplazamiento abrigado durante el invierno en las zonas muy frías (Noguera, 1996).

En cuanto a los suelos, prefiere los de textura media, con una buena retención de agua, siempre que estén bien drenados (Maroto, 1995), siendo la llanura la situación más conveniente (Tamaro, 1968). El pH aconsejado para el suelo oscila entre 6.0 y 6.9 (Yuste, 1997).

La siembra se realiza a finales de agosto o principios de septiembre, después de caer las primeras lluvias o los primeros rocíos fuertes, para que germinen, “para que pregunten os nabos” (Díaz, 1974; Rodríguez, 1997; Cordeiro y col., 1998).

La técnica más empleada para la siembra es directamente sobre el terreno, en pequeños surcos distanciados unos 20 ó 30 cm y una profundidad de 2 a 3 cm, utilizándose 10 kg de semilla por ha (Parrilla, 1991; Cordeiro y col., 1998). El tiempo que transcurre entre la siembra y la recolección es de 30 a 60 días (Willikuette, 1985; Hessayon, 1988).

No son necesarios cuidados excesivos, tan solo limpiezas eventuales para mantener el suelo libre de malas hierbas (Mainardi, 1985; Hessayon, 1988; Maroto, 1995; Noguera, 1996) y riegos en la primera fase del ciclo, y luego, sólo en casos de necesidad (Mainardi, 1985; Hessayon, 1988).

Con un abonado correcto y una buena preparación del terreno, en dos meses es posible obtener una cosecha completa de grelos superior a los 5000 kg/ha. Para asegurar

este nivel de producción es preciso utilizar insecticidas de poca persistencia, que eliminan el riesgo de plagas y garantizan la calidad de la verdura (Llamazares, 2000).

El nabo florece entre marzo y abril, de acuerdo con las características microclimáticas de las distintas zonas (Díaz, 1974). Su ciclo biológico es de 50 a 60 días para variedades tempranas y de 70 a 100 días para variedades tardías (Yuste, 1997).

Una costumbre frecuente, en especial en la Galicia interior, es alternar el cultivo de los nabos con el de patatas y maíz, con la finalidad de aprovechar el terreno en la época en la que se produce la sequía de las plantas de dichos cultivos. La rotación de cultivos es muy importante para aprovechar al máximo el ciclo reproductivo del grelo y la nabiza (Llamazares, 2000).

Cuando el nabo ha terminado de cumplir su ciclo, sigue produciendo hojas que ya no se aprovechan para consumo humano; éstas se cortan, incluyendo la flor, para alimentación del ganado. Las semillas se reservan para la próxima siembra (Parrilla, 1991).

Recolección

El nabo hortícola se cultiva clásicamente por su raíz, que se consume cocida y que tiene un sabor a veces dulzón, a veces picante. La recolección del nabo es manual y la época depende de la parte de la planta que se quiera recolectar (Ordás, 2001).

Las nabizas se recogen transcurrido mes y medio o dos meses desde la siembra, en otoño. Las hojas exteriores se utilizan para la alimentación animal, mientras que las más tiernas se emplean para la alimentación humana (Cordeiro y col., 1998).

Los grelos se recogen manualmente y sus manojos se atan con mimbres o paja. La cosecha (Figura 3) se realiza durante los meses de enero a marzo, aunque el nabo plantado en agosto produce grelos hasta abril, denominándose grelo tardío o “mouro”. Sin embargo, hoy en día, pueden encontrarse grelos de calidad durante todo el año, ya que el

cultivo del nabo se adelanta en muchas plantaciones para poder atender la demanda del mercado (Parrilla, 1991). Cordeiro y col. (1998) señalan que si se desea tener una buena cosecha de grelos, es mejor no hacer el aprovechamiento previo de las nabizas.



Figura 3. Recolección de grelos

Valor nutritivo

Los grelos y nabizas son hortalizas con un alto contenido de agua por lo que su valor calórico es muy bajo (Tabla 1). Además poseen un interesante aporte de fibra, por lo que suponen una alternativa muy apropiada para formar parte de platos sanos y ligeros, especialmente indicados para personas con problemas de exceso de peso. En cuanto a su contenido en vitaminas, destaca su contenido en vitamina C y folatos (ácido fólico), asimismo estas hortalizas contienen cantidades muy importantes de provitamina A, que en nuestro organismo se transforma en vitamina A. Esta vitamina posee interesantes funciones ya que participa en el mantenimiento de los tejidos, en la resistencia frente a las infecciones y en el correcto funcionamiento del sistema nervioso. Además contribuye al desarrollo normal de los dientes, del tejido blando y esquelético óseo y es necesaria para la visión nocturna (http://www.consumer.es/web/es/alimentacion/aprender_a_comerbien, 06/01/2006).

Con respecto a los minerales, los grelos contienen tres veces más hierro que las espinacas y cuatro más de calcio, así como abundante sodio y cinc. Un aporte adecuado

de vitaminas y minerales es garantía de tener un sistema inmunitario más resistente frente a las infecciones (<http://www.marronglace.net/grelosdegallia.htm>, 06/01/2006).

Tabla 1. Composición de grelos y nabizas (en 100 g de materia fresca)
(Mataix y col., 2003, <http://perso.wanadoo.es/conservaslou/p44.html>, 06/01/2006).

Componente	Cantidad
Agua (g)	92.0
Energía (kcal)	11.18
Proteínas (g)	2.70
Grasa (g)	0.00
Hidratos de carbono (g)	0.10
Fibra (g)	3.90
Colesterol (mg)	0.00
Calcio (mg)	98.0
Hierro (mg)	3.10
Iodo (µg)	0.05
Magnesio (mg)	10.00
Zinc (mg)	0.40
Sodio (mg)	10.00
Potasio (mg)	80.00
Fósforo (mg)	35.00
Piridoxina (B ₆) (mg)	0.16
Vitamina E (mg)	1.00
Tiamina (B ₁) (mg)	0.06
Riboflavina (B ₂) (mg)	0.20
Equiv. de niacina (mg)	1.1
Ácido fólico (µg)	110.00
Ácido ascórbico (mg)	40.00
Vitamina A (µg eq.)	1000
Vitamina D (µg)	0
Vitamina E (mg)	2

Un factor a tener en cuenta en este cultivo es el de la presencia de glucosinolatos (Ordás, 2001). Estos compuestos tienen efectos beneficiosos para la salud ya que los productos resultantes de su hidrólisis actúan como agentes protectores frente al cáncer

(Rosa y col., 1997; Font y col., 2005); sin embargo también presentan ciertos efectos negativos ya que son compuestos causantes del bocio (Font y col., 2005).

Los grelos y las nabizas se caracterizan por su sabor amargo, sin embargo éste puede reducirse si antes de cocinarlos se escaldan en agua hirviendo durante unos min. Admiten las mismas formas de preparación que las espinacas (http://www.consumer.es/web/es/alimentacion/aprender_a_comerbien/06/01/2006).

1.2. EL PROCESADO DE LAS HORTALIZAS

Muchas hortalizas son cultivos estacionales que abundan en determinados períodos del año, y no pueden obtenerse con facilidad en otros. Para poder disponer de las mismas durante todo el año resultan necesarios los métodos de conservación. Para almacenamiento a largo plazo, que es de meses hasta años, las principales técnicas de conservación son el enlatado y la congelación. Esta suele ser preferida al enlatado, porque las alteraciones de los tejidos, tales como reblandecimiento y cambios de color, son menos intensos (Reid, 1992).

La tecnología de las hortalizas congeladas permite una larga conservación de los productos a una temperatura muy baja (-18 °C). La gama de hortalizas congeladas que hoy día existen en el mercado está muy diversificada. Esta tecnología, que ha adquirido un gran desarrollo durante estos últimos veinte años, proporciona productos fácilmente utilizables y seguros en su empleo (Biton, 2002a; Barbosa y col., 2005).

Las principales etapas en la elaboración de hortalizas congeladas son la preparación, el escaldado, la congelación y el almacenamiento. Cada etapa conlleva la elección de diferentes tecnologías dependiendo de la hortaliza de que se trate (Biton, 2002a).

1.2.1. Las operaciones preliminares

La preparación de hortalizas para su tratamiento industrial tiene suma importancia si han de elaborarse productos de calidad. La alteración de las hortalizas se inicia en el

momento de su recolección y solamente puede reducirse al mínimo mediante una manipulación y unas técnicas de tratamiento correctas. Las mismas incluyen recepción, transporte, limpieza, lavado, inspección, recorte, pelado, corte y escaldado. Existen métodos generales para la realización de estas operaciones aunque para algunas hortalizas se precisa maquinaria especial (Rutledge, 1992).

Cuando se diseña y se construye una línea de tratamiento para la preparación de hortalizas, la principal consideración económica es el coste de operación y la cantidad de tiempo que se va a utilizar el equipo. Los costes de fabricación del equipo son casi siempre secundarios a los costes de funcionamiento. Los costes de funcionamiento por unidad de producto vegetal tratado tienen en cuenta el tipo y el uso de energía, la mano de obra empleada, la cantidad y el tipo de agua empleada y el coste de la eliminación del efluente (Rutledge, 1992).

1.2.1.1. Recepción de hortalizas

Las hortalizas son transportadas normalmente hasta la industria en camiones o remolques. En este momento se toman muestras de los productos para determinar si alcanzan o no la calidad requerida. Antes de la admisión del producto debe comprobarse que cumple con las normas requeridas para factores tales como grado de maduración de las hortalizas, tiempo y temperatura durante el transporte, contenido de materiales vegetales y/o animales extraños, cantidades de tierra adherida o alteración de los productos (Rutledge, 1992).

La materia prima debe ser procesada lo antes posible (entre 4 y 48 h después de la cosecha) con el fin de evitar el deterioro (Sánchez, 2004a).

1.2.1.2. Limpieza y lavado

La utilización habitual de máquinas para la recolección de hortalizas conduce a la presencia de una mayor o menor cantidad de impurezas (tierra, sustancias extrañas, hojas, etc.) (Biton, 2002b).

Limpieza

Las hortalizas que son recolectadas de zonas de las plantas que crecen por encima del nivel del suelo suelen contener grandes cantidades de materia vegetal extraña que debe ser eliminada antes del proceso industrial. Un método común para realizar esta limpieza consiste en hacer pasar una corriente de aire a gran velocidad a través del producto de forma que el material más ligero no deseado sea arrastrado por la corriente de aire y eliminado. Este método solamente se aplicará cuando las hortalizas sean más densas que el material extraño (Rutledge, 1992).

Lavado

El lavado es una operación que generalmente constituye el punto de partida de cualquier proceso de producción de hortalizas. La operación consiste en eliminar la suciedad que el material trae consigo antes de que entre a la línea de procesado, evitando así complicaciones derivadas de la contaminación que la materia prima pueda contener. Se recomienda utilizar unos 8 a 10 L de agua por cada kg de producto procesado. El agua utilizada debe ser controlada periódicamente para saber si su uso es apto o no, por eso se revisan las plantas de instalaciones de agua por posibles deterioros de ésta (Sánchez, 2004a).

El lavado se puede realizar por dos métodos:

Por aspersión

Esta operación se efectúa haciendo pasar el producto por chorros de agua a presión. Para algunas hortalizas, el lavado se mejora por medio de la rotación de un cilindro por el que avanza el producto (Biton, 2002b).

Por inmersión

Las hortalizas ricas en hojas crean un problema para su lavado ya que forman capas cuando se almacenan a granel. La operación del lavado debe realizarse sobre todas las superficies incluyendo las situadas en el interior de las capas. Las hojas son lavadas

mediante inmersión en sistemas de agua con agitación. Existe un sistema típico en el que las hojas son lavadas mediante chorros de agua a gran presión y mantenidas bajo la superficie mediante un sistema de paletas. Otros métodos utilizan chorros de aire comprimido en el agua como procedimiento de agitación para separar las hojas y lavar todas las superficies (Rutledge, 1992; Biton, 2002b).

1.2.1.3. Selección

Una vez que la materia prima está limpia, se procede a la selección, es decir, a separar el material que realmente se utilizará en el proceso, del que presenta algún defecto. Éste último se transforma en material de segunda por lo que será destinado a un uso diferente o simplemente eliminado (Sánchez, 2004a).

Esta selección se realiza en una mesa adecuada a tal propósito o en una cinta transportadora en el caso de contar con una instalación de pequeña escala semimecanizada. Se trata, entonces, de separar toda hortaliza que no presente uniformidad con el lote, en cuanto a madurez, color, forma, tamaño, o presencia de daño mecánico o microbiológico (Sánchez, 2004a).

1.2.1.4. Recorte

Algunas hortalizas requieren un recorte antes de ser sometidas a procesos industriales. Estas operaciones de recorte son similares a las realizadas cuando las mismas hortalizas son preparadas en los hogares. Por ejemplo, el tallo fibroso es eliminado de los espárragos, de las judías verdes se cortan los extremos, así como los tallos de la coliflor y los brotes del brócoli, y de las zanahorias son cortadas las coronas (Rutledge, 1992).

1.2.2. El escaldado

Los productos hortícolas son partes vivas de las plantas que siguen respirando tras la recolección. Cuando las hortalizas son recolectadas experimentan cambios como consecuencia de alteraciones, iniciadas con frecuencia por los enzimas de la planta, que

comienzan a descomponer los tejidos vegetales. El tiempo transcurrido entre la recolección y la inactivación de estos enzimas puede ser crítico para la calidad del producto final. Este lapso de tiempo es más importante con hortalizas ricas en hojas con un crecimiento activo tales como espinacas. Para prevenir la alteración enzimática y microbiana los productos hortícolas reciben un tratamiento térmico que inactiva los enzimas y mata el tejido vegetal. Este proceso se denomina escaldado (Reid, 1992; Rutledge, 1992; Tucker, 2004; Barbosa y col., 2005).

El escaldado es, por tanto, un tratamiento térmico de corta duración a alta temperatura (95 a 100 °C) seguido de un rápido enfriamiento. El escaldado, además de inactivar los enzimas y eliminar los gases contenidos en los tejidos, también evita la decoloración y el reblandecimiento de las hortalizas durante el almacenamiento posterior; asimismo ejerce también un efecto adicional de limpieza y reduce la carga microbiana de las células vegetativas del producto (Rutledge, 1992).

Inactivación de las enzimas

Biton (2002a) señala que a -18 °C las actividades enzimáticas están muy ralentizadas pero no son nulas. Por ejemplo, las judías verdes congeladas no escaldadas adquieren un aroma a heno muy intenso al cabo de algunas semanas de almacenamiento (Williams y col., 1986). Estos cambios intensos del aroma, son una consecuencia de la rotura de las estructuras celulares internas, que origina una reacción incontrolada catalizada por enzimas. Algunos de los productos derivados de estas reacciones determinan los malos olores y sabores (Reid, 1992). Por consiguiente, debe efectuarse un tratamiento previo del tejido para conseguir un alimento más estable, y la inactivación de las enzimas es la clave para lograr esa estabilidad (Rutledge, 1992; Barret y col., 2000).

Varias enzimas han sido propuestas como indicadoras para determinar la efectividad de un proceso de escaldado. Entre ellas, la peroxidasa ha sido la más utilizada (Hemedia y Klein, 1991) debido a que es considerada como una de las más resistentes al calor en vegetales. Es por ello, que generalmente se piensa que si la peroxidasa es inactivada

durante un tratamiento térmico, entonces será muy difícil que existan otras enzimas que puedan quedar activas (Halpin y Lee, 1987).

Williams y col. (1986) investigaron los enzimas indicadores del escaldado en la elaboración de hortalizas congeladas. Señalaron que la inactivación de la catalasa precisa solamente el 50-70 % del tratamiento térmico necesario para la inactivación de la peroxidasa. También indicaron que la alteración de las hortalizas congeladas no sometidas a escaldado no era consecuencia de la peroxidasa, sino principalmente de la lipoxigenasa (Tabla 2). Esta enzima es menos estable que la peroxidasa, por lo que un escaldado más corto o con menor temperatura podría ser suficiente para su inactivación. Llegaron a la conclusión de que el tratamiento térmico podía ser reducido hasta el punto en que era inactivada la lipoxigenasa, particularmente en el caso de guisantes y judías verdes. En consecuencia, sería necesario disponer de una prueba fiable de la actividad residual de lipoxigenasa para aplicarla en el control de calidad de los alimentos escaldados.

Dicha prueba ha sido puesta a punto y se ha demostrado que, realmente, para conseguir un producto estable se precisa un escaldado más corto que el necesario para inactivar la peroxidasa (Reid, 1992).

Trabajos más recientes han corroborado que es más interesante controlar la actividad enzimática de la lipoxigenasa, generadora de sabores anormales durante el almacenamiento, y conservar una actividad residual de las peroxidases, que son poco molestas. De esta manera se puede obtener una optimización del escaldado. Por ejemplo, en judías verdes almacenadas a -18 °C, un corto escaldado que destruye la lipoxigenasa (12 s a 100 °C) tiene el mismo efecto en la evolución del sabor que un escaldado largo (63 s a 100 °C) que bloquea toda actividad enzimática (Barret y Theerakulkait, 1995).

Es importante mencionar que en algunas ocasiones la catalasa ha sido empleada como enzima indicador. La comprobación de este enzima resulta sencilla, aunque su estabilidad es menor, por lo que se precisa un tratamiento térmico menos intenso para su

inactivación. Un aspecto negativo del empleo de la catalasa como marcador es que no aparece en cantidades importantes en muchas hortalizas (Reid, 1992).

Tabla 2. Enzimas responsables del deterioro de la calidad de las hortalizas no escaldadas (Williams y col., 1986).

Defectos	Enzimas
Aroma anormal	Lipoxigenasa Lipasa Proteasa
Cambio de color	Polifenol oxidasa Oxidasa Peroxidasa
Destrucción de nutrientes	Ácido ascórbico oxidasa Tiaminasa

Desgasificación de las hortalizas

Como la mayoría de los vegetales, las hortalizas contienen una importante cantidad de gas encerrado en los tejidos. Si no se elimina el oxígeno que está presente entre estos gases, las oxidaciones más o menos importantes ocasionan principalmente coloraciones anormales (Biton, 2002a).

Modificación de la estructura

El escaldado permite suavizar las hortalizas y reducir el volumen aparente de las hortalizas de hoja (espinacas, acelgas). Facilita las operaciones y las manipulaciones posteriores (llenado-ensado, etc.) (Biton, 2002b).

1.2.2.1. Problemas ligados al escaldado

Pérdidas por disolución

El escaldado ocasiona la disolución de elementos solubles (azúcares, nitratos, vitaminas, etc.). Estas pérdidas dependen mucho del fluido utilizado (agua o vapor), de la temperatura, del tiempo de escaldado y de la carga orgánica del fluido (Biton, 2002b).

Además de las pérdidas por disolución, el escaldado en agua puede aportar a la hortaliza cantidades nada despreciables de agua libre, que cristaliza durante la congelación dañando los tejidos. Esta alteración entraña un importante riesgo de que aumente la flora microbiana al utilizar posteriormente las hortalizas congeladas (Biton, 2002a).

Pérdidas debidas a la termolabilidad de ciertos compuestos

Algunos compuestos, principalmente vitaminas, se destruyen por el calor. La pérdida en ácido ascórbico (vitamina C) es la más importante ya que ésta molécula es muy sensible al calor en presencia de oxígeno (Biton, 2002b). Incluso, algunos investigadores la han usado como indicador cuando determinan los efectos del escaldado sobre las hortalizas (Rutledge, 1992).

La Tabla 3 muestra el contenido en ácido ascórbico de dos hortalizas dependiendo de la forma de escaldado.

Tabla 3. Contenido en ácido ascórbico expresado en mg/kg en función de la forma de escaldado (Descamps, 1987).

Hortalizas	Guisantes	Espinacas
Testigos de hortalizas crudas	23.3	36.0
Escaldado con agua a 90 °C	16.0	9.9
Escaldado con agua a 100 °C	19.6	10.6
Escaldado con vapor a 100 °C	15.6	18.9
Escaldado con vapor a 120 °C	20.2	22.7

Las vitaminas del grupo B son relativamente estables, con la excepción de la tiamina y de los folatos, cuya sensibilidad térmica es comparable a la de la vitamina C, lo que explica que a veces se utilicen los tres como indicadores de la intensidad de un tratamiento térmico (Adragna-Bourgeois y Bourgeois, 2002).

Las clorofilas son también sensibles al calor y más, en particular, la clorofila a, cuya degradación en feofitina ocasiona un pardeamiento más o menos pronunciado de las hortalizas verdes (Biton, 2002b).

El escaldado con vapor permite una mejor retención de nutrientes, limita el fenómeno de cristalización y proporciona una mejor calidad higiénica del producto (Biton, 2002a).

La dureza del agua

Los iones calcio y magnesio presentes en el agua tienen la propiedad de reaccionar con los compuestos pécticos que constituyen las paredes celulares de los vegetales. En la práctica producen un reforzamiento de las estructuras de las hortalizas y un endurecimiento del producto. Asimismo, las hortalizas escaldadas con agua dura son más compactas y las leguminosas pierden menos almidón en el líquido de gobierno (dando así líquidos de gobierno menos turbios). Un agua muy dura puede producir una excesiva consistencia del producto (Biton, 2002b).

1.2.2.2. Las técnicas de escaldado

El escaldado puede realizarse con agua o a vapor (Biton, 2002b).

El escaldado con agua

Constituye la forma tradicional de escaldar que supone el mantenimiento del producto en agua caliente (85-100 °C) hasta que son inactivados los enzimas, y posterior enfriamiento con agua (Rutledge, 1992).

El escaldado con vapor

La principal ventaja del escaldado con vapor consiste en que provoca un menor arrastre de solutos de las hortalizas. Esto mejora la retención de nutrientes solubles y reduce el efluente derivado de la operación de escaldado. Entre las hortalizas que son escaldadas normalmente con vapor se incluye el maíz dulce cortado y el brócoli. Estos productos presentan superficies de corte de las que el agua utilizada para el escaldado arrastra nutrientes con facilidad (Rutledge, 1992).

Después del escaldado, los productos deben enfriarse obligatoriamente, por lo que algunos fabricantes han desarrollado escaldadoras-enfriadoras integradas cuyo interés principal reside en que se recupera la energía en el momento del enfriamiento y se elimina el exceso de agua que es negativo durante la posterior congelación (Biton, 2002a).

Es importante optimizar el escaldado así como el enfriamiento consecutivo, de modo que se realice la inactivación de las enzimas con una pérdida mínima de vitaminas; esto se puede obtener por un calentamiento rápido manteniendo la temperatura durante un breve tiempo. Los procedimientos HTST (alta temperatura-tiempos cortos) no son, sin embargo, aplicables a esta operación ya que protegen al mismo tiempo las enzimas que las vitaminas (Adragna-Bourgeois y Bourgeois, 2002).

1.2.3. La cocción

La cocción se define como la operación que transforma física y químicamente el aspecto, la textura, la composición y el valor nutricional de los alimentos, por acción del calor, con objeto de mejorar sus características organolépticas (Legland y Wolf, 1985)

Hay tres formas de transferencia de calor:

- **Conducción:** la energía se transfiere por contacto directo con la fuente de calor. La energía térmica, por colisión de los electrones de movilidad limitada, del metal de la sartén pasa a las partículas del alimento.
- **Convección:** la energía se transfiere por medio de fluidos. Las moléculas calientes y, por lo tanto, con movimiento más rápido, al chocar con otras más frías y más lentas les transfieren energía térmica. Un ejemplo claro es la ebullición.

- **Radiación:** en los tratamientos culinarios se realiza por radiación térmica; una fuente de calor emite partículas que han absorbido energía que pasan al objeto (Candela y Astiasarán, 2000).

La forma más habitual de preparar las hortalizas es por ebullición. Para hervirlas es frecuente trocearlas, ya que, de lo contrario, las porciones más externas estarían sobrecocidas mientras que las internas quedarían poco hechas. Los problemas referentes al color y la textura aumentan con el tiempo de cocción. Por tanto, las hortalizas deben cocerse en el tiempo más breve posible, en un recipiente grande lleno de agua hirviendo ya que la abundancia de agua diluirá la acidez o alcalinidad. Si se deja el recipiente destapado pueden escaparse olores desagradables, pero también se puede concentrar cualquier producto químico indeseable que haya podido llegar a las hortalizas. Por esta razón, debe eliminarse el líquido de cocción (Candela y Astiasarán, 2000).

Tradicionalmente, la cocción de los alimentos se ha relacionado con efectos negativos sobre su composición. El cocinado de los alimentos puede suponer la pérdida de algunos nutrientes, pero posee también efectos beneficiosos. Las hortalizas contienen compuestos que son parte de la química normal de los vegetales aunque son potencialmente tóxicos para el hombre. Como ejemplos se encuentran los latirógenos (aminonitrilos y ácidos diaminobutírico o propiónico que origina parálisis espástica como resultado del consumo prolongado de garbanzos), los glucosinolatos (compuestos sulfurados que aparecen en brasicas, coles, nabos, etc.) capaces de provocar bocio, los compuestos fenólicos, los glucósidos cianogénicos y los oxalatos. Estos compuestos son destruidos o lixiviados mediante el tratamiento térmico (Conning, 1992).

Asimismo, el cocinado aporta una garantía sanitaria a los alimentos, ya que inhibe o destruye ciertos microorganismos indeseables (mohos, levaduras, bacterias alterantes, bacterias patógenas) en función de la temperatura alcanzada y la duración del cocinado. Además elimina productos químicos utilizados en agricultura o en la industria (Candela y Astiasarán, 2000).

La transferencia de calor que implica el cocinado de los alimentos se traduce en cambios físicos y químicos.

Modificaciones físicas

Las variables que se pueden modificar son: color, olor, sabor, volumen y peso, y consistencia. Estas variables son las que hacen que se modifiquen las propiedades sensoriales.

Color

El cambio de color en los vegetales depende de la naturaleza de sus pigmentos, del grado de acidez del medio de cocinado (pH), así como de la acción de ciertas enzimas presentes en sus tejidos (por ejemplo, las oxidasas). La clorofila (pigmento verde) se vuelve parda cuando las verduras se cocinan tapadas durante mucho tiempo. Los flavonoides (pigmentos amarillos) se vuelven de color más claro en medio ácido y más oscuros en medio básico. Los taninos son responsables del pardeamiento u oscurecimiento de ciertas frutas y legumbres cortadas (Candela y Astiasarán, 2000).

Olor, aroma y flavor

El cocinado puede liberar ciertas sustancias aromáticas volátiles, sobre todo relacionadas con el aroma. Otros compuestos volátiles que están formando parte de las estructuras celulares, difunden al interior de los tejidos y líquidos celulares, y pueden disolverse en el medio de cocción.

De acuerdo con Mcleod y Seyyedain-Ardebili (1981) y Morton y Mcleod (1982), el método de cocinado contribuye significativamente a la formación de compuestos volátiles.

Sabor

Según la técnica utilizada, la cocción refuerza o atenúa el sabor/aroma de los alimentos. Ciertos compuestos sápidos y solubles en el agua (aminoácidos procedentes de

la hidrólisis de las proteínas, azúcares, sales minerales) migran por la acción del calor, bien hacia el interior del alimento (fenómeno de concentración), o bien hacia el exterior (fenómeno de expansión) (Candela y Astiasarán, 2000).

Volumen y peso

El cocinado puede modificar el volumen y peso de los alimentos. Se pueden observar varios fenómenos:

- ❖ Pérdida de agua por deshidratación superficial de los alimentos cocinados por concentración. Esta pérdida es proporcional al tiempo de exposición al calor, a la superficie que presente el alimento y a la intensidad del tratamiento térmico.
- ❖ Pérdida de materia grasa por fusión. Estas pérdidas son igualmente proporcionales a la temperatura, así como al tiempo de exposición y, evidentemente, al contenido lipídico del alimento.

Consistencia

Los alimentos correctamente cocinados son, por lo general, más tiernos, más jugosos y más digeribles. Las modificaciones producidas por el calor son la coagulación de las proteínas y el reblandecimiento de la celulosa.

Modificaciones químicas

Son aquellos cambios originados en los componentes químicos de los alimentos, es decir, sobre los nutrientes.

Vitaminas

Durante la ebullición se pierden con el agua muchas vitaminas hidrosolubles del grupo B y la vitamina C (Tabla 4). Cuanto menos tiempo se expongan estas sustancias al calor y a la extracción acuosa menos pérdida habrá. Las pérdidas son menores por cocción al vapor o en olla a presión. La vitamina C se oxida fácilmente a temperaturas

altas. Las vitaminas A y D son liposolubles y resisten mucho más al calor y a otros tratamientos (Candela y Astiasarán, 2000).

Tabla 4. Comparación del contenido en vitamina C de algunas hortalizas antes y después de hervirlas (mg/100 g) (Candela y Astiasarán, 2000).

Hortaliza	Cruda	Hervida	Ebullición corta	Ebullición a gran presión
Espinacas	25.4	15.2	19.1	19.2
Guisantes frescos	33.7	16.6	25.2	22.9
Judías verdes	24.9	16.4	19.9	19.4
Patatas	15.5	12.5	14.1	14.8
Coles de Bruselas	130.5	56.4	85.7	90.4
Col de hoja rizada	92.3	15.7	48.3	40.5

En la Tabla 5 se muestra la estabilidad de las vitaminas frente a diversos factores, así como su pérdida máxima por cocción.

Tabla 5. Estabilidad de las vitaminas (Harris y Karmas, 1975).

Vitamina	pH < 7	pH > 7	Aire	Luz	Calor	Pérdidas máximas por cocción ^a
A	<i>I</i>	<i>E</i>	<i>I</i>	<i>I</i>	<i>I</i>	40
D	-	<i>I</i>	<i>I</i>	<i>I</i>	<i>I</i>	40
E	<i>E</i>	<i>E</i>	<i>I</i>	<i>I</i>	<i>I</i>	55
K	<i>I</i>	<i>I</i>	<i>E</i>	<i>I</i>	<i>E</i>	5
C	<i>E</i>	<i>I</i>	<i>I</i>	<i>I</i>	<i>I</i>	100
B₁	<i>E</i>	<i>I</i>	<i>I</i>	<i>E</i>	<i>I</i>	80
B₂	<i>E</i>	<i>I</i>	<i>E</i>	<i>I</i>	<i>I</i>	75
B₆	<i>E</i>	<i>E</i>	<i>E</i>	<i>I</i>	<i>I</i>	40
niacina	<i>E</i>	<i>E</i>	<i>E</i>	<i>E</i>	<i>E</i>	75
B₁₂	<i>E</i>	<i>E</i>	<i>I</i>	<i>I</i>	<i>E</i>	10
folatos	<i>I</i>	<i>E</i>	<i>I</i>	<i>I</i>	<i>I</i>	100

^a%; *I*: inestable; *E*: estable.

Fibra

Zyren y col. (1983) no encontraron grandes pérdidas de fibra en vegetales y frutas durante la cocción. Por el contrario, Herranz y col. (1983) sí observaron variaciones en el contenido de las diferentes fracciones de fibra dietética en vegetales, las cuales fueron diferentes según la tecnología aplicada.

Minerales

Miyoshi y col. (1995) estudiaron los cambios en el contenido de minerales durante la cocción de vegetales. Estos autores observaron correlaciones significativas entre los cambios en el peso de los vegetales tras el hervido y escurrido y los contenidos residuales de elementos minerales para cada vegetal y elemento.

Proteínas

La cocción, en muchos casos, mejora la digestibilidad de las proteínas. La aplicación de calor suave puede provocar la desnaturalización de las proteínas, lo que tiende a aumentar su valor nutricional porque su susceptibilidad al ataque enzimático se ve aumentada. Si se considera también que se ha producido una pérdida de la funcionalidad de la proteína nativa, este tratamiento puede ser muy positivo por el hecho de destruir factores antinutritivos de naturaleza proteica como, por ejemplo, las antitripsinas de las leguminosas (Candela y Astiasarán, 2000). Vidal y col. (1994) estudiaron el efecto del procesamiento sobre algunas sustancias antinutritivas de las legumbres (actividad inhibidora de la tripsina, contenido en ácido fítico, taninos y catequinas) y concluyeron que el cocinado producía una eliminación de la actividad inhibidora de la tripsina, una reducción de la cantidad de ácido fítico y un aumento en contenido de taninos y catequinas.

1.2.4. Enfriado y escurrido

Concluido el escaldado o cocido, la materia prima exhibe una alta temperatura. La zona térmica entre 50 °C y 10 °C constituye una fase crítica para la calidad del producto (gran fragilidad ante recontaminaciones con microorganismos, acusadas modificaciones

de color, grandes pérdidas de nutrientes, pero especialmente mermas en el contenido vitamínico y empeoramiento del aroma). Por estas razones, se impone el principio de refrigerar, con máxima rapidez, a temperaturas inferiores a 10 °C las materias primas escaldadas o cocidas, inmediatamente después de recibir éstas el tratamiento térmico (Gruda y Postolski, 1986; Lyon y Churchill, 1992). Esto se efectúa habitualmente por inmersión en una corriente de agua y, más raramente, por aire forzado o por aspersión de agua refrigerada (Instituto Internacional del Frío, 1990).

Para realizar el enfriamiento con agua, se utilizan equipos económicos y fáciles de instalar; además se asegura el transporte del producto del escaldador a la etapa siguiente. Sin embargo, requiere grandes volúmenes de agua y elimina una cantidad importante de compuestos solubles del producto (Instituto Internacional del Frío, 1990). Los sistemas de enfriamiento por aire o por pulverización de agua, reducen las pérdidas por lavado de sustancias solubles y la polución de las aguas, pero causan una elevada pérdida de peso del producto que los hace no competitivos en comparación con los sistemas normales de enfriamiento convencional mediante corriente de agua (Canet y Álvarez, 2000).

Durante las etapas de escaldado, cocción y enfriamiento se produce una importante incorporación de agua al producto, que debe ser eliminada con el escurrido, que se lleva a acabo mediante:

- ❖ **Centrifugación.** La separación del agua se lleva a cabo por la acción de fuerzas centrífugas que se generan durante la rotación de material. Para desarrollar esta operación se utiliza una centrífuga que consiste, en esencia, en una cámara o recipiente cilíndrico que gira alrededor de su eje. Existen distintos tipos, la elección de una u otra depende, en gran medida, de la aplicación a la que se destina (Ordóñez y col., 1998); si lo que se pretende es eliminar exceso de agua las más utilizadas son las centrífugas deslodadoras (Aleixandre, 1997).

- ❖ **Prensado.** Consiste en la separación de líquidos que están contenidos en productos sólidos mediante fuerzas de compresión (Ordóñez y col., 1998). Esta operación se realiza mediante prensas.

1.2.5. El envasado a vacío

Es la forma de envasado en atmósfera protectora desarrollada comercialmente en primer lugar. El proceso implica el envasado del producto en plásticos de baja permeabilidad al oxígeno, y el sellado después de realizar la evacuación del aire. Con unas buenas condiciones de realización del vacío, la concentración de oxígeno se reduce por debajo del 1 %. Un inconveniente adicional en los envases al vacío durante el largo almacenamiento, es la acumulación de exudado (Sánchez, 2004b).

Como en todos los productos alimentarios, el envase debe proteger su contenido de las agresiones exteriores (resistencia a los choques, protección frente a las contaminaciones exteriores) pero debe limitar los intercambios durante el almacenamiento y, más concretamente, en los expositores de venta (Bettison, 1992; Biton, 2002a).

El envase influirá también sobre la estabilidad del producto almacenado. Los envases permeables a la humedad provocarán la deshidratación de los productos. El acceso de oxígeno deberá ser mínimo para que el envase suponga un medio de control de la degradación oxidativa. Los espacios vacíos serán mínimos en el interior del envase, ya que suponen unas condiciones ideales para el movimiento interno de la humedad (Reid, 1992).

Tipos de películas utilizadas

Entre las películas más utilizadas para el almacenamiento en atmósfera protectora se incluyen: polietileno (PE), poliamida (PA), polipropileno (PP), poliestireno (PS), policloruro de vinilo (PVC), policloruro de vinilideno (PVCD), copolímero etilenoacetato de vinilo (EVA), entre otras (Kirwan y Strawbridge, 2004).

También existen combinaciones entre estas películas con el fin de aprovechar cada una de sus propiedades individuales. Un ejemplo de ello son las películas laminadas, las cuales están conformadas por láminas de diferentes materiales unidas mediante un adhesivo, en forma de sándwich. Las películas laminadas ofrecen una mejor calidad de grabado ya que la superficie impresa es incorporada entre las numerosas láminas que las constituyen y esto evita el desgaste durante la manipulación (Sánchez, 2004b).

La exposición a la luz puede acelerar la destrucción de la clorofila en las hortalizas y el empleo de películas con pigmentos blancos u otros medios para crear opacidad mejora la vida útil de tales productos vegetales (Bettison, 1992).

1.2.6. La congelación

Dentro de las distintas técnicas empleadas en la conservación de alimentos, una de las más utilizadas es la congelación, la cual consiste en reducir la temperatura de los productos hasta valores iguales o inferiores a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$, lo más rápidamente posible, y almacenarlos, a continuación, por debajo de esa temperatura. La conservación se asegura bloqueando, de este modo, la actividad microbiana y ralentizando mucho las actividades enzimáticas (Biton, 2002a; Sánchez, 2004c).

En los productos con elevado contenido en agua es muy importante la velocidad de congelación. Así, si la congelación es lenta los primeros cristales formados serán gruesos. Estos cristales provocan una importante compresión de las células, lo que produce una salida de agua al exterior. En una congelación rápida, tanto en el interior como en el exterior, se forman cristales muy pequeños que dañan mucho menos los productos. En la congelación de las hortalizas, la velocidad de congelación deberá ser lo más elevada posible (Biton, 2002a).

Existen distintos equipos de congelación, que se clasifican habitualmente atendiendo al medio utilizado para la transmisión de calor, distinguiéndose los siguientes grupos: congeladores de contacto directo, congeladores de aire forzado, congeladores por

inmersión y congeladores criogénicos (Instituto Internacional del Frío, 1990; Fellows, 1994; <http://www.ainia.es/esp/Servicios/ippc/pdf/mtd/Elaboradosveg.PDF>, 13/04/2005).

Para obtener el efecto conservador deseado, es indispensable determinar con exactitud los tratamientos anteriores a la congelación, la velocidad óptima de congelación, el tipo de embalaje, la temperatura de almacenamiento y la velocidad de descongelación (Sánchez, 2004c).

La congelación es la forma más simple y natural de conservar los vegetales (Cano, 1996), y se aplica mucho a hortalizas de hoja como las espinacas, las acelgas, las judías verdes, las coles de Bruselas, y a otras como las zanahorias, los guisantes y las coliflores (Cid, 2000).

1.2.7. El almacenamiento

Generalmente la vida útil de un producto congelado es mayor cuanto más baja es su temperatura de almacenamiento, la cual normalmente es igual o inferior a -18 °C (Instituto Internacional del Frío, 1990). Sin embargo, los productos congelados no permanecen estables durante este período de almacenamiento, que generalmente se prolonga durante meses, pudiendo producirse un deterioro de su calidad (Canet y Álvarez, 2000).

Estas pérdidas de calidad pueden llegar a ser superiores a las que se producen como consecuencia de la propia congelación, las operaciones previas o la descongelación. Dada la imposibilidad de proliferación microbiana a estas temperaturas las alteraciones que tienen lugar en los productos congelados son debidas a cambios físicos y químicos (Canet y Álvarez 2000).

Cambios físicos

Los cambios físicos que afectan a la calidad de los vegetales congelados durante su almacenamiento son la sublimación y la recrystalización de los cristales de hielo y están

relacionados con la estabilidad de los mismos en el interior y en la superficie del producto. Estos fenómenos están asociados a fluctuaciones de temperatura que se producen durante el almacenamiento y se traducen en pérdidas de peso del producto congelado (Reid, 1992, Canet y Álvarez 2000).

Cambios químicos

Las pérdidas de calidad de los alimentos congelados debidas a cambios químicos y en algunos casos, a la actividad enzimática, son lentas, pero se aceleran por efecto del aumento de la concentración de solutos alrededor de los cristales de hielo, por la reducción de la actividad de agua y por cambios en el pH y el potencial de óxido-reducción (Fellows, 1994).

Los principales cambios que tienen lugar son:

Cambios sobre el valor nutritivo

Las hortalizas están constituidas por células microscópicas muy unidas entre sí, con pequeños espacios intercelulares. La congelación destruye la integridad celular. En la descongelación las membranas de las células muertas se vuelven muy permeables. En esta última etapa el exudado comienza a difundir (sales, azúcares, pigmentos, etc.), reduciendo así su valor alimenticio (Sánchez, 2004c).

Sin embargo, Canet (1996) señala que los azúcares, las proteínas, los elementos minerales y las vitaminas liposolubles permanecen estables en las hortalizas congeladas a lo largo de la conservación, independientemente de la temperatura a la que se efectúe la misma; no obstante, eso no ocurre con ciertas vitaminas hidrosolubles susceptibles de oxidarse y degradarse rápidamente cuando la temperatura de conservación no es suficientemente baja. Así, por ejemplo, la vitamina C puede desaparecer por completo si el producto se almacena durante largos períodos de tiempo a temperaturas por encima de $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ o si la descongelación se efectúa a temperaturas inadecuadas.

Cambios en el pH

Durante la congelación, las sales inorgánicas y orgánicas se concentran en la fase acuosa. Al disminuir las temperaturas, las sales precipitan y como consecuencia cambia el pH de la fase acuosa no congelable (Canet y Álvarez, 2000).

Cambio de color

Durante el almacenamiento en estado congelado no se producen pérdidas importantes de pigmentos. Sin embargo, si se pueden formar pigmentos pardos, debido a reacciones de oxidación enzimática de precursores fenólicos incoloros. Por tanto, es necesario realizar la inactivación de las enzimas antes de comenzar el proceso de congelación (Cid, 2000; Sánchez, 2004c).

Modificación del aroma

Las alteraciones del aroma son consecuencia tanto de la modificación del aroma fresco característico del producto como del desarrollo simultáneo de aromas anormales. En ocasiones, el desarrollo de estos aromas se produce de forma simultánea a la pérdida del color. Ambos fenómenos pueden evitarse inactivando enzimas oxidativas como la peroxidasa y la lipoxigenasa (Cid, 2000; Sánchez, 2004c). Asimismo, el uso de envases que excluyan el oxígeno puede combatir este problema (Barbosa y col., 2005).

Modificación de la textura

Los cambios más notables en las verduras adecuadamente congeladas, almacenadas y descongeladas, son los que afectan a su textura. Estos cambios se deben principalmente al daño físico provocado por la formación de hielo, que conduce a la pérdida de turgencia de la célula, al desplazamiento del agua endógena y a la separación de las células (Rutledge, 1992; Cid, 2000).

1.3. VITAMINAS

Las vitaminas, a pesar de su composición química diversa, pueden definirse como compuestos orgánicos que deben ser obtenidos de fuentes exógenas y que son esenciales para las funciones fisiológicas y metabólicas normales del organismo (Russell, 2000). Se clasifican en vitaminas liposolubles: A, D, E y K, y vitaminas hidrosolubles: B₁, B₂, B₆, B₁₂, C, niacina, biotina, ácido fólico y ácido pantoténico (http://www.nutrinfo.com.ar/pagina/info/vita_min.html, 02/02/2006). Las vitaminas no son fuente de energía, sin embargo varias de ellas juegan un papel importante dentro del metabolismo para producirla (<http://www.aerobicos.com.mx/alimenta147.htm>, 02/02/2006).

Las vitaminas hidrosolubles, o solubles en agua, conforman un grupo diverso de compuestos con propiedades físico-químicas diferentes. Una sola vitamina presenta varias formas coenzimáticas, cada una de las cuales muestra la misma actividad biológica *in vivo* (Russell, 2000).

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es, sin duda, la técnica más popular para la cuantificación de vitaminas hidrosolubles, ya que al ser compuestos de naturaleza hidrofílica, no volátiles, son candidatos especialmente adecuados para los análisis de HPLC en fase reversa. La principal ventaja al usar este tipo de análisis, es la capacidad que tiene para separar las vitaminas de los compuestos que interfieren en sistemas biológicos tan complejos como son los alimentos. Este tipo de análisis presenta como ventajas la rapidez, la precisión y la especificidad, exactitud razonable, y la posibilidad de cuantificar simultáneamente múltiples vitaminas y/o metabolitos (Russell, 2000).

1.3.1. Tiamina (vitamina B₁)

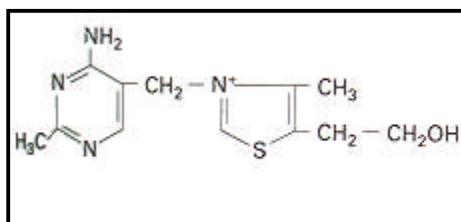


Figura 4. Estructura de vitamina B₁

La tiamina o vitamina B₁ (Figura 4) está constituida por un anillo pirimidínico y un anillo tiazólico, unidos por un metileno, y con diversos grupos funcionales substituyentes (Mataix y Sánchez, 2002).

El clorhidrato de tiamina puro es un polvo blanco amarillento cristalino con sabor salado y aroma a nuez (Mahan y Arlin, 1995). Se presenta como cristales solubles en agua, parcialmente solubles en alcoholes y acetona, e insoluble en solventes lipídicos, como el éter, benceno, hexano y cloroformo. Es una molécula termolábil y sensible a la oxidación y a los sulfitos, que destruyen su actividad biológica (Mataix y Sánchez, 2002).

Métodos de análisis

La tiamina es determinada normalmente como sus tiocromo derivados. La hidrólisis ácida, por ebullición o esterilización por autoclave en ácido clorhídrico (0.1-0.3 M) ó ácido sulfúrico (0.05-0.1 M) de 10 a 60 min, es empleada para liberar la vitamina de la matriz del alimento. Para la determinación de tiamina total, los ésteres de fosfato son convertidos a tiamina usando hidrólisis enzimática con una enzima que contenga fosfatasa, tal como la claradiastasa o la takadiastasa, sola o en combinación con una fosfatasa. Generalmente, el extracto obtenido debe ser incubado entre 1 y 18 h de 37 a 50 °C. La hidrólisis enzimática se usa también para eliminar el exceso de almidón, con β -amilasa o amilogucosidasa, y proteína, con papaína, en la matriz del alimento (Russell, 2000).

La tiamina muestra un rango de absorbancia entre 230 y 270 nm, dependiente del pH, sin embargo su detección puede causar interferencia con otros compuestos del alimento que absorben a esas longitudes de onda, tales como los ácidos nucleicos. Por lo anterior, la tiamina es oxidada con ferrocianuro de potasio, bajo condiciones alcalinas, para ser convertida a sus tiocromo derivados y éstos analizados fluorométricamente a longitudes de onda de excitación entre 365 y 375 nm y longitudes de onda de emisión entre 425 y 435 nm, a pH alrededor de 8.0. Los tiocromo derivados son relativamente estables en solución alcalina a pH mayor de 9.0 y temperatura ambiente (Russell, 2000). Cabe señalar que el uso de la fluorescencia reduce el rango de los factores que interfieren, incrementando de esta forma, la reproducibilidad y sensibilidad del método (Valls y col., 1999a).

Fuentes

En los alimentos, la tiamina endógena se encuentra en forma de cuatro especies químicas: la forma no fosforilada, tiamina, y sus ésteres fosforilados, tiamina monofosfato (TMP), tiamina pirofosfato (TPP) y tiamina trifosfato (TTP). La tiamina predomina en plantas, aunque sus ésteres, especialmente TPP, son las formas principales en los productos de origen animal (Russell, 2000).

Entre las fuentes dietéticas de tiamina (Figura 5) se encuentran los cereales no refinados, levadura de cerveza, órganos animales (hígado, corazón, riñón), porciones magras del cerdo, legumbres y semillas (National Research Council, 1991). La leche y los productos lácteos, la fruta y otros vegetales no son ricos en tiamina, pero cuando se consumen en cantidades suficientes contribuyen de manera importante a la ingesta total (Mahan y Arlin, 1995). Sin embargo, en algunos vegetales (coles, hojas de té, etc.) se encuentran compuestos polihidroxifenólicos, que inactivan la tiamina por oxidación, y algunos pescados contienen tiaminasas que son enzimas que destruyen a la vitamina (Mataix y Sánchez, 2002). Esta vitamina está ausente de grasas, aceites y azúcares refinados (Russell, 2000). En la Tabla 6 se representa el aporte de vitamina B₁ de las raciones de distintos tipos de alimentos que la contienen en cantidad significativa.



Figura 5. Fuentes de vitamina B₁

Tabla 6. Contenido en vitamina B₁ de distintos alimentos
(Mataix y Sánchez, 2002)

Alimento	Cantidad ^a
Hígado	0.40
Lomo, solomillo de cerdo	0.83
Merluza	0.10
Huevo de gallina	0.10
Yogurt natural	0.04
Lentejas	0.47
Judías blancas, pintas, etc.	0.50
Almendras	0.45
Pan integral	0.30
Arroz integral	0.30
Espinacas	0.11
Naranjas	0.08

^amg/100 g.

Pérdidas debidas a la tecnología industrial y doméstica

La tiamina es una de las vitaminas más lábiles. Sólo en condiciones ácidas, es decir, a pH inferiores a 5, resiste el calentamiento. Las mayores pérdidas de tiamina, tanto en el cocinado doméstico, como en el procesado industrial, tienen lugar más por lixiviación que por transformaciones químicas. Es imposible generalizar sobre la amplitud de estas pérdidas, que dependen de cuánto se triture y de los tiempos de remojo y cocinado que

pueden minimizarse utilizando, en la medida de lo posible, el exudado o caldo de la carne o el agua utilizada en el cocinado de los vegetales (Coulter, 1996).

Por ejemplo, las espinacas pueden perder hasta el 90 % de su contenido de tiamina, especialmente si el agua usada para su cocción tiene un pH alto y contiene niveles elevados de cloro (Lynch y Young, 2000).

La congelación no tiene efecto, o es muy ligero, en el contenido de tiamina de los alimentos. La disminución de esta vitamina en alimentos cocidos en horno de microondas es comparable a la de los alimentos cocinados en la forma convencional (Mahan y Arlin, 1995).

1.3.2. Riboflavina (vitamina B₂)

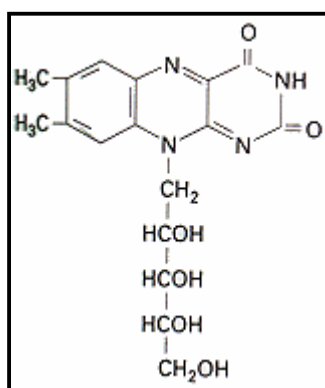


Figura 6. Estructura de vitamina B₂

La riboflavina o vitamina B₂ (Figura 6) es un derivado de un compuesto flavínico, la isoaloxacina, que está unido en posición 9 al D-ribitol (Mataix y Sánchez, 2002).

La riboflavina en estado puro se presenta en forma de cristales amarillos. Es estable al calor, oxidación y medio ácido (Mahan y Arlin, 1995). Es soluble en agua (pero mucho menos que otras vitaminas de su grupo) y alcoholes de cadena corta, pero insoluble en éter, cloroformo y acetona (Russell, 2000). Desde el punto de vista analítico, la

característica físico-química más importante de la riboflavina es su fotosensibilidad. La exposición de esta vitamina a la luz ultravioleta y visible conduce a una fotoreducción irreversible a lumiflavina y lumicromo, con lo cual la vitamina pierde su actividad (Russell, 2000).

Métodos de análisis

La cuantificación de la riboflavina debe realizarse en condiciones de luz tenue usando recipientes adecuados, ya que uno de los principales problemas para el análisis de esta vitamina es la labilidad de las flavinas a la luz y a las condiciones alcalinas (Valls y col., 1999b). Para los análisis de riboflavina total, las coenzimas se liberan primero de las proteínas a las cuales están unidas y entonces son hidrolizadas a riboflavina. Esto generalmente se realiza con ácidos minerales diluidos (HCl 0.1-0.3 M o H_2SO_4 0.05-0.1 M) a 100-121 °C (ebullición o esterilización por autoclave) durante 15-60 min, con o sin hidrólisis enzimática de las coenzimas. La hidrólisis enzimática involucra el uso de claradiastasa o takadiastasa, sola o en combinación con tripsina o papaína a 37-50 °C entre 1 y 18 h. Se ha demostrado que la variabilidad en la actividad y especificidad de la takadiastasa de diferentes fuentes afecta los análisis de riboflavina total. Aunque la detección, tanto por ultravioleta como por fluorescencia, es adecuada para esta vitamina, la fluorescencia es el método que generalmente da una mayor sensibilidad (Russell, 2000).

Fuentes

Los alimentos contienen las tres principales especies químicas de la vitamina B₂: riboflavina y sus dos coenzimas, flavin mononucleótido (FMN) y flavin adenin dinucleótido (FAD). Las coenzimas son los compuestos endógenos predominantes en los alimentos y usualmente están unidos a proteínas. La riboflavina total es la suma de riboflavina, FMN y FAD (Russell, 2000).

Las fuentes de proteínas animales, como carne, pollo, pescado y, sobre todo, productos lácteos, son buenas fuentes de riboflavina (Figura 7) (National Research Council, 1991). Los alimentos derivados de plantas contienen cantidades más bajas de

riboflavina (Russell, 2000), no obstante, los vegetales de hojas verdes, como brócoli, nabos verdes, espárragos y espinacas, son las mejores fuentes de esta vitamina (National Research Council, 1991). En la Tabla 7 se representa el aporte de vitamina B₂ de las raciones de distintos tipos de alimentos que la contienen en cantidad significativa.



Figura 7. Fuentes de vitamina B₂

Tabla 7. Contenido en vitamina B₂ de distintos alimentos
(Mataix y Sánchez, 2002)

Alimento	Cantidad ^a
Aves	0.12
Lomo de cerdo	0.20
Jamón serrano	0.25
Sardina, boquerón	0.33
Merluza, lenguado	0.10
Mejillones	0.14
Huevo de gallina	0.33
Leche entera pasteurizada	0.18
Yogur natural	0.18
Queso manchego	0.33
Lentejas	0.22
Almendras	0.67
Pan, pastas	0.05
Espinacas	0.23
Aguacates	0.13

^amg/100 g.

Pérdidas debidas a la tecnología industrial y doméstica

La riboflavina es la vitamina más resistente al calor y a la oxidación, por lo que durante el tratamiento térmico y procesamiento de los alimentos se pierde muy poca cantidad (Mahan y Arlin, 1995). Es estable en solución ácida, pero inestable en solución alcalina y especialmente sensible a la luz (radiaciones ultravioleta), que la destruye de manera irreversible formando lumiflavina, sustancia que cataliza a su vez la destrucción de la vitamina C (Mataix y Sánchez, 2002). Asimismo, las coenzimas están sujetas a hidrólisis por fosfatasas endógenas que están presentes en un gran número de alimentos. Debido a que estas enzimas se inactivan generalmente por procesamiento térmico, sólo se deben de tomar en cuenta en el análisis de productos frescos (Russell, 2000).

1.3.3. Ácido ascórbico (vitamina C)

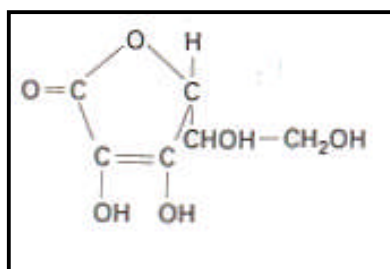


Figura 8. Estructura del ácido ascórbico

El término vitamina C es utilizado para englobar todos los compuestos con la actividad biológica del ácido L-ascórbico (ácido 2,3 enediol, L-gulónico) (Figura 8). Se trata de un compuesto químicamente sencillo, aunque con una estructura inusual. Su fórmula empírica es $C_6H_8O_6$, siendo una α -cetolactona de seis átomos de carbono que muestra un anillo de lactona de cinco carbonos y un grupo enediol bifuncional con un grupo carbonilo adyacente, siendo este grupo enediol esencial para su actividad biológica (Mataix y Ochoa, 2002).

El ácido ascórbico (AA) es un excelente agente reductor. La pérdida de un electrón da lugar a la formación de un radical relativamente estable, denominado ácido semidehidroascórbico (también llamado ascorbato o monodehidroascorbato), el cual sufre una segunda oxidación generando ácido dehidroascórbico (DHAA) (Figura 9). Esta oxidación de ácido ascórbico a ácido dehidroascórbico es reversible, por lo que ambas formas se encuentran en la naturaleza (Mataix y Ochoa, 2002).

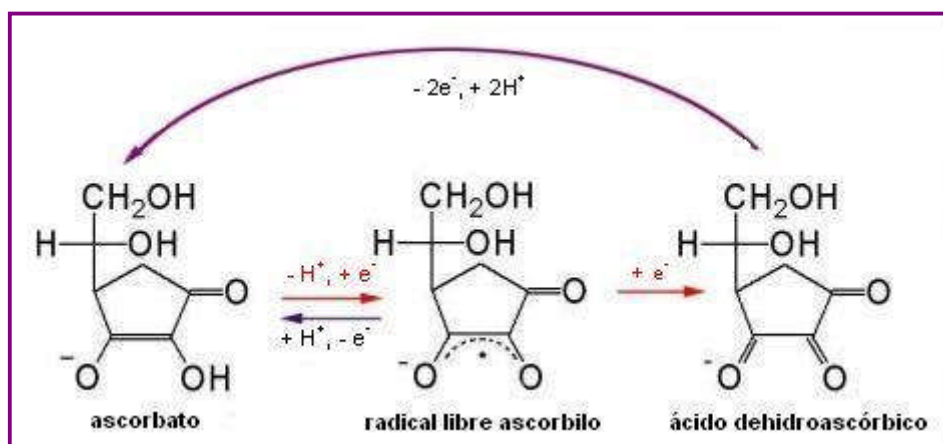


Figura 9. Oxidación del ácido ascórbico a ácido dehidroascórbico

Si el ácido dehidroascórbico es hidratado se transforma en ácido dicetogulónico, no activo biológicamente, siendo esta transformación irreversible. Esta hidratación ocurre espontáneamente en solución neutra o alcalina (Mataix y Ochoa, 2002).

El ácido ascórbico es una sustancia cristalina, hidrosoluble, blanca, estable en forma seca. Sin embargo, en solución, AA y DHAA son altamente oxidables, en especial si se exponen a altas temperaturas, iones metálicos, oxígeno disuelto, pH alcalino, luz o enzimas degradativas como la ácido ascórbico oxidasa (Gökmen y col., 2005). El AA es muy soluble en agua, medianamente soluble en acetonitrilo, ácido acético, y alcoholes de cadena corta (metanol y etanol). Es insoluble en éter, cloroformo, benceno, éter de petróleo, aceites y grasas (Russell, 2000).

Métodos de análisis

Los procedimientos para la extracción de vitamina C tienen en cuenta la necesidad de prevenir la degradación y pérdida de las especies químicas. Los reactivos más populares para la extracción son los ácidos. La mayoría de los extractantes contienen ácido metafosfórico, tricloroacético y oxálico, solos o en combinación con otros ácidos o alcoholes de cadena corta, tales como el metanol y el etanol (Russell, 2000).

La detección de las especies químicas individuales es complicada por sus propiedades tan diferentes. Aunque AA y DHAA absorben en el rango de ultravioleta, el máximo de absorbancia de DHAA está entre 210 y 230 nm y su detección lo hace especialmente susceptible de sufrir interferencias con un gran número de constituyentes alimenticios que absorben en el mismo rango. En contraste, AA exhibe una absorbancia máxima a 245-265 nm, dependiente del pH, lo cual hace que la detección por ultravioleta sea la más adecuada. Ninguna de las dos especies químicas fluorescen naturalmente (Russell, 2000).

Fuentes

En los alimentos, la vitamina C existe como dos especies químicas: ácido L-ascórbico (AA) y su producto de oxidación, ácido dehidro-L-ascórbico (DHAA), siendo la suma de ambos, el contenido total de vitamina C (Russell, 2000).

Las frutas, verduras y hortalizas constituyen la mayor fuente de vitamina C (Figura 10) en la dieta, siendo escasa en cereales, legumbres y frutos secos (Tabla 8). Como ejemplo de importantes fuentes de esta vitamina se encuentra la naranja, la manzana, el limón, la mandarina, el ajo, el mango, el melón, la fresa, la frambuesa, el kiwi, la guayaba, las grosellas, la cereza, la ciruela, el tomate, el pimiento verde, el aguacate, la calabaza, la cebolla y las verduras verdes (brócoli, repollo, coliflor, col de Bruselas, endibia, espinaca, lechuga). La mejor manera de aprovechar la vitamina C es consumiendo estos alimentos crudos o con un mínimo de cocción (http://www.nutrinform.com.ar/pagina/info/vita_min.html 02/02/2006).

[illegible]

Alimento	Cantidad ^a
Mandarina	35
Melón	32.1
Naranja	50.6
Fresa y fresón	60
Kiwi	94
Tomate	26.6
Coliflor, col, repollo	67
Pimientos	131
Espinaca	35
Nueces	2.6
Lentejas	3.4
Garbanzos	4.1

que la vitamina se encuentra protegida por la presencia de ácidos orgánicos y antioxidantes. Pero, cuando la situación estructural cambia al manipular la fruta a nivel culinario (cortes, aplastamientos, etc.) la enzima puede inactivar la vitamina.

b) **Luz.** La luz es otro agente capaz de inactivar la vitamina C. Así la luz solar incidiendo sobre una botella de cristal incoloro provoca la pérdida de la totalidad de vitamina C en aproximadamente 20 min.

c) **Calor.** El calor afecta también a la vitamina C, siendo más acusado el efecto cuando aumenta el tiempo de actuación. El efecto negativo se evita cuando el alimento (con vitamina C) se introduce en agua hervida previamente, que además ha eliminado gran parte de oxígeno. En estos casos además la utilización de tapaderas evita también la acción del oxígeno atmosférico. Las ollas a presión que elevan la temperatura por encima del punto de ebullición, pero en que el tiempo de exposición es menor y además reducen mucho la presencia de oxígeno y utilizan menos cantidad de agua de cocinado, son claramente aconsejables.

d) **Metales.** Deben evitarse utensilios que contengan sobre todo cobre. El hierro y cinc producen efectos menores.

e) **Almacenamiento.** El almacenamiento reduce los niveles de vitamina C, como consecuencia de efectos diversos de entre todos los antes mencionados. Un ejemplo evidente se encuentra en las patatas, que pueden disminuir sus niveles en más de un 40 %, en seis meses de almacenamiento.

La vitamina C es una de las vitaminas que más fácilmente pueden ser destruidas durante el almacenamiento y conservación de los alimentos, siendo además sus pérdidas bastante grandes e incluso totales durante la manipulación culinaria, lo que es debido tanto a su inestabilidad química como a su alta solubilidad en agua (300 g/L de agua). Por lo tanto, es importante considerar el tiempo de almacenamiento, cocción y otros tipos de procesamiento, en el momento de evaluar el contenido real de ácido ascórbico en los

alimentos. Debido a todo lo ya explicado, la vitamina C es usada frecuentemente como un indicador de la estabilidad de todas las vitaminas en los alimentos (Mataix y Ochoa, 2002).

1.4. PIGMENTOS

Los alimentos presentan una coloración porque los pigmentos que contienen absorben la luz de unas determinadas longitudes de onda y reflejan o transmiten la luz de otras. El color se ve afectado no solamente por la concentración de pigmentos sino también por la estructura física del alimento y por la forma en que se dispersa la luz desde su superficie. La definición del color puede ser ambigua. Las determinaciones objetivas de los atributos del color incluyen curvas espectrofotométricas, mediciones triestímulo CIE, determinaciones de diferencias de color y mediciones practicadas sobre pigmentos extraídos del producto (Lyon y Churchill, 1992).

1.4.1. Carotenoides

Los carotenoides son un grupo de pigmentos naturales responsables del color amarillo, naranja o rojo de muchos alimentos (Niizu y Rodríguez-Amaya, 2005). Desde el punto de vista químico, son terpenoides, sustancias derivadas naturalmente del intermediario metabólico ácido mevalónico que proporciona la unidad estructural básica, el isopreno (Coultate, 1996). En la naturaleza, los carotenoides son sintetizados exclusivamente por las plantas superiores y microorganismos fotosintéticos, en los cuales, juegan un papel fundamental en el metabolismo (Ball, 2000).

La molécula de carotenoide está constituida por dos mitades, y la naturaleza del grupo terminal de cada mitad está especificada. Cada carotenoide está considerado como un derivado de un caroteno cercano, indicado por dos letras griegas que describen los grupos terminales. La nomenclatura reconoce seis grupos terminales: β , ϵ , κ , ϕ , χ y ψ . Los tres más comunes son β , ϵ , y ψ . (Ball, 2000).

Desde el punto de vista nutricional, los carotenoides se clasifican como provitaminas y carotenoides inactivos. Para tener actividad de vitamina A, la molécula de carotenoide debe incorporar una molécula de retinol, por ejemplo, un anillo no sustituido de β -ionona con una cadena polieno de 11 carbonos. β -caroteno ($C_{40}H_{56}$, PM= 536.88), el carotenoide provitamina A más conocido, está compuesto por dos moléculas de retinol; de este modo el compuesto posee una actividad de vitamina A del 100 %. Las estructuras de los otros carotenoides incorporan una molécula de retinol y, así teóricamente, contribuyen con un 50 % de la actividad biológica del β -caroteno. Entre los casi 600 carotenoides que existen en la naturaleza, solo alrededor de 50 poseen actividad de vitamina A (Ball, 2000).

Algunos estudios epidemiológicos han correlacionado la ingesta de frutas y vegetales, ricos en carotenoides, con la protección de algunas formas de cáncer. Esta acción posiblemente se deba a las propiedades antioxidantes de los carotenoides más que a su actividad de vitamina A (Ziegler, 1989; Ziegler, 1991).

Los carotenoides se dividen en dos grupos principales: los carotenos (Figura 11), que son hidrocarburos, y las xantofilas que contienen oxígeno. El caroteno más simple es el licopeno.

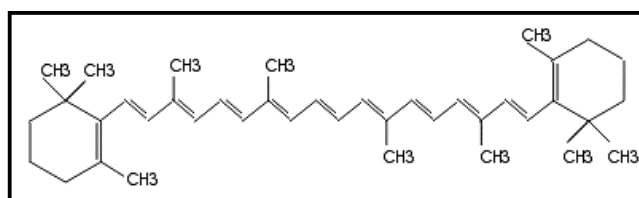


Figura 11. Estructura del β -caroteno

Las xantofilas pueden inicialmente considerarse como productos de la hidroxilación de los carotenos y la mayor parte de los tejidos vegetales contienen cantidades traza de criptoxantinas, los precursores monohidroxilados de las xantófilas dihidroxiladas, como la zeaxantina y la luteína (Figura 12).

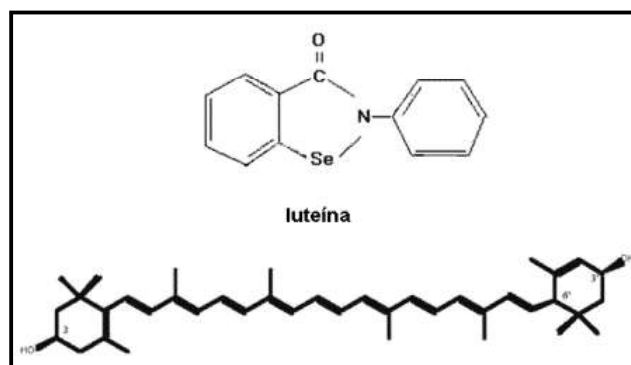


Figura 12. Estructura de luteína

La mayoría de los carotenoides de los tejidos vegetales contienen átomos de 40 carbonos, pero también se encuentran moléculas más cortas conocidas como apocarotenoides (Ball, 2000).

Métodos de análisis

Con la excepción de los dos apocarotenoides ácidos, que forman sales hidrosolubles en disoluciones alcalinas, los carotenoides son solubles sólo en disolventes orgánicos apolares. Sus espectros de absorción son bastante similares, viéndose notablemente influidos en su $\lambda_{\text{máx}}$ y su coeficiente de extinción por el disolvente. Los espectros de absorción intentan mostrar que las xantofilas son los pigmentos dominantes en los tejidos de color amarillo, mientras que los carotenos tienden a proporcionar una tonalidad naranja (Coultate, 1996).

Fuentes

La distribución de los carotenoides entre los distintos tipos de vegetales o tipos de alimentos es muy variada (Figura 13). En las hortalizas foliáceas verdes, se hallan presentes los mismos carotenoides que en los cloroplastos de todos los vegetales superiores, y en las mismas proporciones, siendo dominantes el β -caroteno y las xantofilas luteína, violaxantina y neoxantina. También se encuentran en ellas pequeñas cantidades de zeaxantina, α -caroteno, criptoxantina, y anteraxantina. La cantidad de β -

caroteno presente en los tejidos de las hojas suele hallarse entre 200 y 700 $\mu\text{g g}^{-1}$ (peso seco) (Coultrate, 1996). En la mayoría de los vegetales y, de muchas frutas, el β -caroteno constituye más del 85 % de la actividad total de provitamina A y, cabe mencionar, que la luteína es el carotenoide más abundante en los vegetales de hoja verde (Khachik y col., 1986).



Figura 13. Fuentes de carotenoides

Pérdidas debidas a la tecnología industrial y doméstica

Los carotenoides son, en general, bastante estables en su ambiente natural pero, al calentar los alimentos, o cuando se extraen en disoluciones oleosas o en disolventes orgánicos, se tornan mucho más lábiles. Al calentarlos en ausencia de aire, algunos de los dobles enlaces de los carotenos sufren una isomerización *trans cis*. No se conocen suficientemente las estructuras de los “neocarotenos” resultantes, pero a medida que crece el número de dobles enlaces *cis*, el color va perdiendo intensidad. La degradación del β -caroteno deja un resto de β -ionona, un compuesto volátil al que se debe el olor característico del heno secado al sol (y parcialmente decolorado) (Coultrate, 1996).

1.4.2. Clorofilas

Las clorofilas son los pigmentos verdes de las hortalizas foliáceas y son los pigmentos funcionales de la fotosíntesis, en todas las plantas verdes (Boekel, 1999). Se hallan, junto con numerosos carotenoides, en las membranas de los cloroplastos, los orgánulos que llevan a cabo el proceso fotosintético en las células vegetales. Los pigmentos de los cloroplastos se encuentran íntimamente asociados a otros componentes lipófilos de las membranas, como los fosfolípidos, y a algunas proteínas. Las algas y las bacterias fotosintéticas contienen diferentes tipos de clorofilas, pero en los vegetales superiores sólo se encuentran las clorofilas *a* y *b*, en la proporción aproximada de 3/1 (Coultate, 1996).

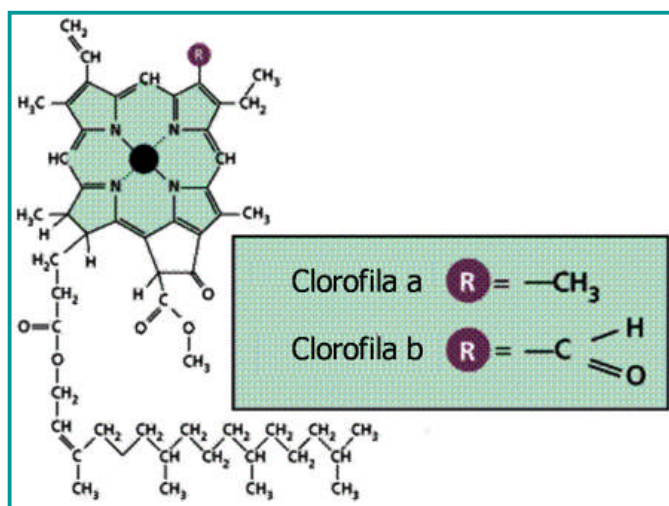


Figura 14. Estructuras de clorofila a y clorofila b

Se trata esencialmente de porfirinas similares a las de los pigmentos hemo, como la mioglobina, pero con diferentes sustituyentes en los anillos y con un átomo de magnesio sustituyendo el hierro; poseen además un quinto anillo formado por un enlace establecido entre la posición 6 y el puente γ -metino (Figura 14). Por analogía con otros pigmentos, como la mioglobina, se deduce que el anillo de porfirina se asociará fácilmente con las regiones hidrófobas de las proteínas constitutivas de las membranas de los cloroplastos. La larga cadena lateral del fitol facilitará la íntima asociación con los carotenoides y los lípidos de las membranas (Coultate, 1996).

Las clorofilas son compuestos que tienen ciertas funciones biológicas, que son efectivas siempre y cuando estos compuestos conserven en su estructura el anillo de porfirina. Estudios recientes señalan que las clorofilas y sus derivados, tienen funciones relacionadas con la promoción de la salud, tales como actividades de tipo antimutagénico y anticarcinogénico (Yoshikawa y col., 1996; Chernomorsky y col., 1999; Higashi-Okai y col., 1999; Ma y Dolphin, 1999; Morita y col., 2001). En un estudio realizado por Negishi y col. (1997) encontraron que el extracto de clorofila crudo y purificado de la espinaca, inhibía la mutagenicidad de varios agentes mutagénicos. Por lo anterior, la presencia de clorofilas contribuye a dar un valor añadido a los productos vegetales (Minguez-Mosquera y col., 2002).

Métodos de análisis

No son fáciles de definir las longitudes de onda exactas de los máximos de absorción, ni los coeficientes de extinción, dado que varían con la naturaleza del disolvente orgánico utilizado y con la presencia de trazas de agua. Estas variaciones son suficientes para dificultar la determinación precisa, espectrofotométricamente, de las tasas de clorofila en los tejidos foliáceos. Una dificultad adicional es la constituida por el hecho de que, en disolución, especialmente en disolventes en los que participe el metanol, tiene considerable tendencia a la oxidación o a la isomerización, con sustitución del hidrógeno en posición 10 por OH o OCH₃. La estabilidad o inestabilidad de la clorofila en los tejidos vegetales tiene un gran interés en la industria alimentaria. La clorofila desaparece de las hojas al final de la vida activa de las mismas. La degradación de la clorofila acompaña a la de las membranas de los cloroplastos; en cambio, los carotenoides son más estables. (Coulter, 1996).

Fuentes

Las clorofilas son los pigmentos principales en las plantas (Boekel, 1999) (Figura 15) y en las algas verdes (Schoefs, 2002).



Figura 15. Fuentes de clorofilas

Pérdidas debidas a la tecnología industrial y doméstica

Las clorofilas son muy susceptibles a cambios químicos y físicos durante el procesamiento de los vegetales (Teng y Chen, 1999). Los vegetales verdes expuestos a procesamiento térmico, muestran una pobre calidad en su color, comparado al de los vegetales frescos. El grado de verdor, debido principalmente a la presencia de las clorofilas, es de gran importancia para determinar la calidad de este tipo de vegetales (Nisha y col., 2004), ya que es el color, uno de los principales parámetros para medir la calidad de los productos frescos (Teng y Chen, 1999; Tan y col., 2000; Tijskens y col., 2001).

Los cambios de color en los vegetales verdes, a causa de los tratamientos térmicos (tratamientos culinarios ordinarios, durante el escaldado previo a la congelación o durante el tratamiento térmico para la elaboración de conservas) son el resultado de la conversión de clorofilas a feofitinas a través de la sustitución del Mg por el hidrógeno, proceso que tiene lugar más fácilmente en medio ácido (Canjura y col., 1991; Lau y col., 2000; Ahmed y col., 2002).

Las feofitinas presentan un color pardo mate; son los pigmentos dominantes en las hortalizas «verdes», como la col o el repollo, que han sido sobrecocinadas. La acidez del contenido vacuolar de las células vegetales dificulta la lucha contra la formación de feofitina, especialmente durante el intenso tratamiento térmico necesario en la

elaboración de los guisantes en conserva. Uno de los medios de atacar este problema consiste en alcalinizar ligeramente el agua de cocción, mediante la adición de pequeñas cantidades de bicarbonato sódico. Con ello, se consigue un éxito limitado, pero la alcalinidad deteriora la textura y el aroma y además produce pérdidas de vitamina C. (Coulter, 1996).

OBJETIVOS



La presente Tesis Doctoral se encuentra integrada en el proyecto de investigación titulado “Caracterización sensorial y fisicoquímica de grelo. Optimización de diferentes procesos de industrialización”, financiado por la Secretaría Xeral de Investigación e Desenvolvemento de la Xunta de Galicia (Ref. PGIDT01PXI26204PR).

Los objetivos planteados para la realización de este trabajo son:

1. Optimización del proceso de congelación del grelo escaldado y cocido.
2. Puesta a punto de técnicas analíticas para la extracción y cuantificación de vitaminas (ácido ascórbico, ácido dehidroascórbico, tiamina y riboflavina) y pigmentos (carotenoides, clorofilas y feofitinas) mediante HPLC, para la caracterización del grelo.
3. Evaluación fisicoquímica y microbiológica de las muestras de grelo en fresco, tras su escaldado y/o cocción, a lo largo del almacenamiento en congelación.



MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. DESCRIPCIÓN DE LAS INSTALACIONES

Las actividades del proceso productivo se llevaron a cabo en la nave de Industrias Agrarias y Alimentarias emplazada en el edificio de Ampliación de la Escuela Politécnica Superior del campus de Lugo. Esta nave tiene una superficie útil de 223.47 m² y se divide en cinco secciones:

- **Zona de fabricación**

Es la estancia dedicada a desarrollar las actividades del proceso productivo. Posee una superficie útil de 73.88 m². Además del acceso principal, posee otro desde la zona del taller.

- **Zona de laboratorio**

Se comunica directamente con la sala de fabricación, la sala de calderas y la de compresores. Tiene una superficie útil de 11.13 m².

- **Zona correspondiente a la sala de calderas**

Se localiza en la zona anterior de la nave. Su superficie útil es de 31.92 m² y tiene dos accesos; uno directo desde el exterior y otro desde el interior del recinto dedicado a laboratorio. En ella se encuentra el equipo de generación de vapor.

- **Zona correspondiente a la sala de compresores**

Situada en la zona anterior de la nave y con un acceso desde el corredor central de la planta inferior. Tiene una superficie útil de 25.80 m² y en ella se encuentran los equipos de generación y tratamiento de aire comprimido, y los compresores y condensadores de las cámaras frigoríficas.

- **Zona de taller**

Esta estancia está dedicada a la construcción de equipos que se utilizaran en la zona de fabricación. Su superficie útil es de 73.86 m². Está comunicada con la sala de fabricación y directamente con el exterior.

Asimismo, la nave consta de los siguientes tipos de instalaciones:

3.1.1. Instalación de aire comprimido

Los elementos de que se compone la instalación son los siguientes:

3.1.1.1. Sistema de generación de aire comprimido

Este sistema (Figura 16) está compuesto por:



Figura 16. Sistema de generación de aire comprimido

Grupo de compresión

Es el elemento fundamental de la fase de generación del aire comprimido (Arbones y col., 2001), el cual se encarga de captar el aire atmosférico de su entorno, elevar la presión del mismo y, después, alimentar el depósito y la canalización general (Serrano, 1997). Para la realización de este trabajo se utiliza un compresor rotativo de paletas accionado por un motor de 5 CV.

Refrigerador

También llamado refrigerador posterior. Se refrigera por aire (refrigerador posterior aire-aire). Está dotado de un separador de condensados y de un sistema de purga automáticos (Arbones y col., 2001).

Separador de condensados

Situado a la salida del compresor para eliminar la humedad del aire.

Depósito o acumulador

Consiste de un recipiente a presión que incluye válvula de seguridad, manómetro, boca de limpieza y sistema de purga automático (Arbones y col., 2001). Sus funciones son:

- ❖ Acumular gran cantidad de aire a presión capaz de mantener en marcha, durante un cierto tiempo, los equipos neumáticos en caso de que falle el fluido eléctrico que alimenta el compresor, así como evitar arranques frecuentes del mismo.
- ❖ Absorber fluctuaciones de presión originadas por los generadores.
- ❖ Hacer de refrigeradores de aire y también de condensadores de la humedad del aire (Serrano, 1997).

Secador frigorífico

Los secadores son elementos que separan automáticamente la humedad del aire comprimido en un grado suficiente para evitar que se produzcan posteriores condensaciones en el circuito. Los secadores frigoríficos operan con un punto de rocío a la presión de trabajo de 2 °C, garantizando un alto grado de secado del aire comprimido (Guillén, 1988).

Filtros

Se encargan de retener las impurezas que posee el aire en su seno (Serrano, 1997). Se distinguen por su grado de filtración y por la capacidad para la retención de aceite, un contaminante del aire generado durante la compresión. Existen diversos tipos, por ejemplo, microfiltro, filtro desoleador y filtro de carbón activo; a partir de éstos se pueden obtener distintos tipos de aire (alimentario, estéril, etc.) (Arbones y col., 2001).

3.1.1.2. Red de distribución

Esta red tiene la misión de transportar el aire desde la sala de compresores hasta los equipos que lo consumen (Serrano, 1997). En la instalación de la nave, las tuberías principales son de acero estirado negro de $\frac{3}{4}$ de pulgada y las tuberías de servicio son de polímeros semirígidos como nylon.

3.1.2. Instalación eléctrica

Aunque la nave de procesamiento contaba con una instalación eléctrica, ésta no era la adecuada para garantizar el funcionamiento normal de la maquinaria y la seguridad de los equipos y los operarios. Asimismo, la disposición existente en la colocación y número de tomas de corriente, tanto trifásica como monofásica, era deficiente. Por este motivo, la instalación eléctrica fue modificada con el fin de mejorar la seguridad de la misma y adaptarla a las nuevas necesidades (Viña, 2004).

Se trata de una instalación trifásica de 230/400 V de 50 Hz de frecuencia. En la llegada de la corriente a la nave de procesamiento existen dos cuadros eléctricos, uno que distribuye la instalación de fuerza y otro que distribuye la instalación de alumbrado. Del cuadro general, una corriente va al cuadro secundario de la sala de fabricación, del que parte la instalación por medio de una canalización eléctrica en superficie bajo tubo de PVC de 32 mm de diámetro. En el interior de los cuadros existen diversas protecciones unidas por un conductor de 2.5 mm².

3.1.3. Instalación de fontanería

Una única línea de cobre de 20 mm, con llave general de corte y filtro para la eliminación de impurezas.

3.1.4. Instalación de frío

Compuesta de tres recintos frigoríficos, uno de conservación de productos congelados (2660 fr/h y -30 °C) que también puede trabajar a temperaturas de refrigeración, y dos de refrigeración (0 °C a 8 °C y 2545 fr/h). Las cámaras frigoríficas (Figura 17) están situadas en la zona de fabricación y tienen unas dimensiones interiores de 2.0 m × 2.4 m × 2.5 m. Los cierres están constituidos por paneles prefabricados tipo sándwich formados por una capa de 12 cm de poliuretano inyectado de 40 kg/m³ situado entre dos chapas de acero galvanizado y lacado en ambas caras.



Figura 17. Cámaras frigoríficas

3.1.5. Instalación de vapor

Constituida por una caldera de 300 kg/h (Figura 18) y presión de diseño de 8 bar, un depósito de alimentación de la caldera, un equipo de tratamiento de agua de alimentación, un depósito de gasóleo y una red de abastecimiento de vapor y retorno de condensados

realizado en acero negro estirado DIN 2440 con diámetros comprendidos entre $\frac{3}{4}$ pulgada y $1 \frac{1}{4}$ pulgada y aislamiento con coquillas de lana mineral.



Figura 18. Caldera

3.1.6. Instalación para la cocción

Esta instalación está compuesta por cuatro quemadores–paelleros (Figura 19) que se conectan a dos bombonas de gas butano, cuya presión de funcionamiento es de 28-30 mbar, su potencia nominal es de 5 kW y su consumo de gas butano es de 0.363 kg/h.



Figura 19. Quemadores-paelleros

3.2. DESCRIPCIÓN DE LOS EQUIPOS

3.2.1. Equipo de lavado

Este equipo se construyó para lavar las muestras utilizadas en los experimentos (García, 2005).

3.2.1.1. Descripción

El equipo está construido en acero inoxidable AISI 304 (Figura 20) La limpieza se realiza con agua a la cual se le hace burbujear aire comprimido.



Figura 20. Equipo de lavado

Consta de los siguientes elementos:

Estructura

El conjunto de la estructura está fabricado con chapa curvada de acero inoxidable de 1.5 mm de espesor, en la cual se utilizó soldadura TIG para formar un cilindro de 65 cm de diámetro y 67 cm de altura.

Doble fondo

El doble fondo ha sido construido en chapa de acero perforada de 0.5 mm de diámetro de poro, su función es la de facilitar la separación de los grelos y la tierra y otras impurezas que deseamos eliminar en esta etapa.

Válvula de vaciado

Se trata de una válvula de esfera de 1 pulgada situada en el fondo de la estructura. Permite efectuar la eliminación del agua de lavado.

Sistema de aireación

La aireación se realiza con aire comprimido de calidad alimentaria que se aplica a una presión de 6 bar a 7 bar a través de cuatro manguitos de ¼ pulgada distribuidos uniformemente a 17 cm del fondo de la estructura.

Soporte

Fabricado con perfil angular soldado de 50 mm × 50 mm × 5 mm de acero inoxidable.

3.2.1.2. Funcionamiento

Inicialmente, se procede al llenado del cilindro, con agua, hasta completar aproximadamente 2/3 de su capacidad. Después se introducen las muestras y, posteriormente, se activa el sistema de aireación permitiendo la entrada del aire. Una vez completada la limpieza, se abre la válvula de vaciado para efectuar la eliminación del agua y así poder retirar las muestras que pasarán a la siguiente fase del proceso de industrialización.

3.2.2. Equipo de escaldado

Este equipo se construyó para esta etapa del procesamiento.

3.2.2.1. Descripción

El equipo está construido en acero inoxidable AISI 316 (Figura 21) El escaldado se realiza a vapor, alimentado por la caldera descrita en el apartado 3.1.5.



Figura 21. Equipo de escaldado

Consta de los siguientes elementos:

Estructura

El conjunto de la estructura está fabricado con chapa curvada de acero inoxidable de 1.5 mm de espesor, en la cual se utilizó soldadura TIG para formar un cilindro de 70 cm de diámetro y 80 cm de altura.

Válvula de vaciado

Se trata de una válvula de esfera de 1 pulgada situada en el fondo de la estructura. Permite efectuar la eliminación del condensado.

Cestón

Se trata de un cilindro fabricado en chapa de acero inoxidable, con perforaciones de 10 mm de diámetro y dimensiones 2000 mm × 1000 mm × 1 mm. Esta chapa está curvada formando un cilindro de 65 cm de diámetro interno. Se mueve por medio de un elevador que es accionado por un cilindro neumático.

3.2.2.2. Funcionamiento

Inicialmente, se colocan las muestras en el tambor y, por medio del elevador neumático, se introduce éste a la cuba de escaldado. Posteriormente, se abren las válvulas, cuya regulación es de forma manual, y se deja pasar el vapor, a presión atmosférica, al interior de la cuba. Este vapor inicialmente se encontraba a una presión de 3 bar. Es muy importante tener abierta la válvula de vaciado para ir eliminando el condensado que se vaya formando. Una vez concluido el proceso de escaldado, se retiran rápidamente las muestras del equipo.

3.2.3. Equipo de prensado

Este equipo se construyó para esta etapa del procesamiento (Viña, 2004).

3.2.3.1. Descripción

Se trata de una prensa neumática (Figura 22) sobre una base de acero al carbono, en la que, las partes que van a entrar en contacto con las muestras son de acero inoxidable.

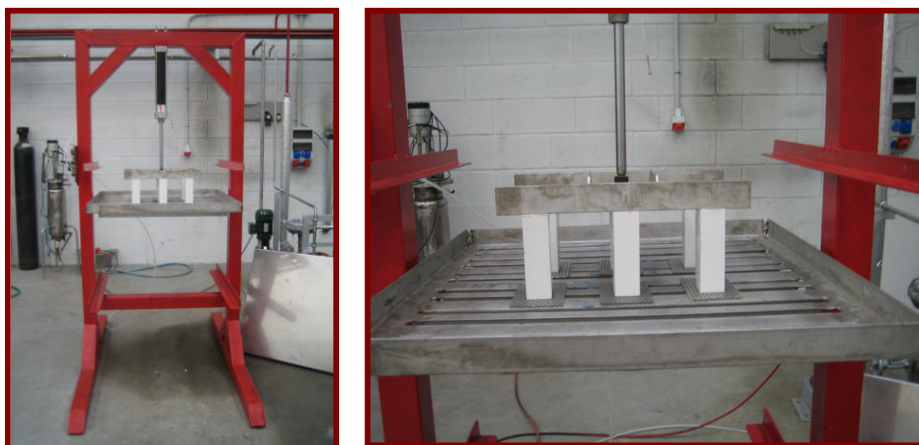


Figura 22. Equipo de prensado

Básicamente se distinguen los siguientes elementos:

Estructura

La estructura de este aparato está constituida por piezas de perfil cuadrado de acero al carbono de $80\text{ mm} \times 80\text{ mm} \times 2\text{ mm}$, también posee piezas de perfil cuadrado colocadas estratégicamente para estabilizar la estructura. Se distinguen además seis piezas angulares de acero galvanizado, de 800 mm de largo, cuya función es la de sujetar la base de prensado a distintas alturas. Toda la estructura está pintada con pintura plástica de color rojo, con el fin de evitar la oxidación del acero al carbono.

Cilindro neumático

Se trata de un cilindro de doble efecto de 6 cm de diámetro, con una longitud de barra de 350 mm. Este elemento aplicará la fuerza sobre el producto.

Cuadro de mandos

Está formado por:

- ❖ **Válvula reductora de presión:** su función es la de regular la presión de trabajo del cilindro y, por tanto, controlar la fuerza proporcionada por el mismo, ya que ésta es proporcional a la presión (Arbones y col., 2001).
- ❖ **Manómetro:** mide la presión exacta realizada por el cilindro neumático. Es un manómetro que mide de 1 a 6 bar, cuya sensibilidad es de 0.2 bar.
- ❖ **Válvula de vías:** abre, cierra y modifica la dirección de paso del aire, lo que permite controlar el cilindro.

Todos los aparatos van colocados sobre una placa de acero inoxidable unida a la estructura.

Cabezal de prensado

En este cabezal se distinguen dos partes:

- **Parte superior:** esta hecha con angular de acero inoxidable de 50 mm × 50 mm × 5 mm. En esta parte es donde se une el cilindro neumático a la cabeza de prensa.
- **Parte inferior:** Constituida por seis tacos rectangulares de polietileno apto para uso alimentario; de dimensiones 55 mm × 45 mm × 150 mm, a cada uno de ellos se une una chapa perforada de acero inoxidable.

Base de prensado

Se trata de una estructura cuadrada de 820 mm de lado con perfiles angulares de acero inoxidable de 50 mm × 50 mm × 5 mm.

Cubetas de prensado

Son unos prismas rectangulares contruidos en acero inoxidable con perforaciones de 5 mm de diámetro y 2 mm de espesor. Sus dimensiones exteriores son 130 mm × 90 mm × 75 mm.

3.2.3.2. Funcionamiento

Inicialmente, se selecciona la presión que se desea aplicar a las muestras y se regula la velocidad de descenso del cabezal utilizando las válvulas reguladoras de caudal. A continuación, se coloca la base de prensado a la altura deseada, se llenan las cubetas de prensado y se colocan en la posición adecuada bajo el cabezal de prensado. Por último, se acciona el cilindro que provocará el prensado de la muestra con la consiguiente eliminación de agua de la misma y el empacamiento del producto.

3.2.4. Equipo de centrifugado

Este equipo se construyó para esta etapa del procesamiento (Viña, 2004).

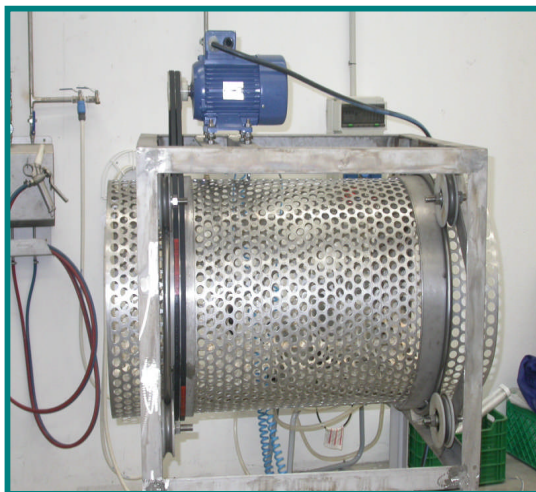


Figura 23. Equipo de centrifugado

3.2.4.1. Descripción

Es un escurridor centrífugo accionado por un motor eléctrico provisto de un sistema de variación de velocidad. Todo el equipo está construido en acero inoxidable AISI 304 (Figura 23). Se distinguen los siguientes elementos:

Estructura

El conjunto de la estructura está fabricado con perfil angular soldado de 50 mm × 50 mm × 5 mm de acero inoxidable. En las partes anterior y posterior del aparato lleva, en cada esquina de la estructura cuadrada, piezas de perfil angular que sirven para sujetar el sistema de giro. Las patas, también fabricadas de perfil angular, están soldadas a la parte superior. Los perfiles de las patas de la parte anterior, o zona de carga, son de una longitud menor que los de la parte posterior. Este tipo de montaje permite la regulación en altura de la zona de carga, lo cual favorece el avance del producto dentro del tambor de centrifugado.

Sistema de giro

Está constituido por ocho poleas acanaladas de nylon de 120 mm de diámetro y 30 mm de grosor con canal de 18 mm. También está compuesto por dos guías de acero inoxidable de 18 mm que forman una circunferencia de 544 mm de diámetro interno; cada uno de ellos tiene soldado en su interior una circunferencia de 532 mm de diámetro interno hecha de platina de acero inoxidable. Cada conjunto guía–platina está instalado en el canal de las poleas.

Tambor

Se trata de una chapa con perforaciones de 10 mm de diámetro de acero inoxidable de dimensiones 2000 mm × 1000 mm × 1 mm. Esta chapa está curvada formando un cilindro de 530 mm de diámetro interno. El cilindro va soldado en el interior del conjunto redondo–platina.

Motor

Se trata de un motor eléctrico de inducción con rotor en cortocircuito de cuatro polos que genera una potencia de 1.5 CV, que trabajan a una frecuencia normal de línea de 50 Hz, 1380 rpm. En el eje de giro lleva instalada una polea de doble canal de 80 mm de diámetro. La alimentación eléctrica del motor se realiza a través de un aparato electrónico de variación de frecuencia, lo que permite seleccionar la frecuencia de alimentación del motor y así variar la velocidad de giro del eje del motor.

3.2.4.2. Funcionamiento

Inicialmente, se ajusta la frecuencia deseada, después se coloca dentro del tambor la muestra y se acciona el variador, lo que hace que se ponga en marcha el motor. Transcurrido el tiempo necesario se procede a retirar el producto.

3.2.5. Equipo de envasado

3.2.5.1. Descripción

Se trata de una envasadora a vacío *Tecnotrip* modelo EVT-7-CD (Figura 24). Tiene unas dimensiones externas de 490 mm × 555 mm × 400 mm, las dimensiones de la cámara de envasado son 416 mm × 426 mm × 180 mm. Consta de una bomba de vacío con una potencia de 0.75 kW.



Figura 24. Equipo de envasado

3.2.5.2. Funcionamiento

Inicialmente se elige el programa deseado. Se colocan una o dos bolsas en la cámara de vacío evitando, en lo posible, la formación de pliegues en la bolsa. A continuación se cierra la tapa y la máquina se pone automáticamente en funcionamiento, procediendo a la extracción del aire de la bolsa y posterior sellado hermético. Una vez finalizado el proceso la tapa se abre de manera automática; de este modo, el equipo está listo para comenzar de nuevo el proceso.

3.3. DETERMINACIONES ANALÍTICAS

Se analizan grelos (*Brassica rapa*, L.) en estado fresco y tras el escaldado y/o cocción, y a lo largo del tiempo de almacenamiento en congelación. Para las muestras congeladas, un día antes de los análisis, las bolsas se retiran de la cámara de congelación a -20 °C y se introducen en un frigorífico a 4 °C, durante toda la noche. Las muestras liofilizadas, se obtienen tras la determinación de la humedad, se homogenizan completamente y se conservan en un arcón a -20 °C, hasta su utilización.

3.3.1. Determinaciones de actividad enzimática

Estas determinaciones se realizan solamente en las muestras tras el escaldado.

3.3.1.1. Determinación de la actividad de la peroxidasa

Principio

La ausencia de actividad de la peroxidasa (POD) es una indicación aceptada de que las frutas y hortalizas han sido debidamente escaldadas antes de la congelación. La prueba de la actividad de la peroxidasa se basa en la capacidad de la enzima de oxidar el guayacol, que toma un color pardo en presencia del peróxido de hidrógeno.

a). Determinación cualitativa

Referencia: Board (1989).

Material y aparatos

- Balanza analítica, *Adam Equipment* modelo ADP 3100/L.
- Material de vidrio de uso en laboratorio.
- Mortero de porcelana.

Reactivos

- Arena de mar, *Panreac* Cód. 211160.1214.
- Guayacol extrapuro, *Merck* Cód. 1.04212.
- Peróxido de hidrógeno al 30 % p/v, *Panreac* Cód. 141076.1211.
- Solución de guayacol al 0.5 %, en etanol al 50 %.
- Solución de peróxido de hidrógeno (2.8 mL de peróxido de hidrógeno al 30 %, por litro). Conservar en una botella oscura, en refrigerador, por una semana como máximo.

Procedimiento

Se maceran aproximadamente 10 g de tejido, añadiendo agua destilada y arena limpia, y se filtra la mezcla. Se transfieren 2 mL del filtrado a un tubo de ensayo y se añaden 20 mL de agua destilada. A continuación, se agrega 1 mL de la solución de guayacol al 0.5 %, y sin mezclar, se añade 1 mL de solución de peróxido de hidrógeno recién preparada. Posteriormente, se agita el contenido del tubo y se observa si aparece una coloración parda transcurridos 5 min. Si al cabo de ese tiempo no se observa cambio de color, significa que la peroxidasa ha sido inactivada.

b). Determinación cuantitativa

Referencia: Gökmen y col. (2005).

Material y aparatos

- Balanza electrónica de precisión, *Scaltec* modelo SBA 31.
- Cubetas de cuarzo de 3.5 mL, *Hellma* tipo 100.600-QG 10 mm.
- Espectrofotómetro ultravioleta/visible de doble haz, *Jasco* modelo V-530 con Software Spectra Manager for Windows 95/NT, *Jasco*.
- Gasa.
- Material de vidrio de uso en laboratorio.
- Tubos de policarbonato, *Kontron* modelo 909190236.
- Ultracentrífuga, *Centrikon* modelo T-2070 con rotor TFT 70.38-906590027.

- Vortex, *Velp Scientifica*.

Reactivos:

- Agua Milli-Q, obtenida de un sistema purificador de agua, *Millipore Milli-Q plus*.
- Guayacol extrapuro, *Merck* Cód. 1.04212.
- Peróxido de hidrógeno al 30 % p/v, *Panreac* Cód. 141076.1211.
- Sodio di-hidrógeno fosfato anhidro (NaH_2PO_4), *Panreac* Cód. 122018.1210.
- di-Sodio hidrógeno fosfato anhidro (Na_2HPO_4), *Panreac* Cód. 131679.1210.
- Solución de guayacol al 0.5 %, se diluye en una solución tampón de fosfato de sodio 0.1 M pH 6.5.
- Solución de peróxido de hidrógeno al 0.5 %, se diluye en una solución tampón de fosfato de sodio 0.1 M pH 6.5.
- Solución de di-sodio hidrógeno fosfato anhidro (Na_2HPO_4) 0.2 M.
- Solución de sodio di-hidrógeno fosfato anhidro (NaH_2PO_4) 0.2 M.
- Solución tampón de fosfato de sodio 0.1 M pH 6.5.

Procedimiento

1) Preparación del extracto enzimático crudo.

La determinación de la actividad de peroxidasa se realizó siguiendo el protocolo indicado por Gökmen y col. (2005). Para la preparación del extracto enzimático se pesa una cantidad de grelo liofilizado equivalente a 10 g de materia fresca y se le adicionan 50 mL de agua Milli-Q mantenida a 4 °C. Se mezcla en el Vortex durante 2 min y se filtra a través de dos capas de gasa. El filtrado se centrifuga a 17700 rpm durante 20 min a 4 °C. El sobrenadante se recupera y se conserva en refrigeración hasta su utilización.

2) Ensayo de peroxidasa.

La solución sustrato se prepara mezclando 2 mL de una solución de guayacol al 0.5 % y 2 mL de una solución de peróxido de hidrógeno al 0.5 %. Se deja en reposo unos min. Se transfieren 2.9 mL de la solución sustrato a la cubeta de cuarzo y la reacción se

inicia al añadirle 0.1 mL del extracto enzimático. La reacción se analiza espectrofotométricamente a 420 nm durante 20 min. La solución blanco se prepara al mezclar 2.9 mL de la solución sustrato con 0.1 mL de agua Milli-Q.

3) Cálculos:

1 Unidad de Actividad de POD = incremento en la absorbancia de 0.001 a 420 nm por min por mg de proteína, bajo las condiciones de ensayo.

3.3.1.2. Determinación de la actividad de la lipoxigenasa

Referencia: Gökmen y col. (2005).

Principio

La actividad de la lipoxigenasa (LOX), se basa en la absorción a 234 nm de los dienos conjugados que se forman cuando el ácido linoleico, el cual se usa como sustrato, es oxidado por la enzima.

Material y aparatos

- Bala de aire sintético, *Carbueros metálicos*.
- Balanza analítica, *Adam Equipment* modelo ADP 3100/L.
- Balanza electrónica de precisión, *Scaltec* modelo SBA 31.
- Baño de agua termostatzado, *Selecta* modelo Tectron 200.
- Cronómetro, *Scharlau*.
- Cubetas de cuarzo de 3.5 mL, *Hellma* tipo 100.600-QG 10 mm.
- Gasa.
- Espectrofotómetro ultravioleta/visible de doble haz, *Jasco* modelo V-530 con Software Spectra Manager for Windows 95/NT, *Jasco*.
- Material de vidrio de uso en laboratorio.
- Tubos de policarbonato, *Kontron* modelo 909190236.

- Ultracentrífuga, *Centrikon* modelo T-2070 con rotor TFT 70.38-906590027.
- Vortex, *Velp Scientifica*.

Reactivos:

- Ácido linoleico mínimo 99 %, *Sigma* Cód. L-1376.
- Agua Milli-Q, obtenida de un sistema purificador de agua, *Millipore* Milli-Q plus.
- Hidróxido de sodio, *Panreac* Cód. 141687.1214.
- Sodio di-hidrógeno fosfato anhidro (NaH_2PO_4), *Panreac* Cód. 122018.1210.
- di-Sodio hidrógeno fosfato anhidro (Na_2HPO_4), *Panreac* Cód. 131679.1210.
- Tween-20, *Sigma* Cód. P1379.
- Solución de hidróxido de sodio 0.1 N.
- Solución de hidróxido de sodio 1 N.
- Solución de di-sodio hidrógeno fosfato anhidro (Na_2HPO_4) 1/15 M.
- Solución de sodio di-hidrógeno fosfato anhidro (NaH_2PO_4) 1/15 M.
- Solución tampón de fosfato de sodio 1/15 M pH 6.0.

Procedimiento

1) Preparación del extracto enzimático crudo.

La determinación de la actividad de la lipoxigenasa se realizó siguiendo el protocolo indicado por Gökmen y col. (2005). La preparación del extracto enzimático se efectúa de la misma forma que para la determinación de peroxidasa.

2) Ensayo de lipoxigenasa.

La solución sustrato se prepara mezclando 157.2 μL de ácido linoleico puro, 157 μL de Tween-20 y 10 mL de agua Milli-Q. Ésta se clarifica al añadir 1 mL de una solución de NaOH 1 N y se diluye con una solución de tampón de fosfato de sodio 1/15 M pH 6.0 hasta un volumen final de 200 mL. Posteriormente, se miden 29 mL de la solución sustrato y se transfieren a un matraz volumétrico que se coloca en un baño de agua termostatzado a 30 °C. La solución sustrato se airea con una suave corriente de aire

sintético durante 2 min y la reacción se inicia al adicionar 1 mL de extracto enzimático crudo a la misma. A intervalos de tiempo de 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0 y 5.0 min se retiran alícuotas de 1 mL del medio de reacción y se transfieren a tubos de vidrio que contienen 4 mL de una solución de NaOH 0.1 N. El uso de esta solución detiene la reacción enzimática y asegura la claridad óptica, al formarse una sal de sodio del ácido linoleico sin reaccionar, antes de realizar la respectiva lectura de absorbancia. La formación de hidroperóxidos se analiza espectrofotométricamente a 234 nm debido a la formación de una cadena hidroperoxidieno conjugada. La solución blanco se prepara al mezclar 1 mL de la solución sustrato con 4 mL de la solución de NaOH 0.1 N.

3) Cálculos:

1 Unidad de Actividad de LOX = incremento en la absorbancia de 0.001 a 234 nm por min por mg de proteína, bajo las condiciones de ensayo.

3.3.2. Determinaciones físico-químicas

3.3.2.1. Determinación de actividad de agua

Referencia: AOAC: 978.18 (2002).

Principio

La actividad de agua (a_w) se define como la relación existente entre la presión de vapor del agua en un producto y la presión de vapor del agua pura, a la misma temperatura. La a_w es numéricamente equivalente a 1/100 de humedad relativa (HR) generada por un producto en un sistema cerrado. La HR puede ser calculada a partir de la medición directa de la presión de vapor parcial o punto de rocío, o medido indirectamente por sensores, cuyas características físicas o eléctricas son alteradas por la HR a la cual son expuestos.

Material y aparatos

- Cubetas de plástico de 4 cm de diámetro.
- Picadora, *Moulinex* modelo D56.
- Sistema medidor de a_w , *Aqua Lab* modelo CX-2.

Procedimiento

Con el fin de estabilizar el equipo, éste se enciende 15-30 min antes de su uso. Posteriormente, se introduce la muestra homogenizada en la cubeta de plástico con ayuda de una espátula hasta lograr una capa uniforme que cubra el fondo, sin sobrepasar la mitad de su altura. La cubeta con la muestra se introduce en la cámara de medida y se espera a que el equipo proporcione los valores de a_w y temperatura.

3.3.2.2. Determinación de humedad

Referencias: Board (1989) y AOAC: 930.15 (2002).

Principio

La humedad se determina mediante la liofilización, que consiste en la eliminación del agua tras su congelación y posterior sublimación del hielo formado

Material y aparatos

- Balanza analítica, *Adam Equipment* modelo ADP 3100/L.
- Equipo de liofilización freeze dry/sell freeze system, *Labconco* modelo 77535-01 con bomba de vacío RV5, *Bo Edwards*.
- Recipientes de plástico.

Procedimiento

Una vez homogenizada la muestra, se coloca en recipientes de plástico previamente tarados (P_1) y se pesan (P_2), realizando a continuación el proceso de liofilización. Una vez finalizado el mismo, se pesan de nuevo los recipientes conteniendo la muestra liofilizada

(P₃). Por diferencia de peso, antes y después de la liofilización, se determina el porcentaje de pérdida de agua.

Cálculos

$$\%HUMEDAD = \frac{P_2 - P_3}{P_2 - P_1} \times 100$$

Siendo:

P_1 = Peso en g del recipiente vacío.

P_2 = Peso en g del recipiente con la muestra fresca.

P_3 = Peso en g del recipiente con la muestra liofilizada.

Las muestras liofilizadas son conservadas en un arcón a -20 °C, para ser utilizadas en las determinaciones correspondientes.

3.3.2.3. Determinación de pH

Referencia: AOAC: 981.12 (2002).

Principio

El pH se define como la medida de la actividad de los iones hidrógeno. Este puede ser medido determinando el potencial eléctrico entre un electrodo de vidrio y su referencia, usando un aparato comercial estandarizado calibrado con patrones primarios de pH.

Aparatos

- Agitador termomagnético, *Velp Scientifica*.
- Balanza electrónica de precisión, *Scaltec* modelo SBA 31.
- Electrodo de pH, *Crison* modelo 52-02.
- Material de vidrio de uso en laboratorio.
- Medidor automático de pH, *Crison* modelo GLP 21.

Reactivos

- Disolución tampón pH 7.00 a 25 °C, *Crison* Cód. 23-111-02.
- Disolución tampón pH 4.01 a 25 °C, *Crison* Cód.23-112.02.

Procedimiento

Previamente, se calibra el medidor automático de pH con dos soluciones tampón de pH 7.00 y pH 4.01. A continuación, se pesa aproximadamente una cantidad de muestra liofilizada equivalente a 10 g de muestra fresca, y se mezcla durante 5 min con 100 mL de agua desionizada, hasta obtener una disolución uniforme. Posteriormente, se sumergen los electrodos del medidor de pH en la misma y se realiza directamente la lectura.

3.3.2.4. Determinación de acidez titulable

Referencias: Board (1989) y AOAC: 942.15 (2002).

Principio

La concentración de ácidos orgánicos, como los ácidos acético, cítrico, láctico y málico, se estima mediante la titulación de una muestra de alimento con hidróxido de sodio a un punto final de pH 8.1.

Material y aparatos

- Agitador termomagnético, *Velp Scientifica*.
- Balanza electrónica de precisión, *Scaltec* modelo SBA 31.
- Bureta de 10 mL, *Pyrex*.
- Electrodo de pH, *Crison* modelo 52-02.
- Material de vidrio de uso en laboratorio.
- Medidor automático de pH, *Crison* modelo GLP 21.

Reactivos

- Agua Milli-Q, obtenida de un sistema purificador de agua *Millipore* Milli-Q plus.
- Hidróxido de sodio, *Panreac* Cód. 141687.1214.
- Solución de hidróxido de sodio 0.1 N, de factor conocido.

Procedimiento

Se pesa una cantidad de muestra liofilizada equivalente a 10 g de muestra fresca, y se mezcla durante 5 min con 100 mL de agua desionizada, hasta obtener una disolución uniforme. Se determina el pH de esta solución y posteriormente se titula con hidróxido de sodio 0.1 N hasta llegar a pH 8.1. Se selecciona el ácido málico para expresar el resultado, ya que es el que se encuentra en mayor cantidad en el grelo.

Cálculos

$$\text{ACIDEZ TOTAL (\% ácido málico)} = \frac{N \times f \times V \times F}{P} \times 100$$

Siendo:

N = normalidad del NaOH.

f = factor del NaOH.

V = volumen de NaOH consumidos en la valoración.

F = factor de conversión del ácido málico: 0.067

P = peso en g de la muestra.

3.3.2.5. Determinación de vitamina B₁ (tiamina) y vitamina B₂ (riboflavina)

Referencias: Sims y Shoemaker (1993); Sánchez-Machado y col. (2004).

Principio

Se basa en determinar la concentración de la vitamina B₁ y vitamina B₂ mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en fase reversa con detector de fluorescencia.

Material y aparatos

- Balanza analítica, *Adam Equipment* modelo ADP 3100/L.
- Balanza electrónica de precisión, *Scaltec* modelo SBA 31.
- Baño de agua termostatzado, *Selecta* modelo Tectron 200.
- Columna Kromasil 100 C18, de *Teknokroma*, con dimensiones de 250 mm × 4.6 mm, empacada con partículas de 5 µm.
- Precolumna Tracer ODS, *Teknokroma*, con dimensiones de 10 mm × 4.6 mm, empacada con partículas de 5 µm. (Cód. TR-C-160-1).
- Cromatógrafo líquido de alta resolución, que consta de:
 - * Bomba para HPLC, *Jasco* modelo PU-2080 Plus.
 - * Detector ultravioleta-visible, *Jasco* modelo UV-2075 Plus.
 - * Detector de fluorescencia, *Jasco* modelo FP-2020 Plus.
 - * Horno de columna, *Gecko* modelo 2000.
 - * Inyector manual, *Rheodyne* con bucle de inyección de 20 µL.
 - * Software HSS-2000 control Server, *Jasco* version 3.5.2.
 - * Software Borwin Chromatography, *Jasco* versión 1.50.
 - * Unidad de gradiente ternaria (mezclador), *Jasco* modelo LG-2080-02.
 - * Unidad LC-Net II/ADC, *Jasco*.
- Desgasificador de helio, *Carburos metálicos*.
- Estufa de laboratorio termostatzada, *Indelab*.
- Filtros de jeringa de nylon de 0.2 µm, *Waters*.
- Fluorímetro, *Perkin Elmer* modelo LS 50.
- Jeringa de 50 µL, *SGE*.
- Material de vidrio de uso en laboratorio.
- Papel filtro, *Albet* 135.

Reactivos

- Acetato de amonio, *Merck* Cód. 1.01116.0500.
- Acetato de sodio anhidro, *Panreac* Cód. 131633.
- Ácido acético glacial, *Panreac* Cód. 131008.

- Ácido clorhídrico fumante al 37 %, *Merck* Cód. 1.00317.1000.
- Agua Milli-Q, obtenida de un sistema purificador de agua, *Millipore* Milli-Q plus.
- Claradiastasa de *Aspergillus oryzae*, *Fluka* Cód. 86959.
- Etanol absoluto, *Panreac* Cód. 141086.1212.
- Hexacianoferrato de potasio (III), *Aldrich* Cód. 24, 402-3.
- Hidrocloruro de tiamina (vitamina B₁), *Sigma* Cód. T-4625.
- Hidróxido de sodio, *Panreac* Cód. 141687.1214.
- Metanol grado HPLC, *Merck* Cód. 1.06018.2500.
- Riboflavina (vitamina B₂), *Sigma* Cód. R-4500.
- Solución de acetato de amonio 0.005 M.
- Solución de acetato de sodio 2.5 M.
- Solución de ácido acético 0.02 N.
- Solución de ácido clorhídrico 0.1 N.
- Solución de ácido clorhídrico 3.75 N.
- Solución de claradiastasa al 1 %, se diluye en agua Milli-Q.
- Solución de etanol al 20 %.
- Solución de hexacianoferrato de potasio (III) al 1 %, se diluye en hidróxido de sodio al 15 %.
- Solución de hidróxido de sodio al 15 %.
- Solución patrón de hidrocloruro de tiamina, se diluye en etanol al 20 %.
- Solución patrón de riboflavina, se diluye en ácido acético 0.02 N.

Condiciones de trabajo

- **Fase móvil:** mezcla de acetato de amonio 0.005 M, (tamponada a pH 6.0) y metanol, con relación 72:28 (v/v).
- **Flujo de trabajo:** 0.8 mL/min.
- **Modo:** isocrático.
- **Longitud de onda de detección (excitación/ emisión):** vitamina B₁ (370/435) y vitamina B₂ (370/520).

- **Temperatura del horno:** 35 °C.

Preparación de patrones

Para la tiamina se prepara una solución madre de concentración conocida que se diluye en etanol al 20 %, pH 3.5-4.3 (Sims y Shoemaker, 1993; Hägg, 1994). Esta solución se protege de la luz y se almacena a 4 °C. A partir de la misma, se toman los volúmenes necesarios para establecer una escala, de tal forma que las concentraciones de tiamina en las muestras se encuentren en el rango de la escala establecida. Una alícuota de cada patrón (1 mL) se trata como una muestra para transformar la tiamina en tiocromo. Para la recta de calibración, las áreas que se obtienen de cada patrón se representan contra su concentración respectiva.

Para la riboflavina, se prepara una solución madre de concentración conocida que se diluye en ácido acético 0.02 N (Sims y Shoemaker, 1993). De igual forma que para la tiamina, esta solución se protege de la luz y se almacena a 4 °C. A partir de la misma, se toman los volúmenes necesarios para establecer una escala, de tal forma que las concentraciones de riboflavina en las muestras se encuentren en el rango de la escala establecida. Una alícuota de cada concentración se inyecta en el cromatógrafo, y las áreas obtenidas se representan contra las concentraciones respectivas, para obtener la recta de calibración.

Procedimiento

Las vitaminas se extrajeron siguiendo el protocolo indicado por Sánchez-Machado y col. (2004), pero con algunas modificaciones derivadas de la puesta a punto de este método. Para la extracción de las dos vitaminas, se pesan aproximadamente 0.0040 g de muestra liofilizada, finamente molida (que contenga alrededor de 0.0755 y 0.152 µg/mL de vitaminas B₁ y B₂, respectivamente), se coloca en un frasco de vidrio protegido de la luz, e inmediatamente antes de la extracción, se añaden 15 mL de HCl 0.1 N y se lleva a un baño de agua a 100 °C durante 30 min. Posteriormente, se enfría a temperatura ambiente y se ajusta el pH a 4.4.-4.5 con acetato de sodio 2.5 M. A continuación, se añaden 10 mg de claradiastasa y se incuba en una estufa a 50 °C durante 3 h. La solución

obtenida se filtra a través de papel filtro *Albet* 135 (Valls y col., 1999a) y el filtrado se lleva a un matraz aforado de 25 mL y se enrasa con agua Milli-Q. En caso necesario, esta solución se puede mantener a temperatura de refrigeración hasta el día siguiente.

El análisis de la riboflavina se realiza directamente debido a que esta vitamina fluoresce de forma natural. Una alícuota de la solución anterior se pasa a través de un filtro de nylon de 0.2 μm (*Waters*) y se inyecta en el HPLC.

Para la derivatización de la tiamina, se toman 2.5 mL de la solución anterior, se le agregan 1.25 mL de la solución de hexacianoferrato de potasio (*III*) al 1 % (preparado en solución de hidróxido de sodio al 15 %) (AOAC, 2002), se mezcla en Vortex durante 5 s y se deja en reposo durante 1 min para su oxidación. Posteriormente, se añaden 250 μL de HCl 3.75 N, para detener la reacción, y se mezcla nuevamente en el Vortex.

Previo a su inyección, la muestra se somete a extracción en fase sólida y se usa un cartucho Sep-Pak Vac 1 mL (100 mg) C_{18} (*Waters*). La activación del mismo se lleva a cabo pasando 2 mL de metanol, seguido de 2 mL de acetato de amonio 0.005 M. A continuación, se hacen pasar 2 mL del extracto oxidado. El cartucho se enjuaga con 2 mL de una solución que contiene acetato de amonio 0.005 M y metanol (95:5), para eliminar las sustancias que puedan interferir con el análisis. Las vitaminas se eluyen con 2 mL de otra solución que contiene acetato de amonio 0.005 M y metanol (60:40). El eluato obtenido se pasa a través de un filtro de nylon de 0.2 μm (*Waters*).

3.3.2.6. Determinación de vitamina C (ácido ascórbico y ácido dehidroascórbico)

Referencia: Gökmen y col (2000); Gökmen y col (2005); López y col. (2005).

Principio

Se basa en determinar la concentración de ácido ascórbico y ácido ascórbico total mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en fase reversa y con detector ultravioleta-visible.

Material y aparatos

- Balanza electrónica de precisión, *Scaltec* modelo SBA 31.
- Columna Spherisorb ODS2, *Waters*, con dimensiones de 250 mm × 4.6 mm, empacada con partículas de 5 µm.
- Precolumna Spherisorb ODS2, *Waters*, con dimensiones 10 mm × 4.6 mm, empacada con partículas de 5 µm.
- Cromatógrafo líquido de alta resolución, que consta de:
 - * Bomba para HPLC, *Jasco* modelo PU-2080 Plus.
 - * Detector ultravioleta-visible, *Jasco* modelo UV-2075 Plus.
 - * Inyector manual, *Rheodyne* con bucle de inyección de 20 µL.
 - * Software HSS-2000 control Server, *Jasco* version 3.5.2.
 - * Software Borwin Chromatography, *Jasco* versión 1.50.
 - * Unidad de gradiente ternaria (mezclador), *Jasco* modelo LG-2080-02.
 - * Unidad LC-Net II/ADC, *Jasco*.
- Desgasificador de helio, *Carbueros metálicos*.
- Espectrofotómetro ultravioleta/visible de doble haz, *Jasco* modelo V-530 con Software Spectra Manager for Windows 95/NT, *Jasco*.
- Filtros de jeringa de nylon de 0.2 µm, *Waters*.
- Jeringa de 50 µL, *SGE*.
- Material de vidrio de uso en laboratorio.
- Microcubetas de poliestireno de 2.5 mL, *dispolab Kartell*.
- Papel filtro, *Albet* 135.
- Picadora, *Moulinex* modelo D56.

Reactivos

- Ácido L-(+)-ascórbico, *Panreac* Cód. 131013.1209.
- Ácido metafosfórico, *Merck* Cód. 1.00546.05000.
- Ácido ortofosfórico al 85 %, *Scharlau* Cód. AC1100.
- Agua Milli-Q, obtenida de un sistema purificador de agua, *Millipore* Milli-Q plus.

- Ditioneitol (DTT), *Sigma*, Cód. D9163.
- Potasio di-hidrógeno fosfato (KH_2PO_4), *Panreac*, Cód. 131509.1210.
- di-Potasio hidrógeno fosfato anhidro (K_2HPO_4), *Panreac*, Cód. 131512.1209.
- Sodio di-hidrógeno fosfato anhidro (NaH_2PO_4), *Panreac*, Cód. 122018.1210.
- di-Sodio hidrógeno fosfato anhidro (Na_2HPO_4), *Panreac*, Cód. 131679.1210.
- Solución de ácido metafosfórico al 5 %.
- Solución de ácido ortofosfórico 2 M.
- Solución de di-potasio hidrógeno fosfato anhidro (K_2HPO_4) al 45 %.
- Solución de di-sodio hidrógeno fosfato anhidro (Na_2HPO_4) 0.2 M.
- Solución de ditioneitol (DTT) al 2 %, se diluye en un tampón fosfato de sodio 0.2 M pH 7.
- Solución de potasio di-hidrógeno fosfato (KH_2PO_4) 0.2 M, tamponada a pH 2.4 con ácido ortofosfórico al 85 %.
- Solución de sodio di-hidrógeno fosfato anhidro (NaH_2PO_4) 0.2 M.
- Solución patrón de ácido L-(+)-ascórbico, se diluye en ácido metafosfórico al 5 %.
- Solución tampón de fosfato de sodio 0.2 M, pH 7.

Condiciones de trabajo

- **Fase móvil:** solución de fosfato de potasio dibásico (KH_2PO_4) 0.2 M, (tamponada a pH 2.4).
- **Flujo de trabajo:** 0.8 mL/min.
- **Modo:** isocrático.
- **Longitud de onda de detección:** 254 nm.
- **Temperatura del horno:** ambiente.

Preparación de patrones

Se prepara una solución madre de ácido ascórbico de concentración conocida, la cual se protege de la luz y se almacena a 4 °C. A partir de la misma, se toman los volúmenes necesarios para establecer una escala, de tal forma que las concentraciones de ácido

ascórbico en las muestras se encuentren en el rango de la escala establecida. Una alícuota de cada concentración se inyecta en el cromatógrafo, y las áreas obtenidas se representan contra las concentraciones respectivas, para obtener una recta de calibración.

Procedimiento

Para la determinación del contenido de ácido ascórbico se siguen los protocolos indicados por Gökmen y col (2000) y Gökmen y col (2005), con algunas modificaciones derivadas de la puesta a punto de este método. Se pesan aproximadamente 5 g de grelo, previamente picado y homogenizado, y se le añaden 20 mL de una solución de ácido metafosfórico al 5 %. Se agita durante 5 min y se filtra a través de papel *Albet* N° 135. El filtrado se pasa nuevamente a través de un filtro de nylon de 0.2 μm (*Waters*) y se inyecta en el HPLC.

Para la determinación del ácido ascórbico total (ácido ascórbico + ácido dehidroascórbico) se sigue el procedimiento señalado por López y col. (2005), con algunas modificaciones. 1 mL del filtrado se mezcla con 0.2 mL de una solución de DTT al 0.2 % y 0.1 mL de una solución de *di*-potasio hidrógeno fosfato anhidro al 45 %. Se homogeniza en un Vortex y se mantiene en la oscuridad, a temperatura ambiente, durante 10 min. La reducción se detiene por la adición de 0.2 mL de ácido fosfórico 2 M. La muestra reducida se pasa a través de un filtro de nylon de 0.2 μm (*Waters*) y se inyecta en el HPLC.

3.3.2.7. Determinación de los parámetros de color $\text{CIE}_{L^*a^*b^*}$

Referencia: Artigas y col. (1985).

Principio

Se realizan medidas de color directamente sobre la muestra, con un espectrofotómetro de reflexión, que realiza medidas de reflectancia espectral entre 400 y 770 nm (iluminante D_{65} , observador 10°), en intervalos de 20 nm, proporcionando datos colorimétricos en diversos espacios de color.

Aparatos

- Espectrofotómetro de reflexión, *X-RITE*, modelo 968.

Procedimiento

Previamente a la realización de las medidas, se calibra el espectrofotómetro con un blanco de referencia para lo cual se emplea una placa estándar de cerámica que presenta valores de 94.69 para L^* , -1.19 para a^* y 1.42 para b^* . Posteriormente, se realizan las medidas en el espacio de color $CIE_{L^*a^*b^*}$, en el haz de la hoja del grelo, calculándose la media de los valores obtenidos.

Cálculos

Con las medidas realizadas se obtienen los parámetros L^* o luminosidad (100 % se corresponde con el blanco y 0 % con el negro), a^* (cuando es positivo contribuye al color rojo y cuando es negativo al verde) y b^* (cuando es positivo contribuye al color amarillo y cuando es negativo al azul).

A partir de las coordenadas de cromaticidad L^* , a^* y b^* del espacio de color $CIE_{L^*a^*b^*}$ (Figura 25), se pueden calcular otras magnitudes psicofísicas como la cromaticidad (C^*) y el tono (H°):

$$C^* = \sqrt{(a^*)^2 + (b^*)^2} \quad H^\circ = \arctan\left(\frac{b^*}{a^*}\right)$$

Valores altos de cromaticidad (C^*) indican una alta saturación y valores bajos indican una baja saturación. Los valores del tono (H°) se corresponden con los términos como rojo, verde, amarillo, etc.

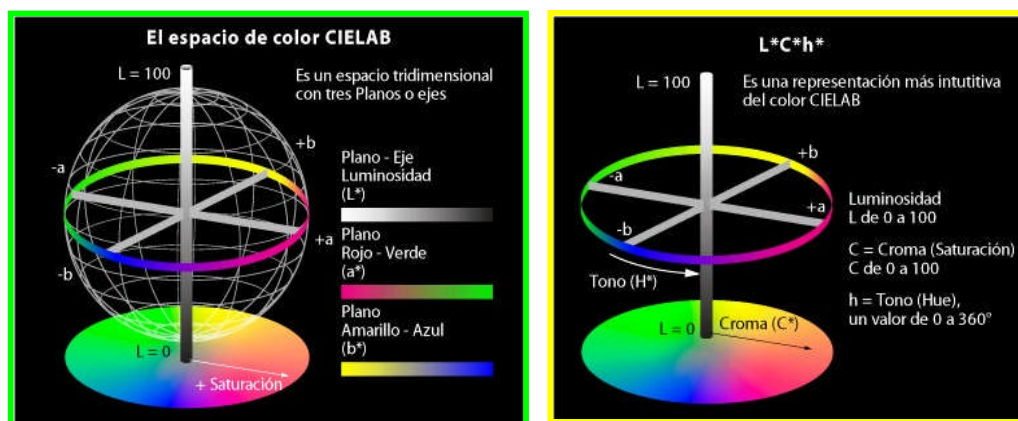


Figura 25. Representación del espacio de color CIE $L^*a^*b^*$

3.3.2.8. Determinación de pigmentos

Referencias: Khachik y col. (1986); López-Hernández y col. (1993); Wright y col. (1997); Cartaxana y Brotas (2003).

Principio

Se basa en determinar la concentración de luteína, β -caroteno, clorofila a, clorofila b, feofitina a y feofitina b mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en fase reversa y con detector diodo array.

Material y aparatos

- Balanza analítica, *Adam Equipment* modelo ADP 3100/L.
- Balanza electrónica de precisión, *Scaltec* modelo SBA 31.
- Columna Sun Fire C_{18} , *Waters*, con dimensiones de 250 mm $\times$ 4.6 mm, empacada con partículas de 5 μ m.
- Precolumna Sun Fire C_{18} , *Waters*, con dimensiones de 20 mm $\times$ 4.6 mm, empacada con partículas de 5 μ m.
- Cromatógrafo líquido de alta resolución, que consta de:
 - * Bomba para HPLC, *Jasco* modelo PU-1580.
 - * Detector de multilongitud de onda UV/VIS (Diodo array), *Jasco* modelo MD-

1515.

- * Horno de columna, *Jetstream Plus* serie 90305-2.
- * Inyector manual, *Rheodyne* con bucle de inyección de 20 μ L.
- * Software Borwin Chromatography, *Jasco* versión 1.50.
- * Software Borwin PDA, *Jasco* versión 1.50.
- * Software HSS-2000 control Server, *Jasco* version 3.5.2.
- * Unidad de gradiente ternario de baja presión (mezclador), *Jasco* modelo LG-1580-02.
- * Unidad LC-Net II/ADC, *Jasco*.
- Cubetas de cuarzo de 3.5 mL, *Hellma* tipo 100.600-QG 10 mm.
- Desgasificador, *Gastorr* modelo 154.
- Espectrofotómetro ultravioleta/visible de doble haz, *Jasco* modelo V-530 con Software Spectra Manager for Windows 95/NT, *Jasco*.
- Filtros de fibra de vidrio, *Albet*.
- Filtros de jeringa de nylon de 0.2 μ m, *Waters*.
- Jeringa de 50 μ L, *SGE*.
- Material de vidrio de uso en laboratorio.
- Rotavapor, *Büchi* modelo RE 111.
- Vortex, *Velp Scientifica*.

Reactivos

- Agua Milli-Q, obtenida de un sistema purificador de agua *Millipore* Milli-Q plus.
- Acetona, grado analítico, *Scharlau* Cód. AC0311.
- Acetonitrilo supragradient, grado HPLC, *Scharlau* Cód. AC0331.
- Ácido clorhídrico fumante al 37 %, *Merck* Cód. 1.00317.1000.
- Carbonato de calcio, *Panreac* Cód. 121212.
- β -caroteno, *Sigma* Cód. C-9750.
- Clorofila a, *Sigma* Cód. C-5753.
- Clorofila b, *Sigma* Cód. C-5878.
- Cloruro de sodio, *Scharlau* Cód. SO0227.

- 2, 6-Di-ter-butil-4-metilfenol (BHT), *Panreac* Cód. 162825.1209.
- Diclorometano estabilizado con aproximadamente 50 ppm de amileno multisolvent, grado HPLC, *Scharlau* Cód. CL0347.
- Éter de petróleo 40-60 °C, *Panreac* Cód. 141315.1612.
- n-Hexano, grado HPLC, *Merck* Cód. 1.04391.2500.
- Metanol, grado analítico, *Scharlau* Cód. ME0316.
- Metanol grado HPLC, *Merck* Cód. 1.06018.2500.
- Sulfato de sodio anhidro, *Panreac* Cód. 131716.
- Xantofila (luteína; α -caroteno-3-3'-diol), *Sigma* Cód. X-6250.
- Solución de ácido clorhídrico, 0.1 N.
- Solución de cloruro de sodio al 10 %.
- Solución de éter de petróleo 40-60 °C, con 0.1 % de BHT.
- Solución de metanol, grado analítico, con 1 % de BHT.
- Solución patrón de β -caroteno, se diluye en acetona.
- Solución patrón de clorofila a, se diluye en acetona.
- Solución patrón de clorofila b, se diluye en acetona.
- Solución patrón de feofitina a. Se prepara a partir de una solución patrón de clorofila a, a la cual se añaden 3 gotas de HCl 0.1 N, y se mantiene en la oscuridad durante 15 min.
- Solución patrón de feofitina b. Se prepara a partir de una solución patrón de clorofila b, a la cual se añaden 3 gotas de HCl 0.1 N, y se mantiene en la oscuridad durante 15 min.
- Solución patrón de luteína, se diluye en acetona.

Condiciones de trabajo

- **Fase móvil:** mezcla inicial isocrática de acetonitrilo (75 %), metanol (15 %) y diclorometano/hexano (1:1) (10 %)
- **Flujo de trabajo:** 0.8 y 1.5 mL/min.
- **Modo:** gradiente^a.

- **Longitud de onda de detección:**

- * *Luteína*: 450 nm

- * *B-caroteno*: 450 nm

- * *Clorofila a*: 430 nm

- * *Clorofila b*: 460nm

- * *Feofitina a*: 405 nm

- * *Feofitina b*: 432 nm

- **Temperatura del horno:** 25 °C.

^aLa fase móvil se compone de una mezcla isocrática de acetonitrilo (75 %), metanol (15 %) y diclorometano/hexano (1:1) (10 %) que se mantiene durante 9 min, seguida por un gradiente que termina a los 16 min con una composición final de acetonitrilo (40 %), metanol (15 %) y diclorometano/hexano (45 %), manteniéndose dicha proporción hasta los 24 min. Se usa un flujo constante de 0.8 mL/min. Al finalizar la separación, la columna es reequilibrada con la mezcla inicial isocrática, se aumenta el flujo a 1.5 mL/min en un gradiente que dura 1 min y se mantiene en esas condiciones hasta los 35 min, posteriormente el flujo cambia a 0.8 mL/min en un gradiente que termina a los 38 min y se mantiene con este flujo durante otros 2 min. La separación de los compuestos se logra en un tiempo de 22 min. La absorción visible de los mismos se mide a las longitudes de onda óptimas, seleccionadas en función de los máximos de absorbancia de los espectros registrados de cada componente.

Preparación de patrones

Se prepara una solución madre de pigmentos en 10 mL de acetona (López-Hernández y col. (1993). De aquí se toman las porciones necesarias para establecer una escala, de tal forma que las concentraciones de los pigmentos en la muestra queden en el rango de la escala establecida. La acetona se evapora bajo corriente de nitrógeno y se redisuelven las porciones en hexano, para luego ser inyectadas en el cromatógrafo.

Procedimiento

Los pigmentos se extrajeron tomando en cuenta las indicaciones dadas por Wright y col. (1997) y Cartaxana y Brotas (2003), pero con algunas modificaciones derivadas de la puesta a punto de este método. Todo el procedimiento se realiza con luz tenue.

Para la extracción de los pigmentos, se pesan 0.25 g de muestra liofilizada y finamente molida, se le agrega la misma cantidad de carbonato de calcio y se homogeniza completamente en un mortero. Dicha mezcla se transfiere a una probeta, se le añaden 10 mL de metanol (mantenido a 4 °C y recién adicionado con 1 % de BHT) y se lleva a un baño de ultrasonidos con agua fría, durante 10 min. Posteriormente se filtra al vacío con filtro de fibra de vidrio. La extracción se repite una vez más. El filtrado se lleva a un matraz aforado de 50 mL y se enrasa con el metanol, antes mencionado.

Se toman 10 mL de la solución anterior y se llevan a un embudo de decantación, se le añaden 10 mL de éter de petróleo con 0.1 % de BHT, se agita cuidadosamente y enseguida, resbalando por las paredes del embudo, se agregan 10 mL de cloruro de sodio al 10 % (Khachik y col., 1986). Nuevamente se agita y se deja en reposo para que los pigmentos de la fase metanólica se transfieran a la fase etérea. Se desecha la capa inferior (metanólica) y se recupera la capa superior (etérea). A ésta se le agrega un 2 % de sulfato de sodio anhidro. La fase etérea, libre de agua, se evapora a temperatura ambiente en un rotavapor giratorio con corriente de nitrógeno. El extracto se disuelve en 2 mL de hexano y posteriormente se pasa a través de un filtro de nylon de 0.2 µm (Waters) y se inyecta en el HPLC.

3.3.2.9. Determinación de cenizas

Referencia: AOAC: 942.05 (2002).

Principio

Se determina mediante calcinación de la muestra en una mufla a 600 °C.

Material y aparatos

- Balanza electrónica de precisión, *Scaltec* modelo SBA 31.
- Cápsulas de porcelana.
- Desecador, *Simax*.
- Horno eléctrico de Mufla, *Hobersal* modelo HD-230.
- Picadora, *Moulinex* modelo D56.

Procedimiento

Previamente se calcinan las cápsulas en la mufla a 600 °C durante 12 h, se introducen en el desecador hasta que alcanzan la temperatura ambiente y se pesan (P_1). A continuación, se trituran los grelos hasta obtener una muestra homogénea, se introducen en las cápsulas aproximadamente 2 g de muestra y se pesan de nuevo (P_2). Se introducen en la mufla a 600 °C durante 12 h. Transcurrido dicho tiempo se llevan las cápsulas a un desecador hasta que alcancen la temperatura ambiente y se pesan (P_3).

Cálculos

$$\% \text{ CENIZAS} = \frac{P_3 - P_1}{P_2 - P_1} \times 100$$

Siendo:

P_1 = Peso en g de la cápsula vacía.

P_2 = Peso en g de la cápsula con la muestra fresca.

P_3 = Peso en g de la cápsula con la muestra calcinada.

3.3.2.10. Determinación de proteína

Referencia: AOAC: 955.04 (2002).

Principio

El contenido de proteína se determina por el método de Kjeldahl, el cual se basa en el supuesto de que la proporción de nitrógeno no proteínico en un producto alimenticio es demasiado pequeña para ser significativa, y que una determinación del nitrógeno total

(con exclusión del presente en los nitratos y nitritos, que no los determina) refleja con suficiente precisión la riqueza en proteína.

Material y aparatos

- Balanza analítica, *Mettler* modelo AE 2005 N° 82929.
- Destilador, *Buchi*.
- Digestor con capacidad para 6 tubos, *Buchi* modelo B-426RD.
- Material de vidrio de uso en laboratorio.
- Perlas de vidrio.
- Tubos Kjeldhal de 350 mL.

Reactivos

- Ácido bórico, *Probus* Cód. 011320.
- Ácido clorhídrico 0.1 N, *Panreac* Cód. 181023.1211.
- Ácido sulfúrico al 96 %, *Panreac* Cod. 131058.
- Agua destilada.
- Azul de metileno, *Panreac* Cód. 251170.1606.
- Catalizador Kjeldahl (Se) tabletas, *Panreac* Cód. 173348.
- Hidróxido de sodio, *Panreac* Cód. 141687.1214.
- Indicador mixto, preparado por disolución de 2 g de rojo de metilo y 1 g de azul de metileno en 1000 mL de agua destilada.
- Rojo de metilo, *Analema* Cód. 13020.
- Solución de ácido bórico al 40 %.
- Solución de hidróxido de sodio al 33 %.

Procedimiento

Se introducen sucesivamente en el tubo Kjeldahl 2 tabletas de catalizador y la cantidad de muestra pesada. Se añaden 25 mL de ácido sulfúrico al 96 %, se mezcla suavemente y se somete a la digestión. Cuando el líquido está transparente, se retira el matraz del equipo y se deja enfriar hasta temperatura ambiente. Se añaden con precaución

100 mL de agua destilada y se disuelve agitando el sulfato potásico que pueda haber cristalizado.

En un matraz erlenmeyer de 250 mL se introducen 25 mL de ácido bórico al 4 % y unas gotas de indicador mixto a fin de que adquiera una coloración violeta. EL matraz se sitúa en el destilador para recoger el destilado. Se coloca el tubo Kjeldahl en el destilador de forma que quede perfectamente ajustado. Se agregan al tubo 100 mL de hidróxido sódico al 33 %. Se destila hasta alcanzar 150 mL de destilado en el matraz erlenmeyer, produciéndose el viraje a color verde. Se retira el matraz y el destilado se valora con ácido clorhídrico 0.1 N hasta la coloración violeta original. Se efectúa una prueba en blanco en cada ensayo sustituyendo la muestra por 5 mL de agua destilada, siguiendo el mismo procedimiento.

Cálculos

$$\% \text{ NITRÓGENO TOTAL} = [(V_m - V_b) \times N \times 1.4]/M$$

Siendo:

V_m = volumen en mL de HCl gastado por la muestra.

V_b = volumen en mL de HCl consumido por el blanco.

N = normalidad del HCl.

M = peso en g de la muestra.

El contenido en proteína (%) se calcula a partir del contenido en nitrógeno total:

$$\% \text{ PROTEÍNA} = N_t \times 6.25$$

Siendo:

N_t = Contenido en nitrógeno total.

3.3.2.11. Determinación de fenoles totales

Referencias: Singleton y Rossi (1965); Slinkard y Singleton (1977); Singleton y col. (1999); Oboh (2005).

Principio

Los fenoles son los responsables de la capacidad de oxigenación en la mayoría de los alimentos derivados de plantas. El análisis de fenoles totales debe incluir la cuantificación de monofenoles y polifenoles oxidados. La determinación se basa en la utilización del reactivo propuesto por Otto Folin y Vintila Ciocalteu, el cual tiene la capacidad de reaccionar, de forma completa y rápida, con sustancias oxidables, desarrollando una coloración azul, cuya intensidad es proporcional a la concentración de dichas sustancias en la muestra. Esta reacción se debe realizar a pH alcalino.

Material y aparatos

- Balanza electrónica de precisión, *Scaltec* modelo SBA 31.
- Cronómetro, *Scharlau*.
- Espectrofotómetro ultravioleta/visible de doble haz, *Jasco* modelo V-530 con Software Spectra Manager for Windows 95/NT, *Jasco*.
- Estufa de laboratorio termostatzada, *Indelab*.
- Material de vidrio de uso en laboratorio.
- Microcubetas de poliestireno de 2.5 mL, *dispolab Kartell*.
- Papel filtro, *Albet 135*.
- Vortex, *Velp Scientifica*.

Reactivos:

- Acetona, grado analítico, *Scharlau* Cód. AC0311.
- Ácido tánico purísimo, *Riedel-deHaën* Cód. 16201.
- Agua Milli-Q, obtenida de un sistema purificador de agua, *Millipore* Milli-Q plus.
- Carbonato de sodio anhidro, *Panreac* Cód. 131648.1210.

- Reactivo Folin-Ciocalteu's phenol 2 N, *Sigma* Cód. F9252.
- Solución de acetona al 70 %.
- Solución de carbonato de sodio 75 g/L.
- Solución del Reactivo Folin-Ciocalteu's phenol 2 N 1/10, se diluye en agua Milli-Q.
- Solución patrón de ácido tánico, se diluye en agua Milli-Q.

Preparación de patrones

Se prepara una solución madre de ácido tánico (se usa como un patrón fenólico) de concentración conocida. A partir de la misma, se toman los volúmenes necesarios para establecer una escala, de tal forma que las concentraciones equivalentes de ácido tánico en las muestras se encuentren en el rango de la escala establecida. Se toman 2 mL de cada concentración, se tratan como una muestra y, posteriormente, se analizan espectrofotométricamente. Las lecturas de absorbancia obtenidas se representan frente a las concentraciones respectivas, para obtener una recta de calibración.

Procedimiento

La determinación de fenoles totales se realizó siguiendo el protocolo indicado por Singleton y Rossi (1965) y Slinkard y Singleton (1977). Para la extracción de los fenoles totales se pesan aproximadamente 0.03 g de muestra liofilizada, finamente molida, y se le agregan 20 mL de acetona al 70 % conservada a 4 °C (Oboh, 2005). Se mezcla en Vortex y se deja en reposo a 4 °C durante toda la noche. La solución obtenida se filtra a través de papel *Albet* 135. Del filtrado anterior, se toman 2 mL y se le adicionan 10 mL de una solución 1/10 de Reactivo Folin-Ciocalteu's phenol 2 N. Se mezcla cuidadosamente en Vortex con el fin de homogenizar los dos componentes. Se deja en reposo durante 3 min y, a continuación, se agregan 8 mL de una solución de carbonato de sodio (75 g/L). Nuevamente se mezcla en Vortex y se lleva a incubar a 25 °C durante 90 min. Finalizado ese tiempo las muestras exhibirán un color azul, cuya absorbancia se mide a 760 nm. Cada lectura se realiza por triplicado.

3.3.2.12. Determinación de actividad reductora

Referencias: Oyaizu (1986); Yang y col (2002); Oboh (2005).

Principio

La actividad reductora de las muestras se determina evaluando la capacidad de las mismas para reducir una solución de FeCl_3 . Una mayor absorbancia indica un mayor poder reductor.

Material y aparatos

- Balanza electrónica de precisión, *Scaltec* modelo SBA 31.
- Espectrofotómetro ultravioleta/visible de doble haz, *Jasco* modelo V-530 con Software Spectra Manager for Windows 95/NT, *Jasco*.
- Estufa de laboratorio termostatzada, *Indelab*.
- Material de vidrio de uso en laboratorio.
- Microcubetas de poliestireno de 2.5 mL, *dispolab Kartell*.
- Tubos de policarbonato, *Kontron* modelo 909190236.
- Ultracentrífuga, *Centrikon* modelo T-2070 con rotor TFT 70.38-906590027.
- Vortex, *Velp Scientifica*.

Reactivos:

- Ácido tricloroacético, *Panreac* Cód. 131067.
- Agua Milli-Q, obtenida de un sistema purificador de agua, *Millipore* Milli-Q plus.
- Cloruro de hierro (III) hexahidrato, *Scharlau* Cód. HI0336.
- Hexacianoferrato de potasio (III), *Aldrich* Cód. 24, 402-3
- Metanol, grado analítico, *Scharlau* Cód. ME0316.
- Sodio di-hidrógeno fosfato anhidro (NaH_2PO_4), *Panreac* Cód. 122018.1210.
- di-Sodio hidrógeno fosfato anhidro (Na_2HPO_4), *Panreac* Cód. 131679.1210.
- Solución de ácido tricloroacético al 10 %.
- Solución de cloruro férrico al 0.1 %.

- Solución de hexacianoferrato de potasio (*III*) al 1 %, se diluye en agua Milli-Q.
- Solución de di-sodio hidrógeno fosfato anhidro (Na_2HPO_4) 0.2 M.
- Solución de sodio di-hidrógeno fosfato anhidro (NaH_2PO_4) 0.2 M.
- Solución tampón de fosfato de sodio 0.2 M pH 6.6.

Procedimiento

La determinación de actividad reductora se realizó siguiendo el protocolo indicado por Oyaizu (1986) y Yang y col. (2002). Se pesan aproximadamente 0.05 g de muestra liofilizada, finamente molida. Se le agregan 20 mL de metanol mantenido a 4 °C (Oboh, 2005), se mezcla en Vortex y se deja en reposo a 4 °C durante toda la noche. De la solución anterior se toman 2.5 mL y se le adicionan 2.5 mL de una solución tampón de fosfato de sodio 0.2 M, pH 6.6 y 2.5 mL de solución de hexacianoferrato de potasio (*III*) al 1 %. Se mezcla cuidadosamente en Vortex y se incuba a 50 °C durante 20 min. Transcurrido ese tiempo, se añaden 2.5 mL de ácido tricloroacético al 10 % y se centrifuga a 6500 rpm durante 10 min a temperatura ambiente. A continuación, se toman 5 mL del sobrenadante, se le añaden 5 mL de agua Milli-Q y 1 mL de cloruro férrico al 0.1 %. Se deja en reposo 10 min. Finalizado ese tiempo las muestras exhibirán un color verde, cuya absorbancia se mide a 700 nm. Cada lectura se realiza por triplicado.

3.3.3. Determinaciones microbiológicas

Material y aparatos

- Autoclave, *Raypa* modelo AE 75 Sterilmatic.
- Balanza granataria, *Sartorius* serie TE1502S.
- Baños de temperatura regulables, *Memmert*.
- Bolsas estériles para homogenizador, *Seward*.
- Cámara frigorífica, *Kide*.
- Campana de flujo laminar, *Telstar* modelo BV-100.
- Homogenizador *Aes* modelo MIX-2.
- Incubadoras, *Memmert*.

- Lámpara luz ultravioleta, *Lournat* modelo Volver.
- Material de vidrio, *Pyrex*.
- Material quirúrgico esterilizable, *Talmed*.
- Mecheros Bunsen
- Medidor de pH, *Crison* modelo MicropH 2000.
- Micropipetas de capacidad variable, *Eppendorf*.
- Papel de filtro, *Resma*.
- Placas Petri estériles de 9 cm de diámetro, *Afora*.
- Puntas para micropipeta, *Eppendorf*.
- Software APILAB PLUS[®], *BioMérieux*.

Procesamiento de las muestras

El procesamiento de las muestras de grelos, tanto escaldados como cocidos, se realiza según lo descrito para los parámetros mencionados en el RD 3484/2000 de 29 de diciembre, por el que se establecen las normas de higiene para la elaboración, distribución y comercio de comidas preparadas con tratamiento térmico.

Adicionalmente, se procede a la determinación del contenido en *Clostridium perfringens*, debido a la problemática que en los alimentos envasados al vacío puede ocasionar la presencia de ciertas especies de este género.

En bolsas de homogenizador estériles, previamente pesadas y taradas, se introducen 25 g de muestra y se añaden 225 mL de agua de peptona tamponada. Se homogenizan durante 30 s y se toman alícuotas para las determinaciones que se realizan por duplicado. Dichas determinaciones se describen a continuación:

3.3.3.1. Aerobios mesófilos

Referencia: Norma ISO 4833:2003.

Medios de cultivo y reactivos

- Agar Cuenta en Placa (PCA), Cultimed Cód. 413799.1210.
- Agua de peptona tamponada, Merck Cód. 1.07228.0500.

Procedimiento

Se realizan diluciones seriadas en tubo, apropiadas a la muestra procesada. De éstas, se extrae 1 mL y se inocula en una placa petri sobre la cual se añade 15 mL de agar PCA estéril atemperado a 45 °C. Tras una agitación suave, las placas se dejan solidificar a temperatura ambiente. Posteriormente, se incuban en posición invertida durante 72 h a 30 °C y finalmente, se cuentan las colonias. El número de ufc/g correspondiente se obtiene tras multiplicar el número obtenido por el factor de dilución.

3.3.3.2. Enterobacteriáceas

Referencia: Norma ISO 7402:1993.

Medios de cultivo y reactivos

- Agar Bilis-Rojo-Violeta-Dextrosa (VRBD), Merck Cód. 1.10275.0500.
- Agua de peptona tamponada, Merck Cód. 1.07228.0500.

Procedimiento

Se realizan diluciones seriadas en tubo apropiadas a la muestra procesada. De éstas, se extrae 1 mL y se inocula en una placa petri sobre la cual se añaden 15 mL de agar VRBD estéril atemperado a 45 °C. Tras una agitación suave, las placas se dejan solidificar a temperatura ambiente y se le añade una fina sobrecapa de medio de cultivo. Posteriormente, se incuban en posición invertida a 35-37 °C durante 24 h, tras lo cual se cuentan las colonias. El número de ufc/g correspondiente se obtiene tras multiplicar el número obtenido por el factor de dilución.

3.3.3.3. Escherichia coli

Referencia: Norma ISO 16649-2:2001.

Medios de cultivo y reactivos

- Agar Fluorocult®, Merck Cód. 1.04030.0500
- Agua de peptona tamponada, Merck Cód. 1.07228.0500.

Procedimiento

Se realizan diluciones seriadas en tubo apropiadas a la muestra procesada. De éstas, se extrae 1 mL y se inocula en una placa petri sobre la cual se añade 15 mL de agar Fluorocult estéril atemperado a 45 °C. Tras una agitación suave, las placas se dejan solidificar a temperatura ambiente y se le añade una fina sobrecapa de medio de cultivo. Posteriormente se incuban en posición invertida a 44 °C durante 18-24 h, tras lo cual se cuentan las colonias. En caso de sospecha de células lesionadas, se procede a realizar una incubación previa a 37 °C durante 4 h. Una vez realizada la misma, se procede a la lectura de las placas utilizando una lámpara fluorescente a 365 nm para la detección de actividad de β -glucuronidasa. Se toman como positivas aquellas colonias en las cuales se observa fluorescencia azul. El número de ufc/g correspondiente se obtiene tras multiplicar el número obtenido por el factor de dilución.

3.3.3.4. Staphylococcus aureus

Referencia: Norma UNE-EN 6888-1:1999.

Medios de cultivo y reactivos

- Agar Baird-Parker, BioMérieux Cód. 43521
- Agua de peptona tamponada, Merck Cód. 1.07228.0500.

Procedimiento

Se realizan diluciones seriadas en tubo apropiadas a la muestra procesada. De éstas, se extrae 0.1 mL y se inocula en una placa de agar Baird-Parker solidificado. Se realiza una extensión con asa de Drigalsky y, posteriormente, se incuban en posición invertida a 35-37 °C durante 24 h. En caso de no aparecer colonias o éstas ser pequeñas se continúa la incubación durante 24 h más. Se consideran positivas aquellas colonias de color negro metálico con halo decolorado alrededor. El número de ufc/g correspondiente se obtiene tras multiplicar el número obtenido por el factor de dilución.

3.3.3.5. Listeria monocytogenes

Referencias: Norma ISO 11290-1:1998 y Norma ISO 11290-2:1998 modificados.

Medios de cultivo y reactivos

- Agar Infusión-Cerebro-Corazón (BHI), *Difco* Cód. 237500.
- Agar Listeria Medio Selectivo Modificado (LSAMM), fabricación propia según Blanco y col. (1989).
- Agua de peptona tamponada, *Merck* Cód. 1.07228.0500.
- Alcohol-acetona para Gram, *Panreac* Cód. 251803.1209.
- API listeria[®], *BioMérieux* Cód. 10.300.
- Azida de sodio, *Sigma* Cód. S-2002.
- Caldo FDA, fabricación propia según Lovett (1988).
- Cristal violeta para tinción Gram, *Panreac* Cód. 251162.1208.
- Lugol para tinción Gram, *Panreac* Cód. 251774.1609.
- Peróxido de hidrógeno al 30 % p/v, *Panreac* Cód. 141076.1211.
- Safranina para tinción Gram, *Panreac* Cód. 252533.1208.
- Sangre de cordero desfribinada, *BioMérieux* Cód. 55823.

Procedimiento

De la bolsa original se extrae 1 mL y se inocula en una placa de agar LSAMM solidificado. Se realiza una extensión con asa de Drigalsky y, posteriormente, se incuban

en posición invertida a 35-37 °C durante 24 h. En caso de no aparecer colonias o éstas ser pequeñas se continúa la incubación durante 24 h más. Se consideran positivas aquellas colonias de color negro con una depresión en el centro de la misma. El número de ufc/g correspondiente se obtiene tras multiplicar el número obtenido por el factor de dilución. Paralelamente, se hace una prueba de detección, tras enriquecimiento. En bolsas de homogenizador estériles, previamente pesadas y taradas, se introducen 25 g de muestra y se añaden 225 mL de caldo selectivo propuesto por la FDA. Se homogenizan durante 30 s y se incuban durante 24 h a 30 °C. Se repite la metodología descrita en el párrafo anterior.

Nota: En caso de aparición de colonias presuntamente positivas se realiza una caracterización bioquímica de las mismas mediante las pruebas siguientes: tinción de Gram, prueba de catalasa, por inmersión en peróxido de hidrógeno al 3 %, detección de movilidad en agar BHI, detección de carácter hemolítico mediante prueba de sobrecapa utilizando sangre de cordero desfibrinada lavada con azida de sodio e inoculación de galerías API listeria, las cuales se leen con ayuda del software APILAB PLUS.

3.3.3.6. Salmonella spp

Referencia: Norma ISO 6579:2003.

Medios de cultivo y reactivos

- Agar SM-ID[®], *BioMérieux*, Cód. 43621.
- Agar Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD), *Oxoid*, Cód. PO5238E.
- Agua de peptona tamponada, *Merck*, Cód. 1.07228.0500.
- API 20E[®], *BioMérieux*, Cód. 20100.
- Caldo Rappaport-Vassiliadis, *Merck* Cód. 1.07700.0500.
- Kit Oxoid Biochemical Identification System (OBIS *Salmonella*), *Oxoid* Cód. X5865.

Procedimiento

Se realiza directamente una prueba de detección tras enriquecimiento, para la cual se incuba la dilución madre original durante 24 h a 41.5 °C. Transcurrido ese plazo, se inocula 0.1 mL de la dilución en 9.9 mL de Caldo Rappaport-Vassiliadis. Posteriormente, se procede a su incubación durante 24 h a 44.5 °C. Una vez realizado este enriquecimiento, se procede a su siembra en estría con asa de Kölle en agar XLD y agar SM-ID y se incuban en posición invertida durante 24 h a 37 °C.

En caso de aparición de colonias presuntamente positivas (negras en el agar XLD y rojas en el agar SM-ID), se realiza una caracterización bioquímica de las mismas usando los sistemas de identificación OBIS *Salmonella* y API 20E.

3.3.3.7. Clostridium perfringens

Referencia: Norma UNE-EN 13401:2000.

Medios de cultivo y reactivos

- Agar Sulfito-Polimixina-Sulfadiazina (SPS), según Angelotti, *Cultimed* Cód. 414125.1210.
- Agua de peptona tamponada, *Merck* Cód. 1.07228.0500.
- D-Cicloserina, *BioMérieux* Cód. 42619.
- Kit RapID® ANA II System, *Remel* Cód. 8311002.

Procedimiento

Se realizan diluciones seriadas en tubo apropiadas a la muestra procesada. De éstas, se extrae 1 mL y se inocula en una placa petri sobre la cual se añaden 15 mL de agar SPS, suplementado con D-cicloserina estéril, atemperado a 45 °C. Tras una agitación suave, las placas se dejan solidificar a temperatura ambiente y se le añade una fina sobrecapa de medio. Posteriormente, se incuban en posición invertida a 35-37 °C durante 24 h en atmósfera anaerobia generada mediante el sistema Anaerogen® (*Oxoid*) en una jarra hermética, tras lo cual se cuentan las colonias desarrolladas. Las colonias negras son

sometidas a identificación bioquímica mediante el kit RapID[®] ANA II System. El número de ufc/g correspondiente se obtiene tras multiplicar el número obtenido por el factor de dilución.

3.4. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos se realiza mediante el programa SPSS versión 14.0 para Windows (SPSS Inc., Chicago, IL). Se realizan los siguientes tratamientos:

- ANOVA de dos factores con interacción.
- ANOVA de un factor, realizando la comparación de medias con el test de Tukey.
- Test t-Student para muestras independientes.
- Análisis de la correlación de Pearson para muestras bivariadas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN



4.1. OPTIMIZACIÓN DE LAS ETAPAS DEL PROCESO DE CONGELACIÓN EN EL GRELO

La optimización del proceso de congelación en el grelo, consta de tres etapas: escaldado, cocción y escurrido.

4.1.1. Escaldado

El escaldado se optimizó a dos niveles: laboratorio y planta piloto. La etapa, a nivel de laboratorio, ha sido objeto de una publicación reciente:

Mondragón-Portocarrero, A., Pena-Martínez, B., Fernández-Fernández, E., Romero-Rodríguez, A. y Vázquez-Odériz, L. (2006). Effects of different pre-freezing blanching procedures on the physicochemical properties of *Brassica rapa* leaves (Turnip Greens, Grelos). *International Journal of Food Science and Technology*. 41: 1-6.

4.1.1.1. Optimización del proceso a nivel de laboratorio

a) Primera serie de experimentos

Los grelos fueron suministrados por un productor local de la provincia de Lugo, Galicia. Se clasificaron para quitar las hojas dañadas, se cortaron y se lavaron con agua.

Inicialmente, se realizaron varios tipos de escaldado con agua a ebullición y a vapor, en ambos casos con adición de ácido cítrico al 1 y al 5 % y, sin adición del mismo. Los tratamientos fueron realizados manteniendo constante la relación peso de producto/agua. En el caso de inmersión en agua esta relación fue de aproximadamente 800 g de producto en 2 L de agua y en el caso del escaldado a vapor fue de alrededor de 800 g de producto por cada litro de agua. Cuando el agua hervía se introducían los grelos para efectuar su escaldado ensayándose los tiempos de 1 min, 1.5 min, y 2 min, contados desde el momento en el que el agua volvía a hervir.

Después de cada tratamiento térmico los grelos se sumergían rápidamente en un baño de agua con hielo, se mantenían así durante 5 min y, posteriormente, se secaban con papel de filtro durante otros 5 min. Una vez finalizado ese tiempo, se realizó la prueba cualitativa de actividad de la peroxidasa a una porción de cada producto tratado. Se comprobó que dicha enzima se inactivaba al cabo de 2 min en los grelos escaldados en agua, sin embargo con la adición del ácido cítrico, solo era necesario 1 min de escaldado. Asimismo, con respecto al escaldado con vapor, fueron necesarios 2 min para inactivar la peroxidasa, sin embargo se observó que la adición del ácido cítrico no disminuía el tiempo de escaldado, por lo que se suprimió la adición de este ácido.

b) Segunda serie de experimentos

En función de los resultados obtenidos en la primera serie de experimentos, y con la finalidad de no aplicar un tratamiento térmico de larga duración, se optó por realizar una segunda serie de experimentos, los cuales se detallan a continuación.

- ✓ Escaldado a vapor, durante 2 min.
- ✓ Escaldado con agua, durante 2 min.
- ✓ Escaldado con agua y adición de 1 % de ácido cítrico, durante 1 min.
- ✓ Escaldado con agua y adición de 5 % de ácido cítrico, durante 1 min.

Después de cada escaldado, enfriado y secado, siguiendo el procedimiento anteriormente descrito, los grelos se dividieron en porciones de 25 g, los cuales fueron introducidos en recipientes plásticos con tapa de uso alimentario y congelados a -18°C en un arcón congelador (*Lynx*, modelo LG-682).

Durante un período de 120 días, en intervalos aproximados de 15 días, porciones de los grelos congelados, fueron retirados del arcón y descongelados a 4°C durante toda la noche. Al día siguiente, se realizaron los análisis fisicoquímicos (cenizas, contenido de vitamina C, pH, acidez titulable, humedad y parámetros de color, L^* , C^* y H°), cuyos resultados se analizan a continuación.

Es conveniente mencionar que en las tablas de datos y en sus respectivas figuras, para la variable “Número de muestreo” se usa la nomenclatura establecida en la Tabla 9, la cual será de uso común para todos los resultados de este trabajo.

Tabla 9. Nomenclatura para definir la variable “N° de muestreo”.

N° de muestreo	significado
0	gelo fresco (sin tratamiento).
1	gelo escaldado, enfriado y secado.
2	gelo congelado durante 15 días.
3	gelo congelado durante 30 días.
4	gelo congelado durante 45 días.
5	gelo congelado durante 60 días.
6	gelo congelado durante 75 días.
7	gelo congelado durante 90 días.
8	gelo congelado durante 105 días.

Cenizas

La determinación de cenizas solo se realizó en el producto fresco y en el producto tras el escaldado.

Tabla 10. Cenizas en gelo fresco y expuesto a 4 métodos de escaldado.

N° muestreo	cenizas ^a			
	vapor (2 min)	agua (2 min)	agua + 1 % ác. cítrico (1 min)	agua + 5 % ác. cítrico (1 min)
0	1.19 ± 0.12	1.19 ± 0.12	1.19 ± 0.12	1.19 ± 0.12
1	1.16 ± 0.02	0.56 ± 0.01	0.81 ± 0.06	0.75 ± 0.07

Promedio ± desviación estándar (n=2); ^a g/100 g.

El contenido en cenizas del producto fresco (promedio ± DS) fue de 1.19 ± 0.12 g/100 g (Tabla 10). Este valor disminuyó considerablemente en el escaldado con agua (a 0.56 ± 0.01 g/100 g en agua, durante 2 min; a 0.81 ± 0.06 g/100 g con agua y 1 % de ácido cítrico, durante 1 min; y 0.75 ± 0.07 g/100 g con agua y 5 % de ácido cítrico,

durante 1 min). En contraste, el escaldado con vapor no tuvo efecto sobre esta variable ya que el resultado fue de 1.16 ± 0.02 g/100 g.

A partir de los resultados de los restantes parámetros fisicoquímicos se realizó el tratamiento estadístico ANOVA de dos factores, siendo éstos el tiempo de almacenamiento (t) y el método de escaldado (E) con la interacción de ambos factores (t × E). Los resultados obtenidos de dicho tratamiento se recogen en la Tabla 11.

Tabla 11. ANOVA de dos factores (tiempo de almacenamiento y método de escaldado, con interacción).

variables	t	E	t × E
vitamina C	0.000*	0.000*	0.000*
pH	0.002*	0.000*	0.000*
acidez titulable	0.005*	0.000*	0.007*
humedad	0.000*	0.000*	0.151
L*	0.798	0.003*	0.184
C*	0.611	0.000*	0.220
H°	0.575	0.000*	0.629

*: $p < 0.05$; t: tiempo de almacenamiento; E: método de escaldado.

Se observa que existen diferencias estadísticamente significativas respecto al factor tiempo de almacenamiento (t) para las variables vitamina C, pH, acidez titulable y humedad; mientras que para el factor método de escaldado (E) existen diferencias significativas en todos los parámetros estudiados. La interacción t × E es estadísticamente significativa para las variables vitamina C, pH y acidez titulable.

En los casos en que la interacción es significativa, se procede al análisis de los datos independientemente seleccionando, en este caso, como factor el método de escaldado. Los resultados de este análisis se recogen en la Tabla 12. Cuando se observan diferencias estadísticamente significativas, se aplica el test de Tukey para comprobar en donde se localizan esas diferencias.

Tabla 12. ANOVA de un factor (método de escaldado).

N° de muestreo	vitamina C	pH	acidez titulable
1	0.000*	0.182	0.021*
2	0.000*	0.002*	0.042*
3	0.000*	0.032*	0.643
4	0.000*	0.000*	0.000*
5	0.000*	0.000*	0.516
6	0.000*	0.001*	0.003*
7	0.000*	0.000*	0.001*
8	0.000*	0.000*	0.000*

*: $p < 0.05$.**Contenido de vitamina C**

En lo que respecta al contenido de vitamina C, se aprecian diferencias estadísticamente significativas, tanto a lo largo del almacenamiento, como entre los diferentes métodos de escaldado (Tabla 12).

El contenido promedio en vitamina C en el grelo fresco fue de 68.06 mg/100 g (Tabla 13). Autores como Mataix y col. (2003) indican que este contenido es de 40 mg/100 g, diferencias que pueden ser debidas a distintos factores: genéticos, ambientales, climáticos, condiciones de cultivo, localización, etc. (Simonetti y col., 1991).

Tabla 13. Vitamina C en grelo fresco y expuesto a 4 métodos de escaldado.

Nº muestreo	vitamina C ^a			
	vapor (2 min)	agua (2 min)	agua + 1 % ác. cítrico (1 min)	agua + 5 % ác. cítrico (1 min)
0	68.06 ± 1.82	68.06 ± 1.82	68.06 ± 1.82	68.06 ± 1.82
1	57.33 ± 0.33	26.75 ± 0.52	37.07 ± 0.24	39.12 ± 0.84
2	54.44 ± 0.88	30.70 ± 0.36	19.62 ± 0.06	26.75 ± 1.39
3	60.20 ± 0.63	20.71 ± 0.21	23.29 ± 0.24	26.43 ± 0.47
4	65.28 ± 0.01	20.26 ± 0.93	26.95 ± 0.08	23.72 ± 0.09
5	76.63 ± 2.17	38.69 ± 0.31	31.73 ± 0.18	45.32 ± 0.82
6	79.94 ± 0.25	27.76 ± 0.28	32.56 ± 0.32	40.17 ± 0.08
7	82.83 ± 0.16	34.85 ± 0.18	36.48 ± 0.08	24.15 ± 0.16
8	70.12 ± 0.02	39.56 ± 0.58	29.69 ± 0.05	20.55 ± 0.12

Promedio ± desviación estándar (n=2); ^a mg/100 g de materia fresca.

En la Figura 26 se observa que, tras el escaldado, se produce una disminución en el contenido de vitamina C para los distintos métodos aplicados. En el presente estudio, la reducción fue más severa tras el escaldado con agua (aproximadamente 61 % del contenido inicial) y menor con agua adicionada de 1 % de ácido cítrico (aproximadamente 45 % y 42% del contenido inicial respectivamente). La reducción menor se produjo con el escaldado a vapor, únicamente un 16%.

Es ya conocido que, tras el escaldado con vapor, el contenido en vitamina C se reduce menos que tras el escaldado con agua, debido a que las pérdidas por lixiviación son menores (Canet y col., 1991; Canet, 1996). Así, Rutledge (1992) indica que las hortalizas escaldadas con agua contienen menos de la mitad de vitamina C que las escaldadas con vapor. Ponne y col. (1994) encontraron que las pérdidas de vitamina C en espinacas congeladas (con respecto al producto fresco), fueron del 29 % para espinacas escaldadas con vapor, mientras que las escaldadas en agua fueron del 69 %. Howard y col. (1999) encontraron que las pérdidas de vitamina C en brócoli, tras el escaldado a vapor, fueron aproximadamente de 30 %.

Las menores pérdidas de vitamina C, observadas tras el escaldado en agua con ácido cítrico al 1 y 5 %, se atribuyen, por una parte, a que se aplicó un tiempo de escaldado más corto (1 min frente a 2 min, sin adición del ácido) y por otra parte, a que el ácido cítrico disminuye el pH de los grelos a valores por debajo de 6, lo cual incrementa la estabilidad del ácido ascórbico (Gregory, 2000).

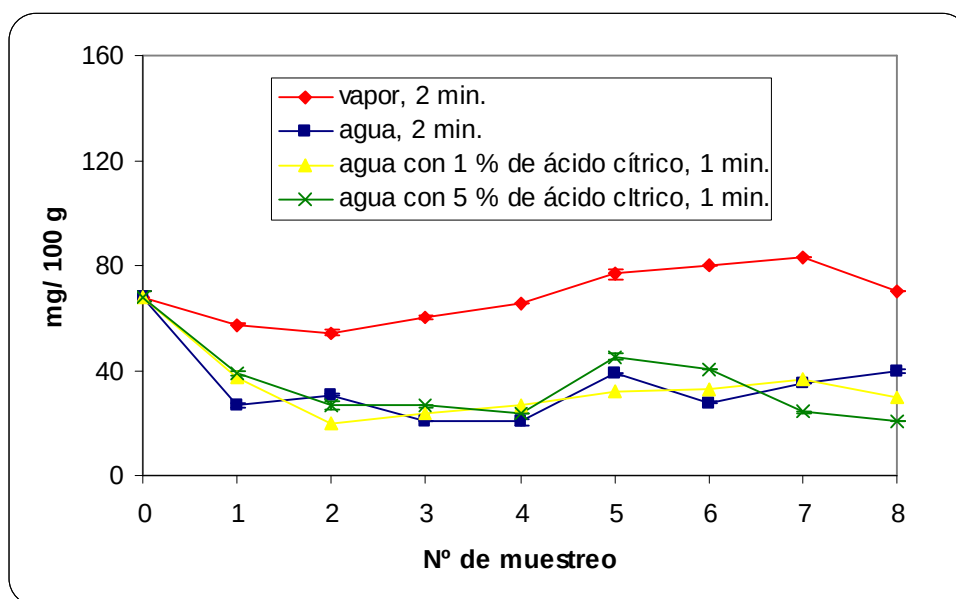


Figura 26. Evolución del contenido de vitamina C en grelo fresco y expuesto a 4 métodos de escaldado.

El hecho de que el contenido de vitamina C, disminuya significativamente tras el escaldado, pero permanezca más o menos constante durante el almacenamiento en congelación, coincide con estudios previos realizados en vegetales verdes los cuales indican que las pérdidas durante la congelación son debidas al propio escaldado, no a una degradación química durante el almacenamiento (Howard y col., 1999). Por tanto, es el escaldado y no la congelación, el proceso que provoca las pérdidas de vitamina C en vegetales congelados (Wu y col., 1992).

pH

El resultado promedio para el pH fue de 6.27 ± 0.05 en el producto fresco, y entre 6.20 y 5.69 tras el escaldado (6.20 ± 0.05 con vapor; 6.43 ± 0.08 con agua; 5.96 ± 0.54 con agua con 1 % de ácido cítrico y 5.69 ± 0.01 con agua con 5 % de ácido cítrico (Tabla 14).

Tabla 14. pH en grelo fresco y expuesto a 4 métodos de escaldado.

N° muestreo	pH			
	vapor (2 min)	agua (2 min)	agua + 1 % ác. cítrico (1 min)	agua + 5 % ác. cítrico (1 min)
0	6.27 ± 0.05	6.27 ± 0.05	6.27 ± 0.05	6.27 ± 0.05
1	6.20 ± 0.05	6.43 ± 0.08	5.96 ± 0.54	5.69 ± 0.01
2	6.45 ± 0.08	6.47 ± 0.08	5.45 ± 0.12	5.20 ± 0.23
3	6.55 ± 0.03	6.60 ± 0.04	5.44 ± 0.11	5.71 ± 0.55
4	6.49 ± 0.07	6.60 ± 0.14	5.52 ± 0.02	5.10 ± 0.10
5	6.25 ± 0.08	6.38 ± 0.04	5.28 ± 0.03	5.19 ± 0.00
6	6.33 ± 0.03	6.34 ± 0.01	5.47 ± 0.23	5.00 ± 0.01
7	6.24 ± 0.06	6.43 ± 0.13	5.56 ± 0.06	5.03 ± 0.00
8	6.55 ± 0.03	6.49 ± 0.11	5.50 ± 0.03	4.93 ± 0.05

Promedio $\pm$ desviación estándar (n=2).

Los resultados del test de Tukey, tras la aplicación del ANOVA de un factor (Tabla 12) indican que los lotes escaldados con vapor y con agua, difieren significativamente de los lotes escaldados con agua adicionada de ácido cítrico, debido a que el valor de pH es más elevado.

Durante el almacenamiento en congelación, se aprecian ligeras variaciones en el valor de pH para los 4 diferentes tratamientos, sin embargo los valores más bajos se mantienen en los lotes escaldados con agua adicionada de ácido cítrico (Figura 27).

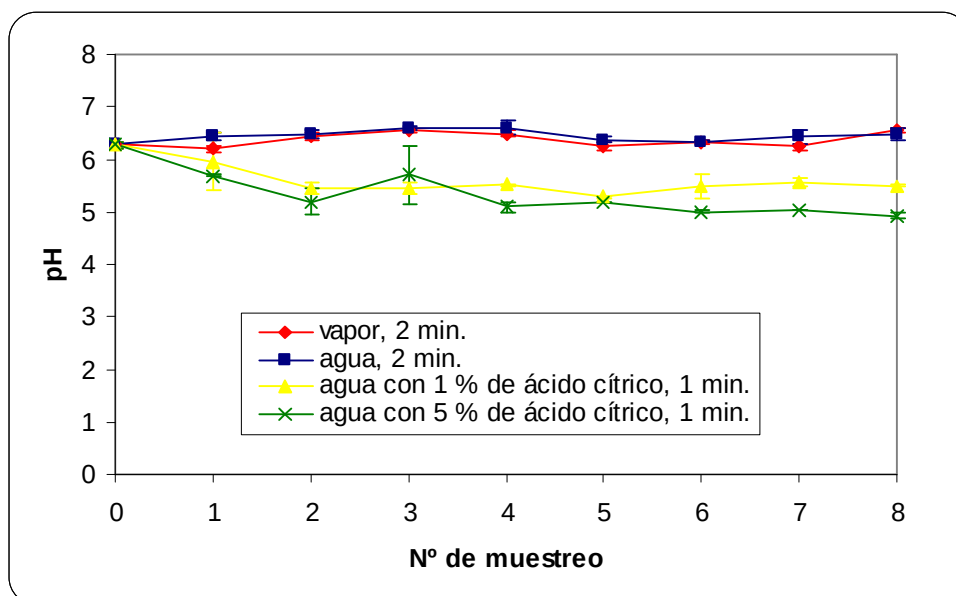


Figura 27. Evolución del pH en gredo fresco y expuesto a 4 métodos de escaldado.

Acidez titulable

El valor promedio para la acidez titulable fue de 0.06 ± 0.01 g de ácido málico/100 g en el producto fresco, y entre 0.02 y 0.06 g de ácido málico/100 g tras el escaldado (0.06 ± 0.00 con vapor; 0.02 ± 0.01 con agua; 0.04 ± 0.01 con agua con 1 % de ácido cítrico y 0.05 ± 0.01 con agua con 5 % de ácido cítrico (Tabla 15).

Tabla 15. Acidez titulable en grelo fresco y expuesto a 4 métodos de escaldado.

N° muestreo	acidez titulable ^a			
	vapor (2 min)	agua (2 min)	agua + 1 % ác. cítrico (1 min)	agua + 5 % ác. cítrico (1 min)
0	0.06 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.06 ± 0.01
1	0.06 ± 0.00	0.02 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.05 ± 0.01
2	0.05 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.08 ± 0.02
3	0.02 ± 0.00	0.05 ± 0.04	0.05 ± 0.00	0.06 ± 0.04
4	0.03 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.07 ± 0.01	0.12 ± 0.00
5	0.05 ± 0.00	0.06 ± 0.05	0.06 ± 0.00	0.09 ± 0.00
6	0.05 ± 0.01	0.02 ± 0.00	0.03 ± 0.01	0.12 ± 0.01
7	0.02 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.05 ± 0.01	0.10 ± 0.01
8	0.05 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.07 ± 0.00	0.14 ± 0.01

Promedio ± desviación estándar (n=2); ^a % de ácido málico.

Los resultados del test de Tukey, tras la aplicación del ANOVA de un factor (Tabla 12) indican que el valor de acidez titulable fue significativamente más alto en los lotes escaldados en agua con 5 % de ácido cítrico, que en los lotes expuestos a los demás tratamientos.

Durante el almacenamiento en congelación, se aprecian ligeras variaciones en el valor de acidez titulable para los 4 diferentes tratamientos, (Figura 28). Cabe destacar que los valores más altos se mantienen en el lote de grelos escaldados con agua con 5 % de ácido cítrico.

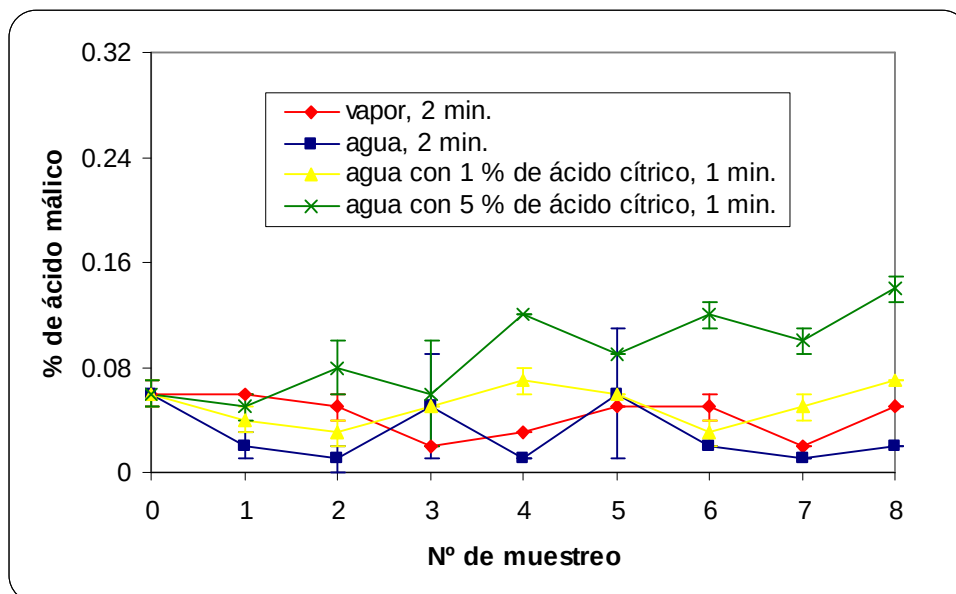


Figura 28. Evolución de la acidez titulable en grelo fresco y expuesto a 4 métodos de escaldado.

Para la humedad y los parámetros de color $CIE_{L^*a^*b^*}$ (L^* , C^* y H°), la interacción tiempo de almacenamiento y método de escaldado ($t \times E$) no es estadísticamente significativa (Tabla 11).

Humedad

El contenido promedio de humedad fue de 85.48 ± 0.36 g/100 g en el producto fresco, y entre 87.84 y 91.47 g /100 g tras el escaldado (87.84 ± 0.48 con vapor; 91.11 ± 1.49 con agua; 91.47 ± 0.24 con agua con 1 % de ácido cítrico y 90.68 ± 0.26 con agua con 5 % de ácido cítrico) (Tabla 16).

El escaldado incrementa el contenido de humedad, debido a la absorción de agua por las células que resultan dañadas durante el mismo y a la adhesión del agua sobre la superficie del producto (Carbonell y col., 1985; Howard y col., 1999).

Tabla 16. Humedad en grelo fresco y expuesto a 4 métodos de escaldado.

N° muestreo	humedad ^a			
	vapor (2 min)	agua (2 min)	agua + 1 % ác. cítrico (1 min)	agua + 5 % ác. cítrico (1 min)
0	85.48 ± 0.36	85.48 ± 0.36	85.48 ± 0.36	85.48 ± 0.36
1	87.84 ± 0.48	91.11 ± 1.49	91.47 ± 0.24	90.68 ± 0.26
2	85.73 ± 0.72	90.27 ± 0.68	89.35 ± 0.38	90.45 ± 0.77
3	86.48 ± 1.13	90.71 ± 0.61	91.06 ± 0.47	90.65 ± 0.49
4	85.82 ± 0.92	90.06 ± 0.92	89.67 ± 0.39	90.26 ± 0.56
5	86.59 ± 0.66	90.23 ± 0.09	90.84 ± 0.48	89.79 ± 0.22
6	86.16 ± 1.04	90.95 ± 0.22	90.57 ± 0.21	90.40 ± 0.31
7	86.61 ± 0.39	90.10 ± 0.38	90.12 ± 0.21	90.85 ± 0.10
8	87.11 ± 0.40	90.39 ± 0.37	90.17 ± 0.66	91.05 ± 0.42

Promedio ± desviación estándar (n=2); ^a %.

El test de Tukey, tras la aplicación del ANOVA de un factor (Tabla 12) indica que el contenido de humedad fue significativamente más bajo en los lotes escaldados con vapor, que en los lotes expuestos a los demás tratamientos.

Durante el almacenamiento en congelación, se aprecian ligeras variaciones significativas en el contenido de humedad de las muestras sometidas a los diferentes tipos de escaldado (Figura 29), manteniéndose las diferencias, provocadas por dicho escaldado, entre las muestras.

Howard y col. (1999) encontraron que el contenido de humedad de judías verdes escaldadas con vapor, tuvo una ligera disminución durante el almacenamiento en congelación, desde 93.4 % hasta 91.9 %.

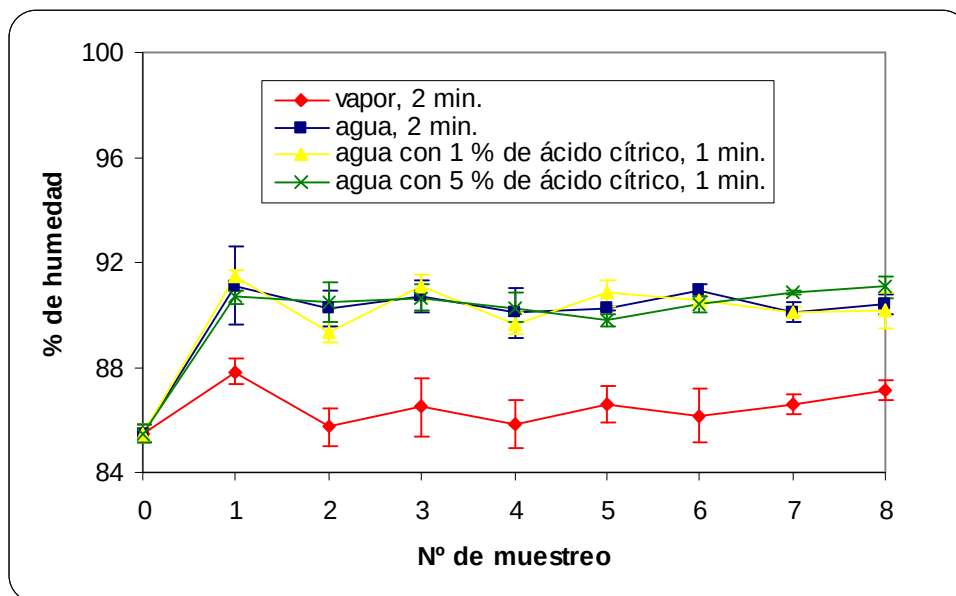


Figura 29. Evolución del contenido de humedad en grelo fresco y expuesto a 4 métodos de escaldado.

Los parámetros de color $CIE_{L^*a^*b^*}$ (L^* , C^* y H°), presentaron diferencias estadísticamente significativas para el factor método de escaldado (E), no así para el factor tiempo de almacenamiento (t) (Tabla 11).

Luminosidad (L^*)

En la Tabla 17 se observa que se produce una disminución en la luminosidad (L^*), desde un valor de 48.32 ± 1.81 para el producto fresco, hasta valores entre 39.29 y 45.23 tras el escaldado (45.23 ± 1.79 con vapor; 39.29 ± 2.35 con agua; 41.95 ± 1.96 con agua con 1 % de ácido cítrico y 39.88 ± 1.81 con agua con 5 % de ácido cítrico).

Durante el almacenamiento en congelación, se aprecian ligeras variaciones en la luminosidad en las muestras sometidas a los diferentes tipos de escaldado (Figura 30).

Tabla 17. Luminosidad (L*) en grelo fresco y expuesto a 4 métodos de escaldado.

Nº muestreo	luminosidad (L*)			
	vapor (2 min)	agua (2 min)	agua + 1 % ác. cítrico (1 min)	agua + 5 % ác. cítrico (1 min)
0	48.32 ± 1.81	48.32 ± 1.81	48.32 ± 1.81	48.32 ± 1.81
1	45.23 ± 1.79	39.29 ± 2.35	41.95 ± 1.96	39.88 ± 1.81
2	42.76 ± 1.38	43.96 ± 4.54	44.06 ± 1.12	38.28 ± 4.90
3	41.77 ± 3.17	41.87 ± 0.79	42.41 ± 2.44	38.21 ± 1.16
4	42.10 ± 2.13	45.01 ± 7.21	39.48 ± 1.51	37.96 ± 1.37
5	42.30 ± 1.35	45.20 ± 8.58	38.29 ± 3.15	43.39 ± 3.17
6	40.41 ± 0.90	45.48 ± 1.64	43.19 ± 4.13	42.80 ± 5.68
7	42.17 ± 2.39	44.08 ± 1.04	40.60 ± 2.56	38.16 ± 3.23
8	41.71 ± 1.39	41.33 ± 1.10	43.36 ± 2.31	39.44 ± 2.21

Promedio ± desviación estándar (n=2).

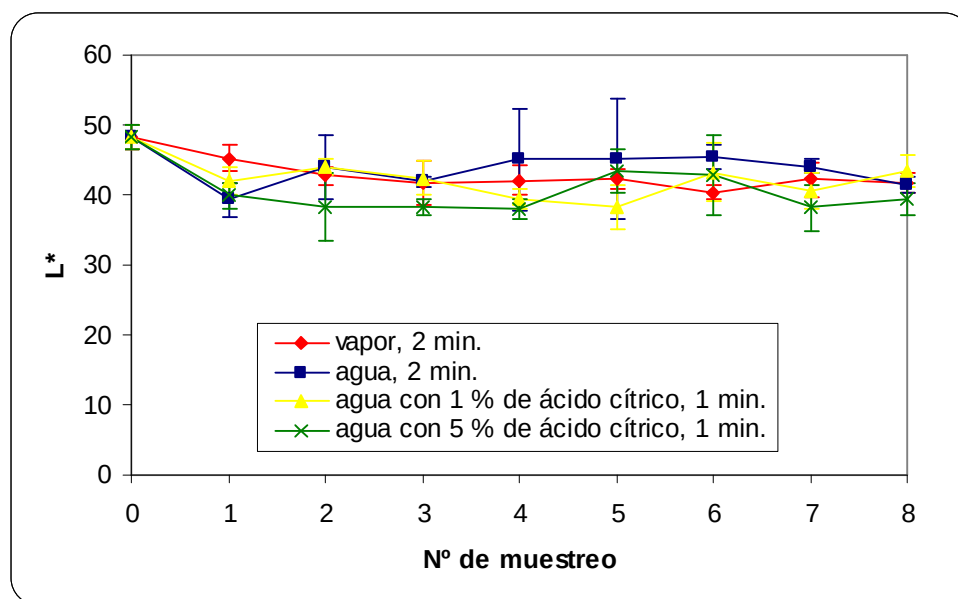


Figura 30. Evolución de la luminosidad (L*) en grelo fresco y expuesto a 4 métodos de escaldado.

Cromaticidad (C*)

En la Tabla 18 se observa que se produce un aumento de la cromaticidad (C*), desde un valor de 26.73 ± 2.82 para el producto fresco, hasta valores entre 29.51 y 34.38 tras el escaldado (34.38 ± 2.16 con vapor; 29.51 ± 3.50 con agua; 34.34 ± 2.76 con agua con 1 % de ácido cítrico y 31.18 ± 4.46 con agua con 5 % de ácido cítrico).

Durante el almacenamiento en congelación, se aprecian ligeras variaciones en la cromaticidad (C*) para los 4 tipos de muestras (Figura 31).

Tabla 18. Cromaticidad (C*) en grelo fresco y expuesto a 4 métodos de escaldado.

Nº muestreo	cromaticidad (C*)			
	vapor (2 min)	agua (2 min)	agua + 1 % ác. cítrico (1 min)	agua + 5 % ác. cítrico (1 min)
0	26.73 ± 2.82	26.73 ± 2.82	26.73 ± 2.82	26.73 ± 2.82
1	34.38 ± 2.16	29.51 ± 3.50	34.34 ± 2.76	31.18 ± 4.46
2	34.09 ± 4.74	41.72 ± 5.80	38.75 ± 5.39	28.95 ± 5.42
3	34.98 ± 1.63	38.11 ± 3.41	37.25 ± 8.88	31.31 ± 2.38
4	35.74 ± 2.24	42.03 ± 10.06	32.98 ± 2.88	34.17 ± 4.27
5	33.37 ± 3.03	40.83 ± 12.70	30.15 ± 7.37	41.17 ± 5.70
6	31.72 ± 5.25	42.33 ± 1.97	36.41 ± 7.79	36.45 ± 8.22
7	33.47 ± 2.91	42.75 ± 2.33	35.32 ± 3.80	31.57 ± 6.35
8	34.66 ± 3.00	39.94 ± 2.47	37.20 ± 0.58	30.25 ± 4.97

Promedio $\pm$ desviación estándar (n=2).

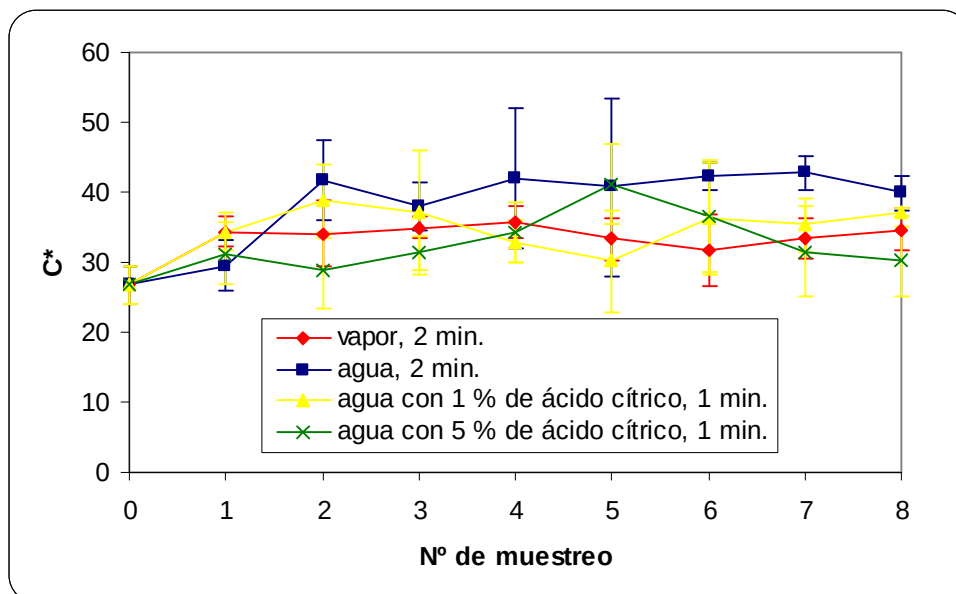


Figura 31. Evolución de la cromaticidad (C^*) en grelo fresco y expuesto a 4 métodos de escaldado.

Tono (H°)

El valor promedio para el tono (H°) del grelo fresco, fue de $108.80 \pm 1.01^\circ$. Este valor se incrementó a $110.50 \pm 0.71^\circ$ tras el escaldado con agua durante 2 min y a $112.41 \pm 2.42^\circ$ tras el escaldado con vapor. En contraste, este parámetro disminuyó a $97.38 \pm 3.77^\circ$ tras el escaldado en agua con 1 % de ácido cítrico y a $91.54 \pm 7.88^\circ$ tras el escaldado en agua con 5 % de ácido cítrico (Tabla 19).

Uno de los inconvenientes de los tratamientos térmicos en los productos vegetales verdes, es que se produzca la transformación de clorofilas a feofitinas. Los factores que influyen principalmente en dicha transformación, son el tipo de tratamiento térmico, la temperatura y duración del mismo, así como el pH del medio (Schwartz y Lorenzo, 1991). Así, los tratamientos térmicos a temperaturas elevadas durante tiempos cortos, mantienen mejor el color verde, que los tratamientos a temperaturas más bajas durante tiempos largos (Canjura y col., 1991; López y col., 1994).

En este estudio, no se han encontrado diferencias entre el tono de las muestras escaldadas a vapor y con agua, ya que no se observaron prácticamente cambios en el color, respecto al producto fresco. Teng y Chen (1999) encontraron que el escaldado con agua aplicado a la espinaca causó una mayor degradación de la clorofila que el escaldado con vapor.

La adición de ácido cítrico al agua de escaldado, aumenta la sensibilidad al calor de los sistemas enzimáticos permitiendo disminuir la duración del escaldado, lo cual, a la vez, disminuye el pH (Figura 27) pero presenta un efecto desfavorable sobre el color al favorecer la transformación de clorofila en feofitina (Belitz y Grosch, 1997; Canjura y col., 1991; Lin y Schyvens, 1995; López-Ayerra y col., 1998; Canet y Alvarez, 2000; Lau y col., 2000; Ahmed y col., 2002).

En este trabajo se observa como la acidificación del agua de escaldado provoca una variación del tono verde brillante a marrón oliva (Figura 32).

Tabla 19. Tono (H°) en grelo fresco y expuesto a 4 métodos de escaldado.

N° muestreo	tono (H°)			
	vapor (2 min)	agua (2 min)	agua + 1 % ác. cítrico (1 min)	agua + 5 % ác. cítrico (1 min)
0	108.80 ± 1.01	108.80 ± 1.01	108.80 ± 1.01	108.80 ± 1.01
1	112.41 ± 2.42	110.50 ± 0.71	97.38 ± 3.77	91.54 ± 7.88
2	111.03 ± 2.09	107.88 ± 3.23	94.77 ± 0.77	89.35 ± 4.84
3	110.55 ± 1.11	110.24 ± 0.84	95.01 ± 8.76	84.43 ± 5.66
4	111.58 ± 2.65	110.07 ± 4.06	107.75 ± 1.42	91.88 ± 9.80
5	113.54 ± 0.70	107.80 ± 3.74	96.83 ± 13.15	93.12 ± 13.39
6	111.45 ± 0.72	109.34 ± 2.14	97.44 ± 9.78	94.00 ± 12.42
7	112.18 ± 2.94	111.13 ± 0.93	107.64 ± 2.95	85.58 ± 7.49
8	115.06 ± 0.56	111.32 ± 1.93	102.95 ± 12.67	84.46 ± 12.13

Promedio ± desviación estándar (n=2).

Durante el almacenamiento en congelación, solo se observaron ligeras variaciones en el tono (H°) para los grelos escaldados con vapor y con agua. Sin embargo, estas variaciones fueron más notables para los grelos escaldados con agua y adicionados con 1 y 5 % de ácido cítrico (Figura 32).

López y col. (1994) estudiaron la degradación de la clorofila durante el almacenamiento de guisantes y espinacas y concluyeron que la congelación a -30°C era el método más idóneo para preservar el color verde, ya que en el transcurso de 50 días de almacenamiento en congelación, la concentración de clorofilas sólo se redujo en un 13 %, para el caso de las espinacas y en un 6 %, para el caso de los guisantes. De forma similar, López-Ayerra y col. (1998) encontraron que el contenido de clorofilas disminuyó alrededor de un 16 % en espinaca almacenada en congelación.

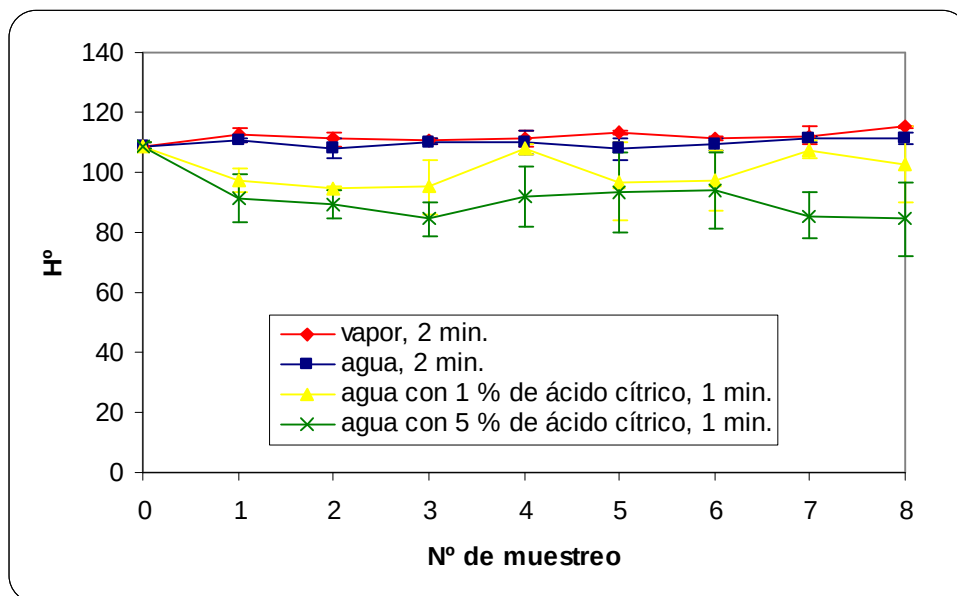


Figura 32. Evolución del tono (H°) en grelo fresco y expuesto a 4 métodos de escaldado.

En conclusión, se determinó que el vapor durante 2 min, es el mejor método para escaldar los grelos antes de su congelación, ya que se reducen las pérdidas de vitamina C, y se mantiene el color y el contenido de humedad similar al producto en fresco.

Asimismo, se observó que el almacenamiento en congelación solo produce ligeras variaciones en los parámetros fisicoquímicos, hasta el momento, analizados.

4.1.1.2. Optimización del proceso a nivel planta piloto

El equipo utilizado para el escaldado, a nivel planta piloto, se describe con mayor detalle en el apartado 3.2.2. de la sección de “material y métodos”.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el laboratorio, respecto a que el vapor era el mejor método para escaldar el grelo, se decidió utilizar este método, a nivel planta piloto. Se pesaron lotes de grelo de 2 kg y se les aplicaron tiempos de escaldado de 1.0, 1.5 y 2.0 min. Tras el enfriamiento con agua, durante 5 min, se realizó a cada lote la prueba cualitativa de la actividad de la peroxidasa, cuyos resultados se recogen en la Tabla 20.

Tabla 20. Resultados de la prueba de actividad de la peroxidasa.

Tiempo	Prueba de actividad de la peroxidasa
1.0 min	Positiva
1.5 min	Positiva
2.0 min	Negativa

Estos resultados confirman lo comprobado a nivel de laboratorio, ya que los tiempos de escaldado de 1 min y 1.5 min, no son suficientes para inactivar la peroxidasa, por lo tanto, el tiempo de escaldado de 2 min, bajo las condiciones descritas anteriormente, es el que se elige para realizar este proceso en los grelos, ya que es el menor tiempo requerido para que se inactive la enzima (García, 2005).

4.1.2. Cocción

La demanda de alimentos procesados se ha incrementado enormemente con el crecimiento de la población en núcleos urbanos. Esto no se ha debido a la escasez de productos frescos, sino más bien, a un cambio completo del estilo de vida (Holdsworth,

1987; Conning, 1992). Asimismo, ha aumentado la utilización de platos preparados, por su comodidad y porque en la sociedad actual cada vez se dispone de menos tiempo para complejas preparaciones culinarias (Holdsworth, 1987; Lyon y Churchill, 1992).

Por estas tendencias actuales que se dan en el comportamiento de los consumidores, se ha llevado a cabo la congelación de grelos, ya cocinados, que solo necesitan una mínima preparación en el hogar.

Esta etapa del proceso se realizó en el equipo que se describe, con mayor detalle, en el apartado 3.1.6. de la sección de “material y métodos”. El proceso de cocción se ha llevado a cabo manteniendo constante la relación peso de producto/agua a 1 kg de producto/2 L de agua. Se han ensayado 5 tiempos de cocción: 45, 50, 60, 75 y 90 min, contados a partir del momento en que el agua con el producto comienza a hervir.

La elección del tiempo de cocción adecuado, se realizó en base a tres índices de calidad: color, grado de cocción o dureza y sensación de humedad en la boca.

De este modo, atendiendo al parámetro de color, se rechazaron los grelos sometidos a los tratamientos térmicos de 75 y 90 min de duración, ya que presentaban una coloración parda muy poco atractiva, que reflejaba un tratamiento térmico demasiado intenso. En lo que respecta a las muestras cocidas durante 45, 50 y 60 min no se apreciaron diferencias importantes en cuanto a su color.

Prestando atención al parámetro de grado de cocción o dureza, se consideraron no aptas las muestras tratadas durante 60, 75 y 90 min por apreciar que presentaban un grado de cocción excesivo. Entre los tiempos de 45 y 50 min, se opta por el primero, ya que se considera que es tiempo suficiente para la cocción, teniendo en cuenta que la preparación posterior en el hogar puede prolongarse en el caso de que resulte insuficiente para el consumidor.

En cuanto a la sensación de humedad en la boca, no se han encontrado importantes diferencias entre las muestras.

Teniendo en cuenta, los 3 índices de calidad evaluados, se considera que el tiempo de cocción óptimo es el de 45 min, bajo las condiciones descritas anteriormente.

4.1.3. Escurrido

Para esta etapa del proceso, fue necesario diseñar dos equipos, uno fue el equipo de prensado y, otro, el equipo de centrifugado, los cuales se detallan en los apartados 3.2.3. y 3.2.4., respectivamente, de la sección de “material y métodos” (Viña, 2004).

4.1.3.1. Prensado

Se han ensayado presiones de 1, 2 y 3 bar. Para conocer la presión y la fuerza ejercida en las cubetas de prensado se tiene en cuenta:

$$F_b = F_{cp}$$

$$P_b \times A_b = P_{cp} \times A_{cp} \times n_c$$

Siendo:

F_b : fuerza aplicada por el cilindro neumático.

F_{cp} : fuerza realizada por las cubetas de prensado.

P_b : presión ejercida por el cilindro neumático.

$$A_b: \text{área total del cilindro: } A_b = \pi \frac{(6 \text{ cm})^2}{4} = 28.27 \text{ cm}^2$$

P_{cp} : presión ejercida por las cubetas de prensado.

$$A_{cp}: \text{área de una cubeta de prensado: } A_{cp} = (13 \text{ cm}) \times (9 \text{ cm}) = 117 \text{ cm}^2$$

n_c : número de cubetas. En todos los ensayos $n_c = 2$.

De este modo, los resultados obtenidos se observan en la Tabla 21.

Tabla 21. Valores de presión (P) y fuerza (F) ejercidos en las cubetas en función de la presión de trabajo

P_b^a	P_{cp}^a	$(F_{\text{cubetas}} = P_{cp} \times A_{cp})^b$
1	0.12	14.04
2	0.24	28.08
3	0.36	42.12

bar^a; kg^b

La elección de la presión más adecuada, para llevar a cabo los ensayos, se ha realizado en base a 3 índices de calidad: volumen ocupado, comodidad de embalaje y aspecto final.

Como no existen diferencias en el aspecto final del producto, en función de la presión aplicada, se considera que la óptima, en las condiciones de utilización del equipo, es 3 bar. A esta presión, el volumen de la muestra es menor, lo cual a su vez implica una mayor comodidad en el embalaje (García, 2005).

4.1.3.2. Centrifugado

Se han ensayado valores de frecuencia de 10, 20 y 30 Hz. Para conocer la velocidad de giro del tambor se tiene en cuenta:

$$n_p = \frac{60 \times f}{p} \times (1 - s)$$

$$n_p \times \phi_p = n_t \times \phi_t$$

Siendo:

n_p : velocidad de giro de la polea.

f : frecuencia a la que se alimenta el motor.

p : pares de polos del motor. $p = 2$.

s : deslizamiento.
$$s = \frac{ns - n}{ns}$$

ns = velocidad de sincronía en rpm, que en el caso de un motor sincrónico de 4 polos es 1500 rpm

$$s = \frac{1500 - 1380}{1500} = 0.08$$

ϕ_p : diámetro de la polea = 80 mm.

n_t : velocidad de giro del tambor.

ϕ_t : diámetro del tambor = 530 mm.

Con estas consideraciones, las velocidades de giro del tambor para los 3 valores de frecuencia considerados, son:

Tabla 22. Velocidad de giro de la polea y del tambor en función de la frecuencia del motor

F^a	n_{polea}^b	n_{tambor}^b
10	276	41.66
20	552	83.32
30	828	124.98

Hz ^a; rpm ^b

En base a los resultados de la Tabla 22, la frecuencia que resulta más adecuada para este uso, es la de 20 Hz que se corresponde con una velocidad de giro de tambor de 83.32 rpm. Al utilizar la frecuencia de 10 Hz, como la velocidad de giro es pequeña, el producto se deteriora en exceso; si se utiliza la frecuencia de 30 Hz se producen grandes pérdidas de producto (García, 2005).

Se realizaron ensayos factoriales combinando el tratamiento térmico (escaldado con vapor durante 2 min, y cocción durante 45 min), con los dos sistemas de escurrido (prensado a 3 bar y centrifugado a 20 Hz). Los resultados indican que el prensado es el sistema más efectivo de escurrido, con respecto a la centrifugación, debido a que las muestras centrifugadas presentan porcentajes más elevados de humedad que las muestras prensadas (García, 2005). En base a estos resultados, se seleccionó el prensado a 3 bar como el método de escurrido para abordar la congelación del grelo.

4.2. APLICACIÓN DEL PROCESO DE CONGELACIÓN AL GRELO ESCALDADO Y AL GRELO COCIDO

Teniendo en cuenta lo descrito anteriormente, se aborda la industrialización del grelo escaldado y del grelo cocido para su congelación.

Para el grelo escaldado, el proceso consta de las etapas de recepción, selección y clasificación, corte, limpieza y lavado, escaldado, enfriado, escurrido, envasado, congelación y almacenamiento en congelación.

Asimismo, para el grelo cocido, las etapas son: recepción, selección y clasificación, corte, limpieza y lavado, cocción, enfriado, escurrido, envasado, congelación y almacenamiento en congelación.

Como se puede observar, todas las etapas son comunes para ambos procesos, excepto la correspondiente al tratamiento térmico (escaldado o cocción), por lo tanto, se hará una descripción general de cada etapa. Se propone un “Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (APPCC)” para el control integral de los dos productos obtenidos.

4.2.1. Etapas del proceso de congelación

Recepción

En la planta de procesado, se reciben 50 manojos de grelos (aproximadamente 70 kg), suministrados por un productor de Santiago de Compostela (Figura 33).

Una vez tomada una muestra inicial de grelos, para su análisis, el lote se divide en dos partes, a una de las cuales se le aplica el proceso de escaldado, y a la otra parte, el proceso de cocción.



Figura 33. Recepción

Selección y clasificación

Se revisan, una a una, las hojas de los grelos y se desechan las partes dañadas o amarillas, asimismo se desechan tallos muy gruesos o largos de las plantas, todo con el fin de homogenizar la materia prima (Figura 34).



Material adecuado



Material de desecho

Figura 34. Selección y clasificación

Corte

Se procede al corte de los grelos en tres o cuatro partes, teniendo en cuenta la longitud de los mismos (Figura 35).



Figura 35. Corte

Limpieza y lavado

Los grelos se lavan por inmersión en agua, a través de la cual se le hace burbujear aire comprimido de calidad alimentaria, a una presión de 6 a 7 bar, para lograr un mejor lavado. El tiempo de lavado es de 20 min (Figura 36).



Figura 36. Limpieza y lavado

Escaldado y/o cocción

Para el escaldado, se pesan lotes de grelo de 2 kg, cada uno, y se les aplica vapor durante 2 min (Figura 37).



Figura 37. Escaldado

La cocción se efectúa en ollas de acero inoxidable en las cuales se mantiene constante la relación peso de producto/agua a 1 kg de producto/2 L de agua. Se pesan los grelos y se introducen en agua hirviendo. El tiempo de cocción es de 45 min, y se cuenta a partir del momento en que el agua comienza a hervir nuevamente (Figura 38).



Figura 38. Cocción

Enfriado

El enfriado de los grelos, tanto escaldados como cocidos, se realiza por aspersión con agua fría, durante 5 min. Posteriormente, se dejan escurrir durante unos minutos en una carcasa cilíndrica de acero inoxidable perforada con pequeños orificios (Figura 39).



Figura 39. Enfriado

Escurrido

El escurrido se lleva a cabo por prensado (tal y como se mencionó en el apartado 4.1.3. de esta sección) (Figura 40).



Figura 40. Prensado

Envasado

Se colocan aproximadamente 250 g de grelo escaldado y/o cocido en bolsas laminadas de poliamida-polietileno, a continuación, se efectúa el envasado al vacío en el equipo descrito (Figura 41).



Figura 41. Envasado

Los grelos escaldados y los grelos cocidos, tras su envasado al vacío, presentan el siguiente aspecto (Figura 42)



Figura 42. Producto envasado al vacío

Congelación

Los grelos, una vez envasados, se congelan inmediatamente en una cámara, cuya temperatura se mantiene a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, en la cual se almacenan durante 105 días.



Figura 43. Almacenamiento en congelación

4.2.2. Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (APPCC)

Objetivo

El sistema de Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (APPCC) es la mejor forma de gestionar la inocuidad de los alimentos y de llevar a cabo un autocontrol por parte de las empresas, con el fin poder garantizar la salubridad y seguridad de sus productos.

Este sistema se aplica en el sector alimentario, oficialmente a partir de la Directiva CE/43/1993 de 14 de junio, actualizada y unificada para toda la Unión Europea a través del Reglamento (CE) N° 852/2004 de 29 de abril, por el que se establecen las normas generales de higiene de los productos alimenticios, en el cual se insta a todas las empresas del sector alimentario a realizar actividades de autocontrol utilizando técnicas de análisis y control de los peligros en las diferentes fases de la cadena alimentaria.

Asimismo, las autoridades sanitarias, en cumplimiento del actual Reglamento (CE) N° 852/2004 de 29 de abril, en el que también se establecen los principios generales para la realización del control oficial de los productos alimenticios, deberán evaluar los procedimientos de buenas prácticas de fabricación, prácticas correctas de higiene y/o buenas prácticas agrícolas y, muy en particular, deberán comprobar la correcta aplicación por parte de la empresa alimentaria de los sistemas eficaces de autocontrol de acuerdo con los principios en los que se basa el sistema APPCC, atendiendo especialmente a los puntos críticos de control propuestos por la empresa.

Por lo anterior, para facilitar a los industriales del sector agroalimentario el cumplimiento de la legislación antes mencionada, se ha publicado recientemente la Norma ISO 22000:2005, la cual señala las pautas necesarias para desarrollar e implementar este sistema de autocontrol. Esta norma es aplicable a partir del 1° de enero de 2006 y los industriales podrán certificarse en el Sistema de Gestión de la Inocuidad de los Alimentos.

En esta misma línea, se presenta una guía que pueda ser utilizada por la industria que congele el grelo, y que les servirá de base para el cumplimiento de los principios del APPCC.

Programas de Prerrequisitos

Las empresas congeladoras de grelo contarán con una serie de programas que gestionarán las medidas de higiene generales y que servirán de apoyo fundamental al plan APPCC. En cada uno de estos programas se deberán especificar los elementos necesarios para el control de los peligros, medidas de seguimiento y acciones correctivas. Paralelamente, se deberán registrar los documentos generados que demuestren el cumplimiento de dichos programas.

Los programas de prerrequisitos mínimos que tendrán estas empresas serán los siguientes:

- Diseño higiénico de instalaciones, equipo y utensilios. Plan de mantenimiento preventivo.
- Plan de control de proveedores.
- Plan de control de calidad del agua.
- Plan de limpieza y desinfección (**L+D**).
- Plan de control de plagas. Desinsectización y desratización (**D+D**).
- Plan de formación y control de los manipuladores. Guía de las Correctas Prácticas de Higiene y/o Manipulación (**CPH/M**).
- Plan de Trazabilidad.

Plan de APPCC

Para dar cumplimiento a la legislación vigente, el procedimiento a seguir para elaborar el plan APPCC se esquematiza del siguiente modo:

- ✓ Identificar los peligros específicos asociados a la elaboración del producto, en todas sus fases, evaluando la posibilidad de que se produzca este hecho (riesgo).
- ✓ Indicar las medidas preventivas para su control, de manera que puedan eliminarse los peligros, o se reduzca al máximo posible su riesgo.
- ✓ Establecer el límite crítico que no deberá sobrepasarse para asegurar que el Punto Crítico de Control (PCC) está realmente bajo control.
- ✓ Establecer un sistema de vigilancia para asegurar el control de los PCC mediante el programa adecuado.
- ✓ Determinar las medidas correctoras con la finalidad de subsanar las desviaciones que pudieran producirse sobre los límites críticos, para conseguir que el PCC esté de nuevo bajo control.
- ✓ Establecer el sistema de documentación de todos los procedimientos y los registros apropiados a estos principios y su aplicación.
- ✓ Establecer el sistema de verificación encaminado a comprobar que los sistemas de vigilancia y registro están cumpliendo su función adecuadamente.

A continuación se detallan los Planes APPCC que ayudarán a garantizar la seguridad de los productos elaborados según la metodología de industrialización del grelo (*Brassica rapa*, L.) escaldado o cocido, envasado al vacío, y conservado mediante congelación.

4.2.2.1. Grelo escaldado congelado

El sistema APPCC se puede aplicar a la línea de producción de grelo (*Brassica rapa*, L.) congelado, previamente escaldado y envasado al vacío. En el manual derivado del sistema se incluyen una serie de medidas de control que abarcan todas las fases críticas de la fabricación de dicho producto, desde la recepción de los grelos hasta el almacenamiento del producto terminado.

a) Definición del producto:

Grelo (*Brassica rapa*, L.) cortado, escaldado, envasado al vacío en bolsas plásticas de poliamida-polietileno laminadas y congelado.

Especificaciones:

- **Peso neto:** según especificación en envase.
- **Peso escurrido:** según especificación en envase.
- **Color:** a definir por el panel de catadores entrenado.
- **Olor:** a definir por el panel de catadores entrenado.
- **Caducidad:** según especificación en envase (un año a partir de la fecha de fabricación).

b) Uso esperado del producto:

Consumo inmediato tras su cocción en agua, como alimento principal o como guarnición de otros platos. El producto está dirigido a un público general, por lo que puede ser consumido en hogares, restaurantes, comedores colectivos, etc.

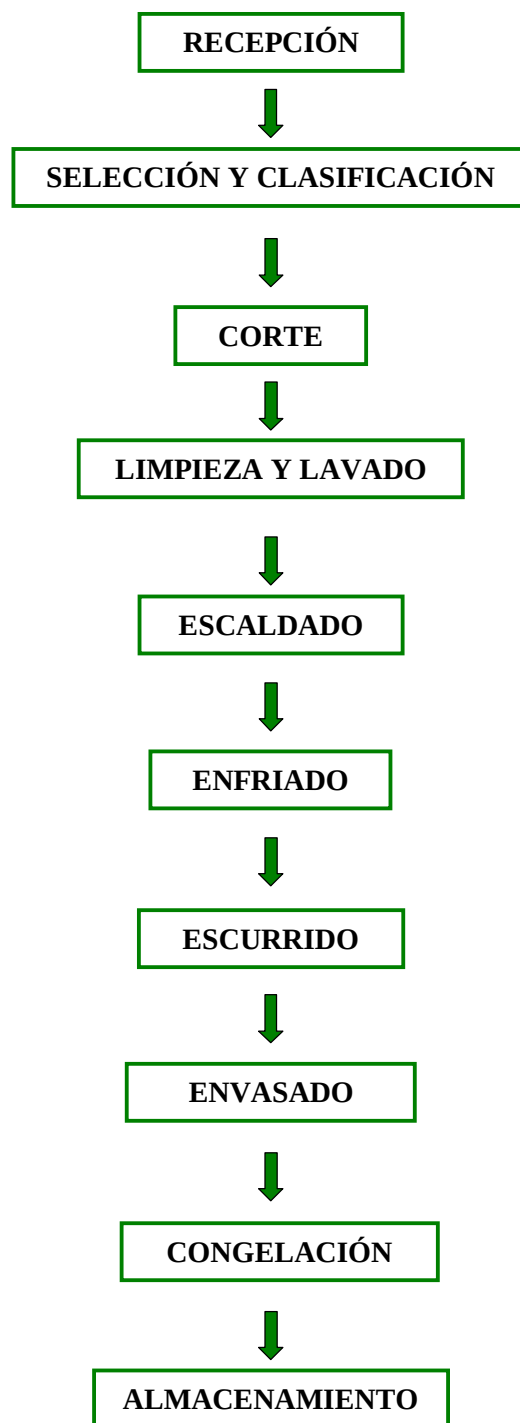


Figura 44. Diagrama de flujo del proceso de fabricación de hielo escaldado y congelado.

Tabla 23. CUADRO DE GESTIÓN: Puntos Críticos de Control aplicables en la línea de producción de grelo escaldado y envasado a vacío.

FASE (PCC)	RIESGOS	MEDIDAS DE CONTROL	LÍMITES CRÍTICOS	SEGUIMIENTO	MEDIDAS CORECTORAS	REGISTROS
Recepción de materias primas, envases y embalajes	-Contaminación física, química o microbiológica -Manipulación incorrecta	-Control de proveedores -Plan de análisis muestral. -CPH/M	-Ausencia de contaminación -Cumplimiento RD 3484/2000 -Cumplimiento plan de formación	-Inspección visual -Análisis muestral -Supervisión por responsable de producción	-Limpieza y acondicionado -Devolución partida -Refuerzo en la formación de manipuladores	-Recepción de materias primas (+albarán) -Registro laboratorio -Registro de formación
Almacenamiento inicial	-Contaminación debida a las condiciones inadecuadas del local -Deterioro debido a manipulación incorrecta	-Control L+D+D+D -CPH/M	-Cumplir especificaciones plan L+D+D+D -Cumplimiento CPH/M	-Inspección visual -Supervisión por responsable de producción.	-Destrucción producto afectado -Rectificar plan L+D+D+D -Refuerzo en la formación de manipuladores	-Registros L+D+D+D -Registro de formación
Corte	-Contaminación bacteriana o física debido a los útiles -Manipulación incorrecta	-Útiles esterilizados mediante agua a 82 °C -CPH/M	-tª esterilizador útiles <82 °C Enterobacterias: =1 ufc/cm ² -Aerobios mesófilos: =10 ufc/cm ² -Cumplimiento plan de formación	-Control tª. esterilización -Control L+D de los útiles -Supervisión por responsable de producción	-Corregir tª esterilización -Rectificar plan L+D -Refuerzo en la formación de manipuladores	-Registros tª -Registros L+D -Registro de formación

Tabla 23. CUADRO DE GESTIÓN (cont.)

FASE (PCC)	RIESGOS	MEDIDAS DE CONTROL	LÍMITES CRÍTICOS	SEGUIMIENTO	MEDIDAS CORECTORAS	REGISTROS
Limpieza y lavado	-Contaminación microbiológica y/o química del agua	-Cloración del agua del depósito -Control de la calidad del agua	-Cumplimiento RD 140/2003	-Análisis del agua según RD 140/2003	-Re-lavado con agua limpia y análisis muestral del producto -Revisión equipo cloración	-Registro de laboratorio -Registro mantenimiento
	-Higiene deficiente del equipo	-Control del plan de L+D	Enterobacterias: <1 ufc/cm ² -Aerobios mesófilos: <10 ufc/cm ²	-Control L+D del equipo	plan L+D	-Registro plan L+D
	-Manipulación incorrecta	-CPH	-Cumplimiento CPH	-Inspección visual	-Formación de manipuladores	-Registro formación
Escaldado	-Contaminación microbiológica y/o del vapor de agua.	-Control de la calidad del agua	-Cumplimiento RD 140/2003	-Análisis del agua según RD 140/2003	-Análisis muestral del producto: desechar lote no conforme	-Registro de laboratorio
	-Higiene deficiente del equipo	-Control del plan de L+D	Enterobacterias: <1 ufc/cm ² -Aerobios mesófilos: <10 ufc/cm ²	-Control L+D del equipo	-Modificación plan L+D	-Registro plan L+D
	-t ^a del tratamiento térmico y/o relación tiempo/t ^a inadecuado	-Uso de termómetro y temporizador	-Vapor/2 min.	-Control t ^a y tiempo de ebullición	-Aplicación de tratamiento térmico complementario	-Registro tiempo/t ^a

Tabla 23. CUADRO DE GESTIÓN (cont.)

FASE (PCC)	RIESGOS	MEDIDAS DE CONTROL	LÍMITES CRÍTICOS	SEGUIMIENTO	MEDIDAS CORECTORAS	REGISTROS
Enfriado y escurrido	-Contaminación del producto debida al agua -Higiene deficiente del equipo -Alteración post. por exceso de humedad	-Control de calidad del agua -Control del plan L+D -Control de la presión	-Cumplimiento RD 140/2003 - Enterobacterias: <1 ufc/cm² -Aerobios mesófilos: <10 ufc/cm² -Presión ≠ 3bar	-Análisis del agua según RD 140/2003 -Control L+D del equipo -Control manómetro	-Re-lavado con agua limpia, análisis muestral: desechar lote no conforme -Modificación plan de L+D -Ecurrido complementario	-Registro de laboratorio -Registro plan L+D -Registro manómetro
Envasado	-Recontaminación bacteriana por inadecuada manipulación -Posterior deterioro durante almacenamiento debido a un mal sellado -Manipulación incorrecta	-CPH Plan de análisis muestral -Control del sellado -CPH/M	-Cumplimiento CPH/M -Sellado hermético -Cumplimiento plan de formación	-Inspección visual -Análisis muestral -Supervisión por responsable de producción	- desechar lote no conforme -Re-sellar, re-ensasar o desechar lote no conforme -Refuerzo en la formación de manipuladores	-Registro envasado -Registro de almacenamiento -Registro de formación

Tabla 23. CUADRO DE GESTIÓN (cont.)

FASE (PCC)	RIESGOS	MEDIDAS DE CONTROL	LÍMITES CRÍTICOS	SEGUIMIENTO	MEDIDAS CORECTORAS	REGISTROS
Congelación	-Deterioro del alimento por formación de macrocristales de hielo o por una posible contaminación	-Enfriamiento en fase crítica - 1 a -5 °C en el menor tiempo posible. -CPH/M en la estiba	-Tiempo de congelación de 4 a 6 horas entre -30 a -40 °C, alcanzando -18 °C en el centro geométrico del producto	-tª del producto a intervalos regulares en cada proceso de congelación	-Corrección de condiciones frigoríficas de la cámara de congelación -Aplicar congelación correcta o desechar lote no conforme	-Registro de tiempo/tª
Almacenamiento final	-Alteraciones debidas a incorrecta temperatura de almacenamiento	-Control de la temperatura de almacenamiento	-tª de almacenamiento= -18 a -25 °C	-Termógrafo	-Instalación de grupo electrógeno auxiliar	-Registro de tª
	-Alteraciones debidas a caducidad del producto	-Control de lotes, plan muestral	-Caducidad de un año a partir de fecha de fabricación	-Control cronológico de lotes: análisis muestral	-Destrucción de lotes caducados	-Registro de lotes
	-Contaminación microbiana	-Análisis de cada lote antes de salir al mercado	-Cumplimiento RD 3484/2000	-Análisis muestral	-Destrucción lotes no conformes	-Registro de laboratorio

c) Procedimientos de validación y verificación del plan APPCC.

Una vez implantado el sistema APPCC, y después del primer período de funcionamiento del mismo, es obligatorio realizar su validación para demostrar que controla efectivamente los peligros significativos que afectan a la inocuidad de estos alimentos. Dicha validación consistirá en una exhaustiva auditoria interna que se llevará a cabo de forma planificada y sistemática.

Posteriormente, y de forma continuada, se deberá seguir constatando que las prácticas y procedimientos que se aplican, son los que están consignados por escrito en el sistema de gestión de inocuidad de los alimentos. Para ello se deberá realizar la planificación de una serie de exámenes sistemáticos e independientes (verificación) que deberán incluir:

- observaciones “in situ” o inspección visual
- entrevistas
- auditorías de revisión

Todos estos exámenes deben abarcar el sistema completo, los programas de prerequisites y el plan APPCC.

El tipo de examen a realizar está ligado a la frecuencia con que se realice, así las inspecciones visuales pueden tener una mayor frecuencia (por ejemplo, para comprobar que se ha aplicado una medida correctora) o en el caso de las auditorias de funcionamiento de todo el sistema, la frecuencia será menor (mínimo una por año).

Siempre hay que tener en cuenta que obligatoriamente se realizará una validación y/o verificación cada vez que se produzca un fallo en el sistema, desviaciones recurrentes o cuando se introduzcan novedades.

4.2.2.2. Grelo cocido congelado

El sistema APPCC se puede aplicar a la línea de producción de grelo (*Brassica rapa*, L.) congelado, previamente cocido y envasado al vacío. En el manual derivado del sistema se incluyen una serie de medidas de control que abarcan todas las fases críticas de la fabricación de dicho producto, desde la recepción de los grelos hasta el almacenamiento del producto terminado.

a) Definición del producto:

Grelo (*Brassica rapa*, L.) cortado, cocido, envasado al vacío en bolsas plásticas de poliamida-polietileno laminadas y congelado.

Especificaciones:

- **Peso neto:** según especificación en envase.
- **Peso escurrido:** según especificación en envase.
- **Color:** a definir por el panel de catadores entrenado.
- **Olor:** a definir por el panel de catadores entrenado.
- **Caducidad:** según especificación en envase (un año a partir de la fecha de fabricación).

b) Uso esperado del producto:

Consumo inmediato tras su descongelación en agua, como alimento principal o como guarnición de otros platos. El producto está dirigido a un público general, por lo que puede ser consumido en hogares, restaurantes, comedores colectivos, etc.

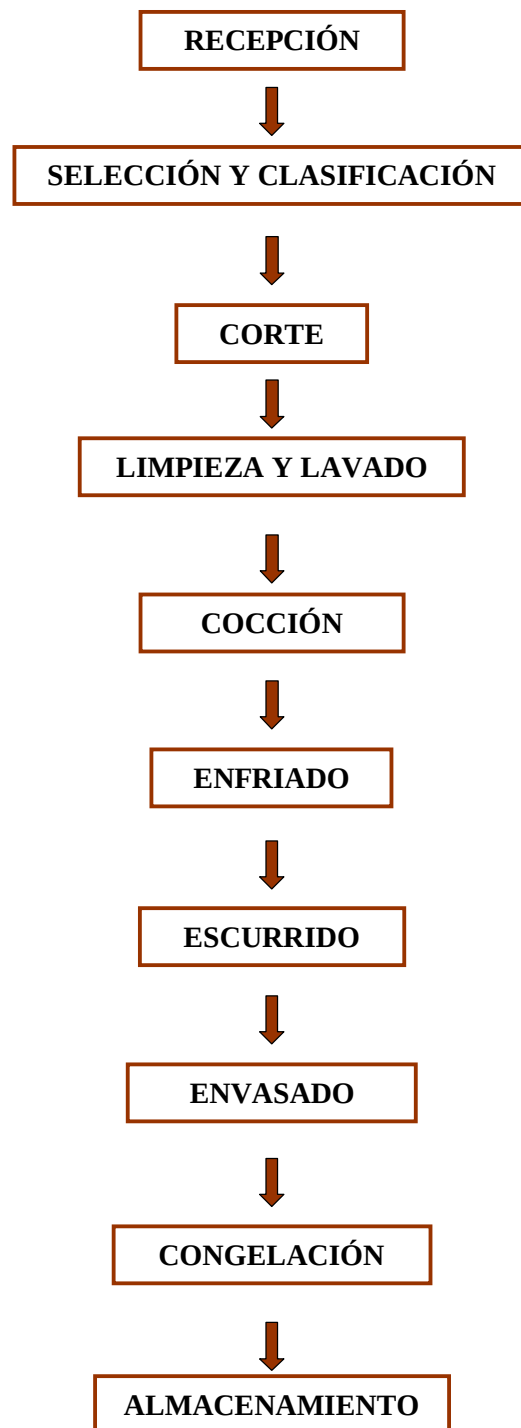


Figura 45. Diagrama de flujo del proceso de fabricación de grelo cocido y congelado.

Tabla 24. CUADRO DE GESTIÓN: Puntos Críticos de Control aplicables en la línea de producción de gredo cocido y envasado a vacío.

FASE (PCC)	RIESGOS	MEDIDAS DE CONTROL	LÍMITES CRÍTICOS	SEGUIMIENTO	MEDIDAS CORECTORAS	REGISTROS
Recepción de materias primas, envases y embalajes	-Contaminación física, química o microbiológica -Manipulación incorrecta	-Control de proveedores -Plan de análisis muestral. -CPH/M	-Ausencia de contaminación -Cumplimiento RD 3484/2000 -Cumplimiento plan de formación	-Inspección visual -Análisis muestral -Supervisión por responsable de producción	-Limpieza y acondicionamiento -Devolución partida -Refuerzo en la formación de manipuladores	-Recepción de materias primas (+albarán) -Registro laboratorio -Registro de formación
Almacenamiento inicial	-Contaminación debida a las condiciones inadecuadas del local -Deterioro debido a manipulación incorrecta	-Control L+D+D+D -CPH/M	-Cumplir especificaciones plan L+D+D+D -Cumplimiento CPH/M	-Inspección visual -Supervisión por responsable de producción.	-Destrucción producto afectado -Rectificar plan L+D+D+D -Refuerzo en la formación de manipuladores	-Registros L+D+D+D -Registro de formación
Corte	-Contaminación bacteriana o física debido a los útiles -Manipulación incorrecta.	-Útiles esterilizados mediante agua a 82 °C -CPH/M	-tª esterilizador útiles <82 °C Enterobacterias: =1 ufc/cm ² -Aerobios mesófilos: =10 ufc/cm ² -Cumplimiento plan de formación	-Control tª. esterilización -Control L+D de los útiles -Supervisión por responsable de producción	-Corregir tª esterilización -Rectificar plan L+D -Refuerzo en la formación de manipuladores	-Registros tª -Registros L+D -Registro de formación

Tabla 24. CUADRO DE GESTIÓN (cont.)

FASE (PCC)	RIESGOS	MEDIDAS DE CONTROL	LÍMITES CRÍTICOS	SEGUIMIENTO	MEDIDAS CORECTORAS	REGISTROS
Limpieza y lavado	-Contaminación microbiológica y/o química del agua -Higiene deficiente del equipo -Manipulación incorrecta	-Cloración del agua del depósito -Control de la calidad del agua -Control del plan de L+D -CPH	-Cumplimiento RD 140/2003 -Enterobacterias: <1 ufc/cm² -Aerobios mesófilos: <10 ufc/cm² -Cumplimiento CPH	-Análisis del agua según RD 140/2003 -Control L+D del equipo -Inspección visual	-Re-lavado con agua limpia y análisis muestral del producto -Revisión equipo cloración - plan L+D -Formación de manipuladores	-Registro de laboratorio -Registro mantenimiento -Registro plan L+D -Registro formación
Cocción	-Contaminación microbiológica y/o del vapor de agua -Higiene deficiente del equipo -tª del tratamiento térmico y/o relación tiempo/tª inadecuado	-Control de la calidad del agua -Control del plan de L+D -Uso de termómetro y temporizador	-Cumplimiento RD 140/2003 -Enterobacterias: <1 ufc/cm² -Aerobios mesófilos: <10 ufc/cm² -Agua en ebullición/45min.	-Análisis del agua según RD 140/2003 -Control L+D del equipo -Control tª y tiempo de ebullición	-Análisis muestral del producto: desechar lote no conforme -Modificación plan L+D -Aplicación de tratamiento térmico complementario	-Registro de laboratorio -Registro plan L+D -Registro tiempo/tª

Tabla 24. CUADRO DE GESTIÓN (cont.)

Enfriado y escurrido	-Contaminación del producto debida al agua	-Control de calidad del agua	-Cumplimiento RD 140/2003	-Análisis del agua según RD 140/2003	-Re-lavado con agua limpia, análisis muestral: desechar lote no conforme	-Registro de laboratorio
	-Higiene deficiente del equipo	-Control del plan L+D	Enterobacterias: <1 ufc/cm ² -Aerobios mesófilos: <10 ufc/cm ²	-Control L+D del equipo	-Modificación plan de L+D	-Registro plan L+D
	-Alteración post. por exceso de humedad	-Control de la presión	-Presión ≠ 3bar	-Control manómetro	-Ecurrido complementario	-Registro manómetro
Envasado	-Recontaminación bacteriana por inadecuada manipulación	-CPH Plan de análisis muestral	-Cumplimiento CPH/M	-Inspección visual	- desechar lote no conforme	-Registro envasado
	-Posterior deterioro durante almacenamiento debido a un mal sellado	-Control del sellado	-Sellado hermético	-Análisis muestral	-Re-sellar, re-ensasar o desechar lote no conforme	-Registro de almacenamiento
	-Manipulación incorrecta	-CPH/M	-Cumplimiento plan de formación	-Supervisión por responsable de producción	-Refuerzo en la formación de manipuladores	-Registro de formación

Tabla 24. CUADRO DE GESTIÓN (cont.)

FASE (PCC)	RIESGOS	MEDIDAS DE CONTROL	LÍMITES CRÍTICOS	SEGUIMIENTO	MEDIDAS CORECTORAS	REGISTROS
Congelación	-Deterioro del alimento por formación de macrocristales de hielo o por una posible contaminación	-Enfriamiento en fase crítica -1 a -5 °C en el menor tiempo posible. -CPH/M en la estiba	-Tiempo de congelación de 4 a 6 horas entre -30 a -40 °C, alcanzando -18 °C en el centro geométrico del producto	-tª del producto a intervalos regulares en cada proceso de congelación	-Corrección de condiciones frigoríficas de la cámara de congelación -Aplicar congelación correcta o desechar lote no conforme	-Registro de tiempo/tª
Almacenamiento final	-Alteraciones debidas a incorrecta temperatura de almacenamiento	-Control de la temperatura de almacenamiento	-tª de almacenamiento=-18 a -25 °C	-Termógrafo	-Instalación de grupo electrógeno auxiliar	-Registro de tª
	-Alteraciones debidas a caducidad del producto	-Control de lotes, plan muestral	-Caducidad de un año a partir de fecha de fabricación	-Control cronológico de lotes: análisis muestral	-Destrucción de lotes caducados	-Registro de lotes
	-Contaminación microbiana	-Análisis de cada lote antes de salir al mercado	-Cumplimiento RD 3484/2000	-Análisis muestral	-Destrucción lotes no conformes	-Registro de laboratorio

c) Procedimientos de validación y verificación del plan APPCC

Una vez implantado el sistema APPCC, y después del primer período de funcionamiento del mismo, es obligatorio realizar su validación para demostrar que controla efectivamente los peligros significativos que afectan a la inocuidad de estos alimentos. Dicha validación consistirá en una exhaustiva auditoria interna que se llevará a cabo de forma planificada y sistemática.

Posteriormente, y de forma continuada, se deberá seguir constatando que las prácticas y procedimientos que se aplican, son los que están consignados por escrito en el sistema de gestión de inocuidad de los alimentos. Para ello se deberá realizar la planificación de una serie de exámenes sistemáticos e independientes (verificación) que deberán incluir:

- observaciones “in situ” o inspección visual
- entrevistas
- auditorías de revisión

Todos estos exámenes deben abarcar el sistema completo, los programas de prerrequisitos y el plan APPCC.

El tipo de examen a realizar está ligado a la frecuencia con que se realice, así las inspecciones visuales pueden tener una mayor frecuencia (por ejemplo, para comprobar que se ha aplicado una medida correctora) o en el caso de las auditorias de funcionamiento de todo el sistema, la frecuencia será menor (mínimo una por año).

Siempre hay que tener en cuenta que obligatoriamente se realizará una validación y/o verificación cada vez que se produzca un fallo en el sistema, desviaciones recurrentes o cuando se introduzcan novedades.

4.3. PUESTA PUNTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

Para la determinación de vitaminas (B_1 , B_2 y C) y pigmentos en el grelo, fue necesario poner a punto las técnicas de extracción y detección mediante HPLC, y posteriormente validar tales métodos. En lo que se refiere a la determinación de fenoles totales, se realizó la recta de calibración correspondiente.

4.3.1. Vitaminas B_1 y B_2 (tiamina y riboflavina).

4.3.1.1. Condiciones cromatográficas

a) Longitudes de onda óptimas para tiamina y riboflavina

Se seleccionaron las longitudes de onda indicadas por Sims y Shoemaker (1993) y Sánchez-Machado y col. (2004). Así, se utilizó para la determinación de la tiamina, las longitudes de onda de excitación de 370 nm y de emisión de 435 nm, y para la evaluación de la riboflavina, como longitud de onda de excitación 370 nm, y como longitud de onda de emisión 520 nm.

b) Columnas cromatográficas

Se probaron cuatro columnas, una Spherisorb ODS2 (*Waters*), una Kromasil 100 C_{18} , una Luna C_{18} (2), éstas últimas de *Phenomenex*, y una Kromasil 100 C_{18} de *Teknokroma*, todas con dimensiones de 250 mm $\times$ 4.6 mm, empacadas con partículas de 5 μ m. Se obtuvo una mejor resolución de los picos con las columnas Luna C_{18} (2) de *Phenomenex* y Kromasil 100 C_{18} de *Teknokroma*, por lo que cualquiera de ellas es válida para realizar la determinación de ambas vitaminas.

c) Fase móvil

Sims y Shoemaker (1993) indican que el comportamiento de las vitaminas sobre las columnas C_{18} es dependiente tanto del pH de la fase móvil, como de la concentración de metanol que se le adicione. Por lo tanto, para seleccionar la fase móvil más adecuada, se realizaron ensayos preliminares con acetato de amonio 0.005 M a tres pH distintos (sin tamponar, 6.0 y 5.0), probándose dos composiciones diferentes de la mezcla de acetato de

amonio 0.005 M y metanol (72:28 y 70:30). Inicialmente, la mezcla de acetato de amonio 0.005 M y metanol (70:30) quedó descartada porque los picos cromatográficos salían con un hombro al final de los mismos, a diferencia de los obtenidos con la proporción 72:28.

Con referencia al pH de trabajo, en la Figura 46 se puede observar que el cambio del pH en el tampón de la fase móvil ejerce una fuerte influencia. La utilización de una fase móvil sin tamponar proporciona áreas más elevadas y tiempos de retención más largos, en ambas vitaminas. Por otro lado, la fase móvil a pH 6.0 provoca un adelanto en la aparición de ambos picos, siendo las áreas un poco menores a las obtenidas con la fase móvil anterior. Finalmente, la fase móvil a pH 5.0, también provoca un adelanto en ambos picos, más notorio en el caso de la vitamina B₁, que en el de la B₂, sin embargo las áreas de los picos disminuyen de forma importante en comparación a las otras dos fases móviles. Teniendo en cuenta la mayor área obtenida y la reproducibilidad del experimento al controlar el pH, se decidió utilizar la fase móvil a pH 6.0. Por tanto, la fase móvil de trabajo está compuesta por acetato de amonio 0.005 M a pH 6.0 y metanol (72:28).

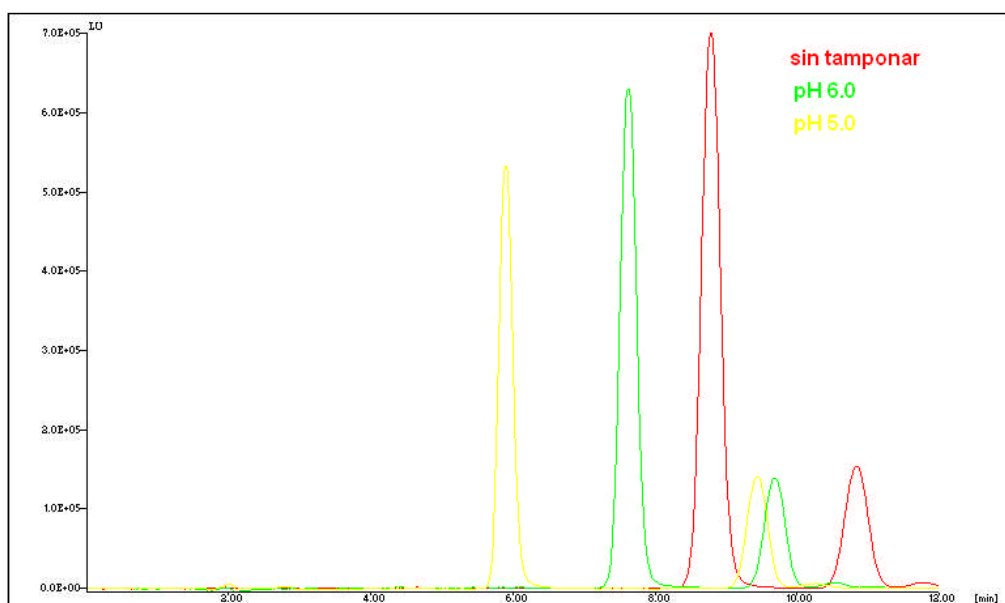


Figura 46. Efecto del pH de la fase móvil sobre los tiempos de retención y las áreas de vitaminas B₁ y B₂.

d) Flujo

Para determinar este parámetro se probaron las dos columnas seleccionadas previamente, la primera de *Phenomenex* y la segunda de *Teknokroma*, en las cuales se analizaron diferentes flujos (0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.1, 1.2, 1.3 y 1.35 mL/min) determinándose que la presión ejercida es menor para la columna de *Teknokroma*. Asimismo, en esta columna el tiempo de retención de la riboflavina es más corto (10.25 minutos) y el área del pico es más elevada.

Se selecciona definitivamente la columna Kromasil 100 C₁₈, a un flujo de 0.8 mL/min (Hägg, 1994). La temperatura seleccionada en el horno de columna fue de 35 °C ya que a temperaturas más bajas, los tiempos de retención varían mucho, y las temperaturas más altas acortan la vida útil de la columna.

4.3.1.2. Extracción de las vitaminas

a) Hidrólisis enzimática

Para la determinación de tiamina total, es necesario realizar una hidrólisis enzimática con una enzima que contenga fosfatasa, tal como la claradiastasa o la takadiastasa, con el fin de convertir los ésteres de fosfato en tiamina. Asimismo, para el análisis de riboflavina total, se usa esta enzima para liberar las coenzimas de las proteínas, a las cuales están unidas, y entonces poder ser hidrolizadas a riboflavina (Russell, 2000).

El problema de poner en exceso la enzima en relación con el peso de la muestra, ya ha sido señalado por Berg y col. (1996). Estos autores indican que al usar una relación enzima/muestra de 100 mg de takadiastasa/g de muestra, se produce una señal en el “blanco” en el tiempo de retención correspondiente a la tiamina que representa, al menos, el 10% del contenido total de la vitamina en el extracto de las muestras analizadas. Por lo tanto, en primer lugar, fue necesario establecer la cantidad óptima de enzima a adicionar. Se procedió a realizar un ensayo en blanco tratando como muestra 1 mL de agua milli-Q, y los resultados indicaron que efectivamente se producían importantes señales a los tiempos de retención de las dos vitaminas (Figura 47). Cabe señalar que dentro del proceso de extracción se realizan dos tipos: la ácida y la enzimática, por lo tanto, se analizó la señal que daba la hidrólisis ácida siendo ésta no significativa, por lo que la investigación se enfocó a la hidrólisis enzimática.

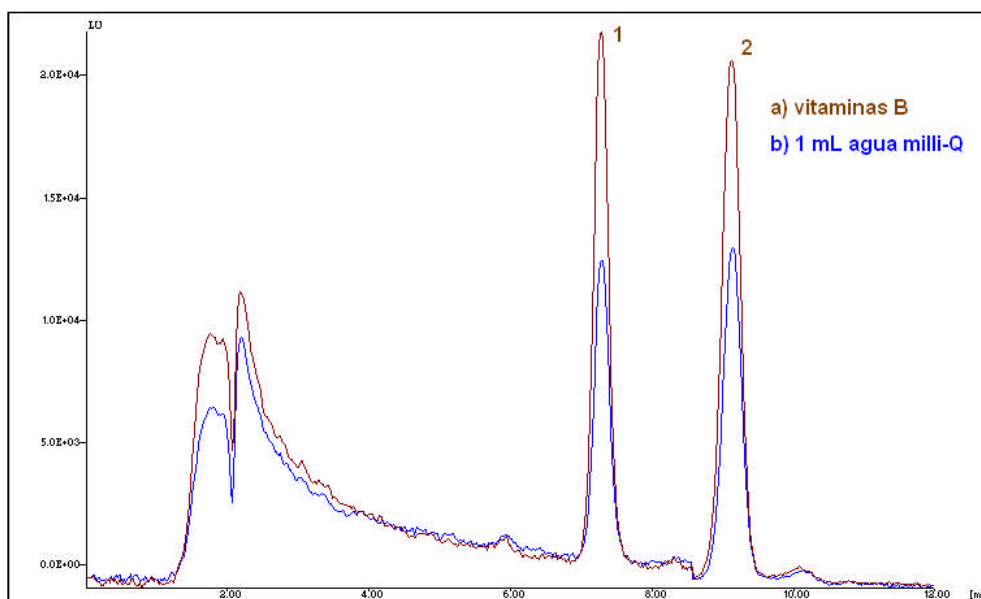


Figura 47. Cromatogramas de a) una mezcla patrón de vitaminas B₁ y B₂, y b) 1 mL de agua milli-Q tratado como una muestra.

Dado que, se comprobó que la casa comercial que fabrica la enzima claradiastasa había dejado de fabricar la que se había usado en la mayoría de los trabajos científicos, y la que comercializa actualmente (que es la utilizada en este trabajo) presenta una actividad bastante más elevada (53 U/mg), se procedió a realizar un nuevo ensayo, en el cual se adicionaron las cantidades de 1, 5, 8, 10, 25, 50 y 75 mg de claradiastasa a 1 mL de agua milli-Q (pruebas en blanco). Los resultados indicaron que la cantidad de 10 mg de claradiastasa era la más adecuada, porque produjo la más baja respuesta a los tiempos de retención de las dos vitaminas.

Para comprobar si la cantidad de 10 mg de claradiastasa era la más adecuada, se realizaron experimentos de recuperación con una mezcla de patrones conteniendo 0.0755 y 0.152 $\mu\text{g/mL}$ de vitaminas B₁ y B₂, respectivamente. Se adicionaron 5, 8 y 10 mg de claradiastasa, respectivamente, a 1 mL de la mezcla de patrones ya mencionada, y los resultados indicaron que 10 mg de claradiastasa era la más adecuada ya que con esta cantidad se obtuvo un porcentaje de recuperación del 97 %.

b) pH para la actividad de la enzima

Aunque se recomienda que el pH para la actividad de la enzima claradiastasa esté entre 4.3 y 4.7 (Sánchez-Machado y col., 2004), se decidió acortar este rango y situarlo entre 4.4 y 4.5 ya que se encontró una mejor reproducibilidad de resultados.

c) Cantidad de muestra fresca

Se realizaron ensayos para determinar la cantidad de muestra que se debería usar para la extracción de las vitaminas, para ello se analizaron muestras de nabiza. Se partió inicialmente de 1 g de muestra (Sánchez-Machado y col., 2004) que se trató con 10 mg de claradiastasa, obteniéndose concentraciones de vitaminas B₁ y B₂, muy por debajo de las reportadas (Tabla 25).

Tabla 25. Contenido en vitaminas B₁ y B₂ de muestras de nabizas (primer ensayo).

muestras	vitamina B ₁ ^a		vitamina B ₂ ^a	
	valores bibliográficos	valores obtenidos	valores bibliográficos	valores obtenidos
nabiza	0.21 ¹ 0.06 ²	0.02	0.39 ¹ 0.20 ²	0.02

mg/100 g^a; Simal y col., 1983¹; Mataix y col., 2003².

Por lo anterior, se procedió a realizar un segundo ensayo con nabizas. Para ello y teniendo en cuenta las referencias bibliográficas acerca de los contenidos en vitaminas B₁ y B₂ para esta hortaliza, se pesó aproximadamente 0.0040 g de muestra liofilizada, (que contenga alrededor de 0.0755 y 0.152 µg/mL de vitaminas B₁ y B₂, respectivamente), la cual fue tratada con 10 mg de claradiastasa. Las concentraciones obtenidas para ambas vitaminas alcanzan valores similares a los recogidos en la bibliografía (Tabla 26).

Tabla 26. Contenido en vitaminas B₁ y B₂ de muestras de nabizas (segundo ensayo).

muestras	vitamina B ₁ ^a		vitamina B ₂ ^a	
	valores bibliográficos	valores obtenidos	valores bibliográficos	valores obtenidos
nabiza	0.21 ¹ 0.06 ²	0.23	0.39 ¹ 0.20 ²	0.21

mg/100 g^a; Simal y col., 1983¹; Mataix y col., 2003².

4.3.1.3. Extracción en fase sólida (EFS), tras derivatización de vitamina B₁.

Inicialmente se procedió a determinar que cartucho era el más adecuado para la extracción en fase sólida. Para ello, se probaron los cartuchos Strata C₁₈-E de *Phenomenex* y los cartuchos Sep-Pak Vac 1 mL (100 mg) C₁₈ de *Waters*. Con los primeros se obtuvo un rendimiento del 55.21 %, y con los cartuchos Sep-Pak, este aumentó a 64.54 %, siendo éstos últimos los que se eligieron para seguir optimizando la extracción en fase sólida.

Todo el protocolo, definido para cartuchos Sep-Pak de 10 mL, por Sánchez-Machado y col. (2004), se tuvo que optimizar para los cartuchos de 1 mL y se encontró que 2 mL de metanol y acetato de amonio eran las cantidades más adecuadas para activar el cartucho, asimismo 2 mL de la muestra oxidada fue la cantidad utilizada para la extracción. El cambio más significativo se obtuvo al optimizar la parte del lavado y elución de muestras, ya que inicialmente se usaba como soluciones de lavado y elución, acetato de amonio 0.005 M y fase móvil (acetato de amonio 0.005 M-metanol, 72:28) (Sánchez-Machado y col., 2004), respectivamente. Tras ensayar varias combinaciones, finalmente se observó que al usar 2 mL de una solución de lavado con acetato de amonio 0.005 M pH 6.0 y metanol (95:5), y 2 mL de una solución de elución con acetato de amonio 0.005 M pH 6.0 y metanol (60:40), se obtienen resultados mucho mejores ya que las áreas de los picos cromatográficos se incrementaron en alrededor de un 30%.

4.3.1.4. Separación cromatográfica de tiamina y riboflavina

Inicialmente, se había contemplado la determinación simultánea de tiamina y riboflavina (Sims y Shoemaker, 1993; Sánchez-Machado y col., 2004), pero se encontró que la riboflavina se degradaba cuando se efectuaba el proceso de derivatización y extracción en fase sólida, necesarios para que la tiamina presente fluorescencia (Figura 48). Por lo tanto, se decidió determinar por separado ambas vitaminas.

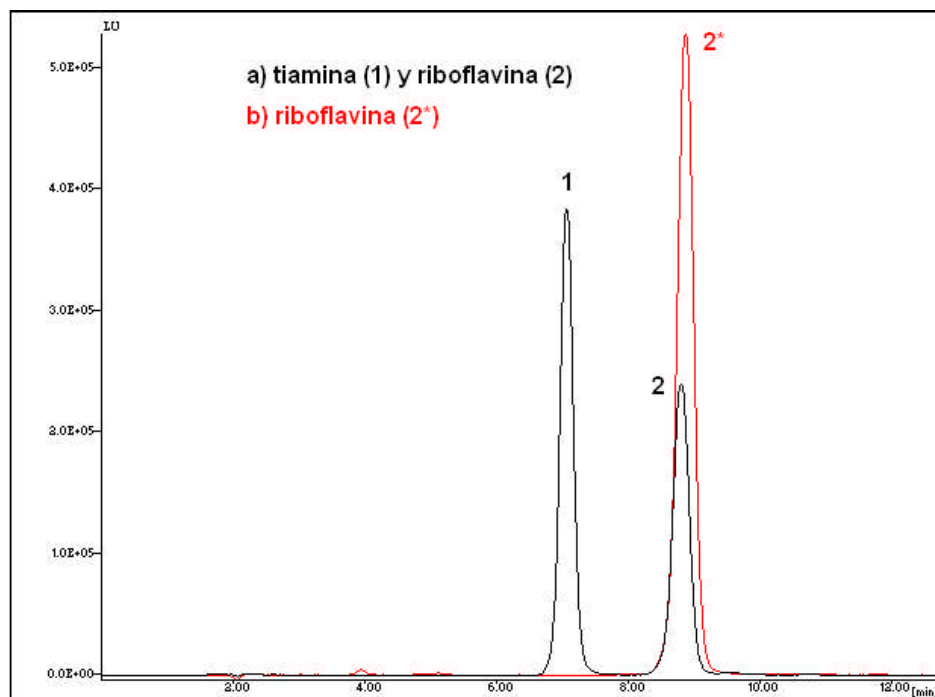


Figura 48. Determinación a) simultánea y b) por separado, de tiamina y riboflavina.

4.3.1.5. Parámetros de validación del método

Tiamina

Los parámetros de validación para la extracción y cuantificación de la tiamina, como tiocromo, fueron los siguientes:

- La precisión del método, expresada como porcentaje del coeficiente de variación (% CV), se obtuvo al someter 5 muestras de concentración conocida de tiamina,

por duplicado, a los procesos de extracción y cuantificación, obteniéndose un valor de **3.99 %**, considerado satisfactorio.

- La precisión de la medida, expresada como % CV, se consiguió al inyectar por duplicado 6 veces una misma muestra de tiamina tratada, y el valor obtenido de **0.81 %** se considera muy adecuado.
- El porcentaje de recuperación, se obtuvo al comparar un patrón de tiamina, cuantificado directamente, y el promedio de la cuantificación de 5 patrones de tiamina sometidos al proceso de extracción de la muestra. El valor obtenido fue de **109.30 %**.
- En cuanto a la recta de calibración (Tabla 27), se prepara una solución madre que contiene 151 µg/mL que se diluye en etanol al 20 % a pH 3.5-4.3 (Sims y Shoemaker, 1993; Hägg, 1994). Esta solución se protege de la luz y se almacena a 4 °C. A partir de la misma, se preparan los patrones para la recta de calibración, donde se parte de una concentración de 0.075 µg/mL y de la cual se toman alícuotas de 5, 10, 15 y 20 mL, y se enrasan a 25 mL, para obtener concentraciones de 0.015, 0.030, 0.045 y 0.060 µg/mL. Asimismo, a partir de la concentración de 0.030 µg/mL, se prepara una dilución 1/10 para obtener la concentración de 0.0030 µg/mL. Una alícuota de cada patrón (1 mL) se trata como una muestra para transformar la tiamina en tiocromo. Para la recta de calibración, las áreas que se obtienen de cada patrón se representan frente a su concentración correspondiente (desde 0.0030 hasta 0.0600 µg/mL) (Figura 49) y se logra un coeficiente de correlación de **0.9997**, similar a los obtenidos por Valls y col. (1999a) ($r= 0.9996$) y por Sánchez-Machado y col. (2004) ($r= 0.9998$).
- El método utilizado para determinar el límite de detección está basado en las directrices de la American Chemical Society (1980) las cuales indican que el límite de detección es igual a la concentración del analito que proporciona una

señal 3 veces superior al ruido. El límite de detección para tiamina fue de **0.00015 µg/mL**. El valor encontrado señala que la sensibilidad del método es adecuada para cuantificar cualquier valor encontrado en hortalizas de hoja verde.

Tabla 27. Datos de la recta de calibración para tiamina

concentración ^a	área
0.0030	231067.00
0.0150	1317839.50
0.0300	2513631.00
0.0450	3955797.50
0.0600	5210874.12
a	87309783.5620
b	-23488.6836
r	0.9997

^aµg/mL.

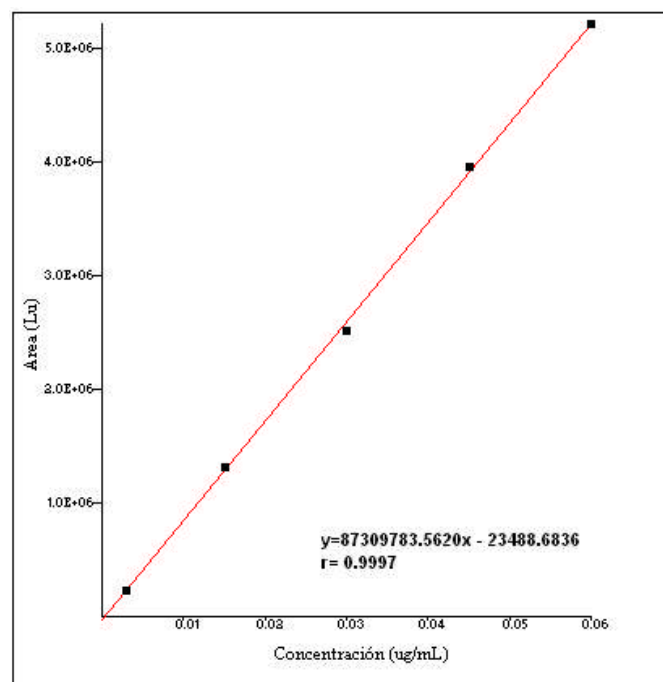


Figura 49. Recta de calibración para tiamina

Riboflavina

Los parámetros de validación para la extracción y cuantificación de la riboflavina, fueron los siguientes:

- La precisión del método, expresada como porcentaje del coeficiente de variación (% CV), se obtuvo al someter 6 muestras de concentración conocida de riboflavina, por duplicado, a los procesos de extracción y cuantificación, consiguiendo un valor de **0.77 %**, más bajo que los reportados por Sims y Shoemaker (1993), Hägg (1994), Valls y col. (1999b) y Sánchez-Machado y col. (2004).
- La precisión de la medida, expresada como % CV, se consiguió al inyectar por duplicado 6 veces una misma muestra de riboflavina tratada, y el valor obtenido de **0.22 %** se considera muy adecuado.
- El porcentaje de recuperación, se obtuvo al comparar un patrón de riboflavina, cuantificado directamente, y el promedio de la cuantificación de 6 patrones de riboflavina sometidos al proceso de extracción. El valor obtenido fue de **99.21 %**, más alto que el conseguido por Valls y col. (1999b) y Sánchez-Machado y col. (2004).
- Con respecto a la recta de calibración (Tabla 28) se prepara una solución madre que contiene 310 µg /mL que se diluye en ácido acético 0.02 N (Sims y Shoemaker, 1993). De igual forma que para la tiamina, esta solución se protege de la luz y se almacena a 4 °C. A partir de la misma, se preparan los patrones para la recta de calibración, donde se parte de una concentración de 0.155 µg/mL y de la cual se toman alícuotas de 5, 10, 15 y 20 mL, y se enrasan a 25 mL, para obtener concentraciones de 0.031, 0.062, 0.093 y 0.124 µg/mL. Asimismo, a partir de las concentraciones de 0.031 y 0.062 µg/mL (se hace una dilución 1/10, respectivamente), se obtienen las concentraciones de 0.0031 y 0.0062 µg/mL. Para la recta de calibración, las áreas que se obtienen de cada patrón se representan

frente a su concentración correspondiente (desde 0.0031 hasta 0.1550 µg/mL) (Figura 50) y se logra un coeficiente de correlación de **0.9999**, similar al reportado por Valls y col. (1999b) ($r= 0.9993$) y por Sánchez-Machado y col. (2004) ($r= 0.9996$).

- El método utilizado para determinar el límite de detección, fue el mismo que para la tiamina, encontrándose un valor de **0.000103 µg/mL**, menor a 0.00020 µg/mL, presentado por Sánchez-Machado y col. (2004). El valor indica que la sensibilidad del método es adecuada para cuantificar cualquier cantidad de vitamina encontrada en hortalizas de hoja verde

Tabla 28. Datos de la recta de calibración para riboflavina

concentración ^a	área
0.0031	272669.75
0.0062	530083.31
0.0310	2745240.50
0.0620	5629198.63
0.0930	8354515.75
0.1240	11202211.50
0.1550	13872256.75
a	89926897.6520
b	-6153.5165
r	0.9999

^aµg/mL.

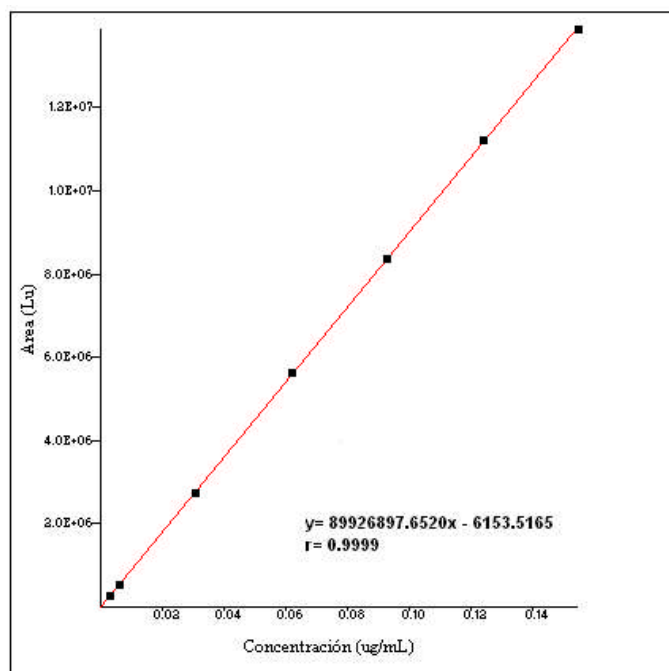


Figura 50. Recta de calibración para riboflavina

4.3.1.6. Cromatogramas

En las Figuras 51 y 52 se recogen los cromatogramas de los patrones de tiamina y riboflavina, y en las Figuras 53 y 54, a modo de ejemplo, los correspondientes a la determinación de tiamina y riboflavina en grelo fresco, grelo escaldado y grelo cocido.

A partir de las áreas obtenidas para cada una de las muestras, y en base a la recta de calibración de cada vitamina, se obtuvieron las concentraciones correspondientes de tiamina y riboflavina en cada una de ellas (ver sección de resultados de vitaminas B₁ y B₂).

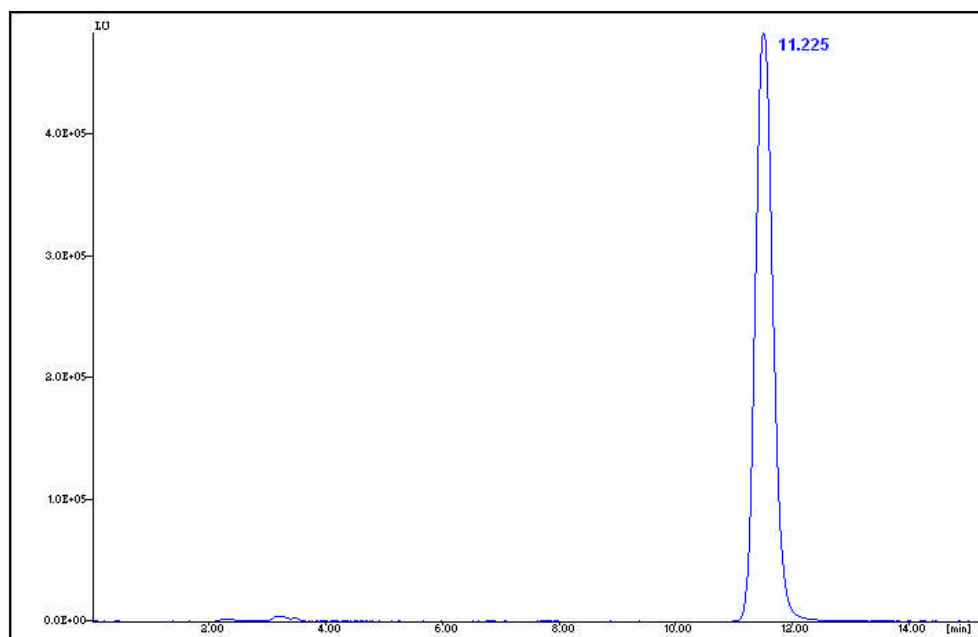


Figura 51. Cromatograma de un patrón de tiamina.

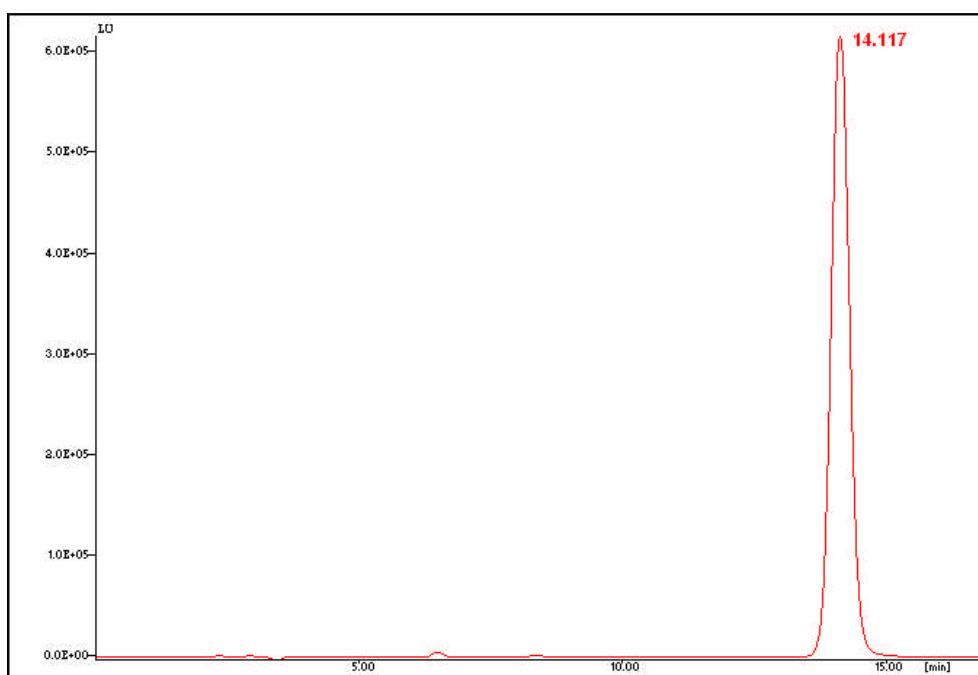


Figura 52. Cromatograma de un patrón de riboflavina.

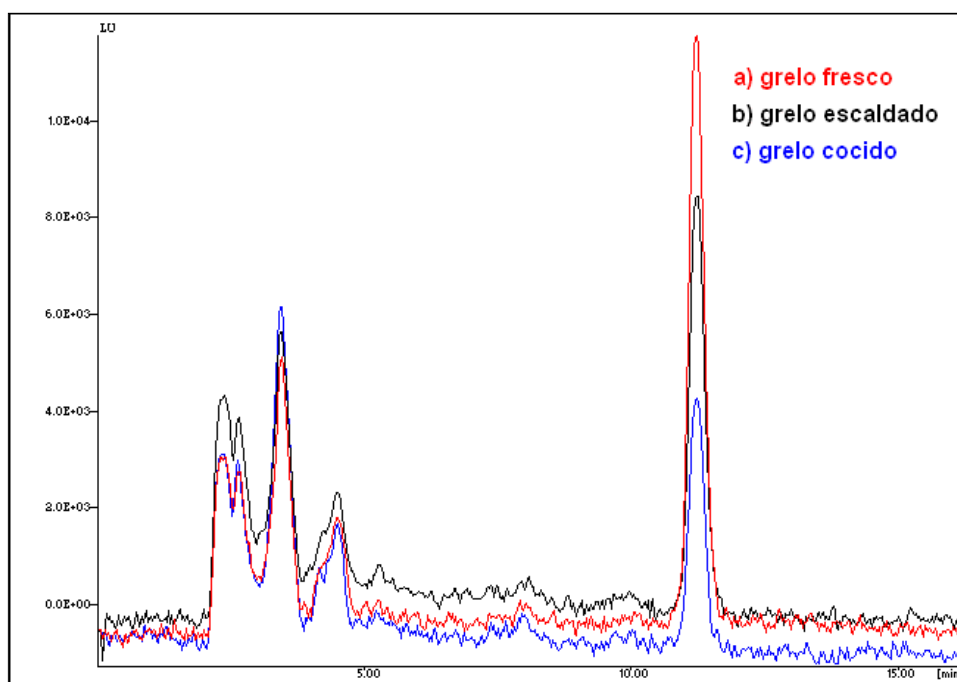


Figura 53. Cromatogramas de tiamina en muestras de a) grelo fresco, b) grelo escaldado y c) grelo cocido.

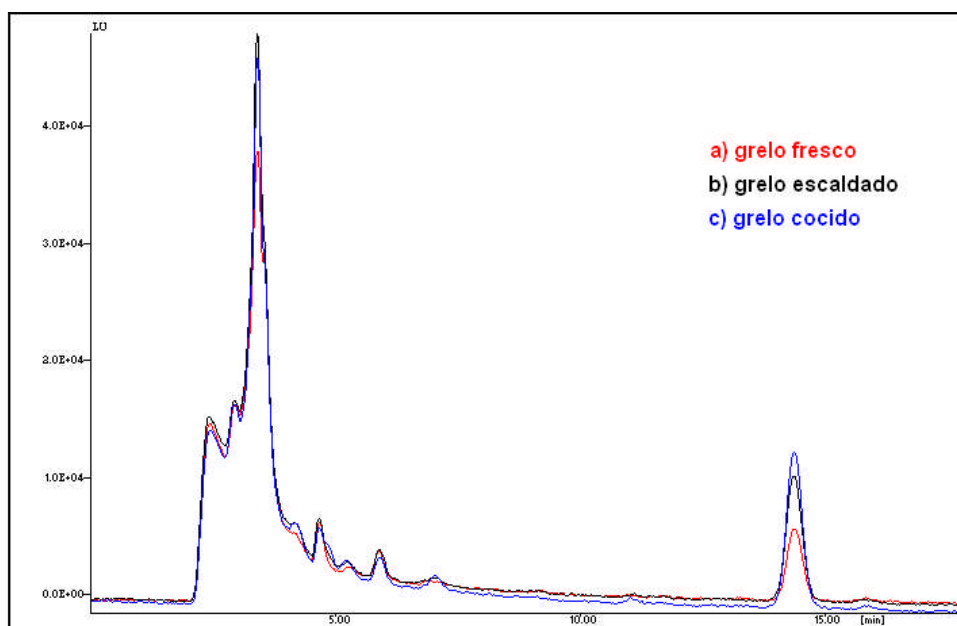


Figura 54. Cromatogramas de riboflavina en muestras de a) grelo fresco, b) grelo escaldado y c) grelo cocido.

4.3.2. Ácido ascórbico y ácido dehidroascórbico

4.3.2.1. Condiciones cromatográficas

Para la determinación del ácido ascórbico, se usó una columna Spherisorb ODS2, de Waters, con dimensiones de 250 mm × 4.6 mm y empacada con partículas de 5 µm, mantenida a temperatura ambiente. La fase móvil fue una solución de fosfato de potasio dibásico (KH₂PO₄) 0.2 M (tamponada a pH 2.4) y el flujo de 0.8 mL/min.

En primer lugar fue necesario conocer la longitud de onda a la cual se iba a trabajar, por ello se realizó un barrido de longitudes de onda en el espectrofotómetro, para un patrón de ácido ascórbico de concentración conocida, preparado en la fase móvil antes mencionada y se confirmó que la más adecuada era 254 nm (Figura 55) (Gökmen y col., 2000; Gökmen y col., 2005).

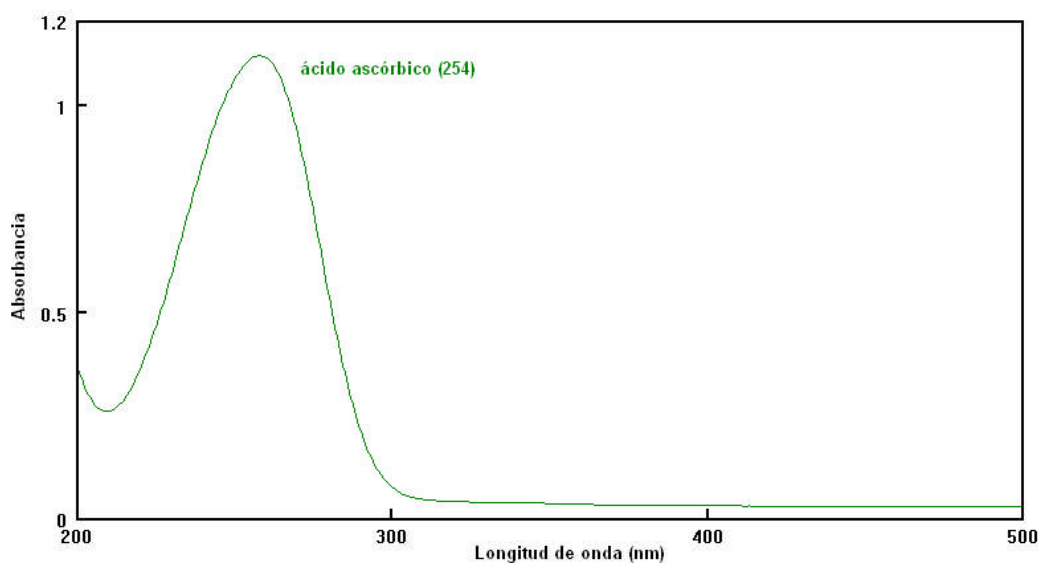


Figura 55. Espectro de absorción del ácido ascórbico.

4.3.2.2. Extracción del ácido ascórbico

Inicialmente se probó a extraer el ácido ascórbico de las muestras de grelo en agua desionizada (Gökmen y col., 2000). Los resultados obtenidos: 5.951 mg/100 g de AA y 32.76 mg/100 g de DHAA fueron muy similares a los encontrados en las hortalizas analizadas en su trabajo. Sin embargo, estos resultados están muy por debajo de los 40 mg/100 g de AA encontrados por otros autores para esta hortaliza (Mataix, 2003; <http://www.sehlehha.org/busalimento.aspx>, 30/10/2005; <http://perso.wanadoo.es/conserva-slou/p44.html>, 06/01/2006). Asimismo, se observó que a lo largo de unos cuantos minutos de almacenamiento (sin luz y en refrigeración), tanto los patrones de AA como las muestras, disminuían muy rápidamente su contenido de AA, lo cual indicaba que el agua desionizada no era el extractante ni el estabilizante más adecuado para el AA.

Por lo anterior, se procedió a usar otra solución seleccionándose como tal, el ácido metafosfórico al 5% usado por Gökmen y col (2005), encontrándose, en este caso, una mayor estabilidad del AA.

Por otra parte, se analizó el tiempo requerido para extraer la muestra con el ácido metafosfórico, para lo cual se probaron 2, 5 y 15 min. Se encontró que a los 2 min no había una extracción completa del ácido y a los 15 min se degradaba, por lo tanto, se seleccionó el tiempo de 5 min. para la extracción del ácido.

4.3.2.3. Reacción de reducción del DHAA

Se probó la metodología de Gökmen y col (2000), en la cual se añade 1 mg/mL de DTT a las muestras, pero los resultados fueron poco lógicos y muy variables de una muestra a otra. Por lo tanto, se seleccionó la metodología de López y col. (2005) obteniendo resultados adecuados.

4.3.2.4. Parámetros de validación del método

Los parámetros de validación para la extracción y cuantificación del ácido ascórbico, fueron los siguientes:

- La precisión del método, expresada como porcentaje del coeficiente de variación (% CV), se obtuvo al someter 6 muestras de grelo fresco, por duplicado, a los procesos de extracción y cuantificación, alcanzando un valor de **1.48 %**, considerado satisfactorio.
- La precisión de la medida, expresada como % CV, se consiguió al inyectar por duplicado 6 veces una misma muestra de grelo fresco extraído, y el valor obtenido de **0.28 %**, se considera muy adecuado.
- El porcentaje de recuperación se realizó al sobrecargar una muestra de grelos con un patrón de ácido ascórbico, de concentración conocida, y someterla al proceso de extracción. La cuantificación se obtuvo por comparación de las áreas encontradas antes y después de la extracción. El valor obtenido fue de **97.74 %**.
- En cuanto a la recta de calibración (Tabla 29), se prepara una solución madre que contiene 106 µg/mL. Esta solución se protege de la luz y se almacena a 4 °C. A partir de la misma, se preparan los patrones para la recta de calibración, se toman alícuotas de 2.5, 5, 10, 15 y 20 mL, y se enrasan a 25 mL, para obtener concentraciones de 10.6, 21.2, 42.4, 63.6 y 84.8 µg/mL. Para la recta de calibración, las áreas que se obtienen de cada patrón se representan frente a su concentración correspondiente (desde 10.6 hasta 106 µg/mL) (Figura 56) y se logra un coeficiente de correlación de **0.9999**.
- El método utilizado para determinar el límite de detección está basado en las directrices de la American Chemical Society (1980) las cuales indican que el límite de detección es igual a la concentración del analito que proporciona una señal 3 veces superior al ruido. El límite de detección para ácido ascórbico fue de

0.0106 µg/mL. El valor encontrado señala que la sensibilidad del método es adecuada para cuantificar cualquier valor encontrado en las muestras analizadas.

Tabla 29. Datos de la recta de calibración para ácido ascórbico

concentración ^a	área
10.6	710228.25
21.2	1433893.50
42.4	2927329.00
63.6	4395264.00
84.8	5850504.25
106.0	7360309.00
a	69524.8075
b	-25895.9595
r	0.9999

^aµg/mL.

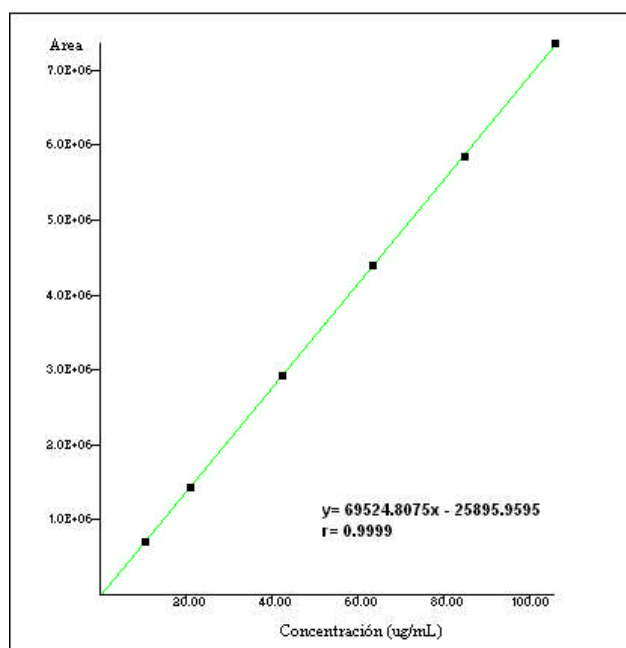


Figura 56. Recta de calibración para ácido ascórbico.

4.3.2.5. Cromatogramas

En la Figura 57 se recoge el cromatograma de un patrón de ácido ascórbico, y en la Figura 58, el correspondiente a la determinación de ácido ascórbico en grelo fresco, grelo escaldado y grelo cocido.

A partir de las áreas obtenidas para cada una de las muestras, y en base a la recta de calibración, se obtienen las concentraciones correspondientes de ácido ascórbico y ácido dehidroascórbico en cada una de ellas (ver sección de resultados de ácido ascórbico y ácido dehidroascórbico).

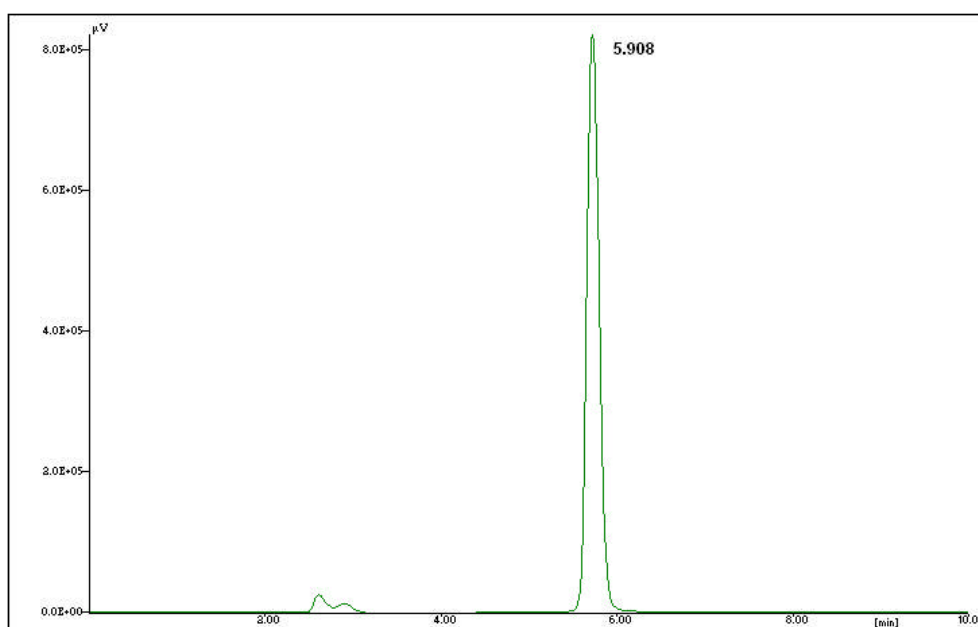


Figura 57. Cromatograma de un patrón de ácido ascórbico.

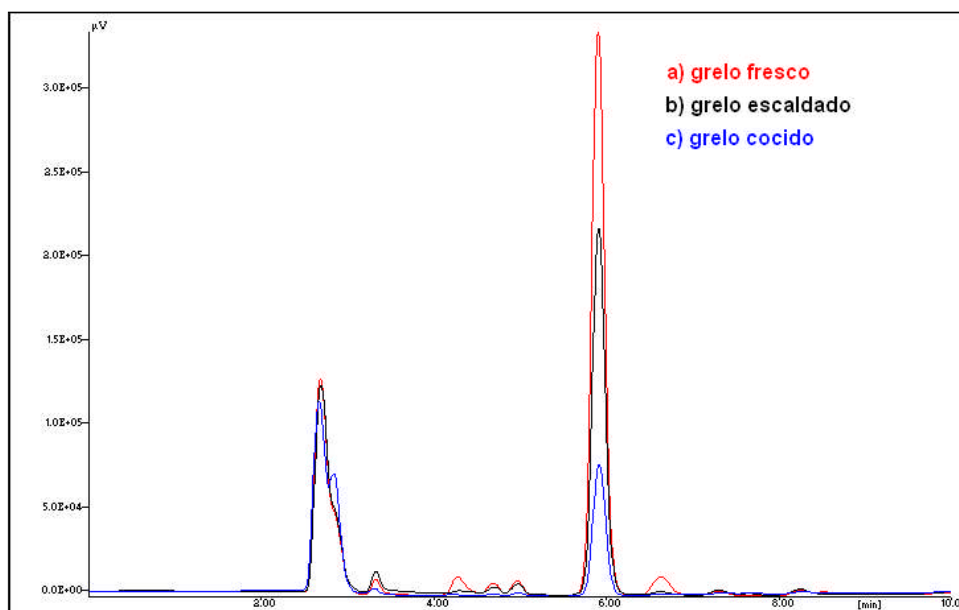


Figura 58. Cromatogramas de ácido ascórbico en muestras de a) grelo fresco, b) grelo escaldado y c) grelo cocido.

4.3.3. Pigmentos

4.3.3.1. Condiciones cromatográficas

Para la determinación de los pigmentos, se usó una columna Sun Fire C₁₈, de Waters, con dimensiones de 250 mm × 4.6 mm y empacada con partículas de 5 μm, termostatzada a 25 °C. La fase móvil fue una mezcla de acetonitrilo (75 %), metanol (15 %) y diclorometano/hexano (1:1) (10 %), y el flujo de 0.8 mL/min.

En primer lugar, fue necesario conocer las longitudes de onda a las cuales se iba a trabajar, para ello se realizó un barrido de longitudes de onda en el espectrofotómetro, para los patrones de los pigmentos, preparados individualmente en la fase móvil antes mencionada. Se encontró que las más adecuadas son 450 nm para la luteína (Figura 59), 450 nm para el β-caroteno (Figura 60), 430 nm y 460 nm para la clorofila a y la clorofila b, respectivamente (Figura 61), 405 nm y 432 nm para la feofitina a y la feofitina b, respectivamente (Figura 62). Estos datos coinciden con las longitudes de onda usadas por Khachik y col. (1986) y López-Hernández y col. (1993); en sus respectivos trabajos.

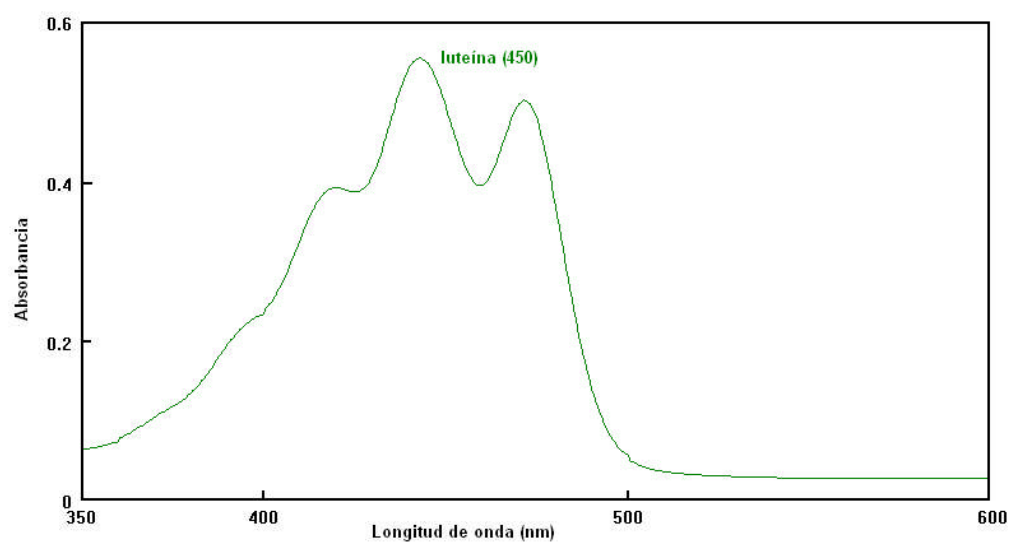


Figura 59. Espectro de absorción de luteína

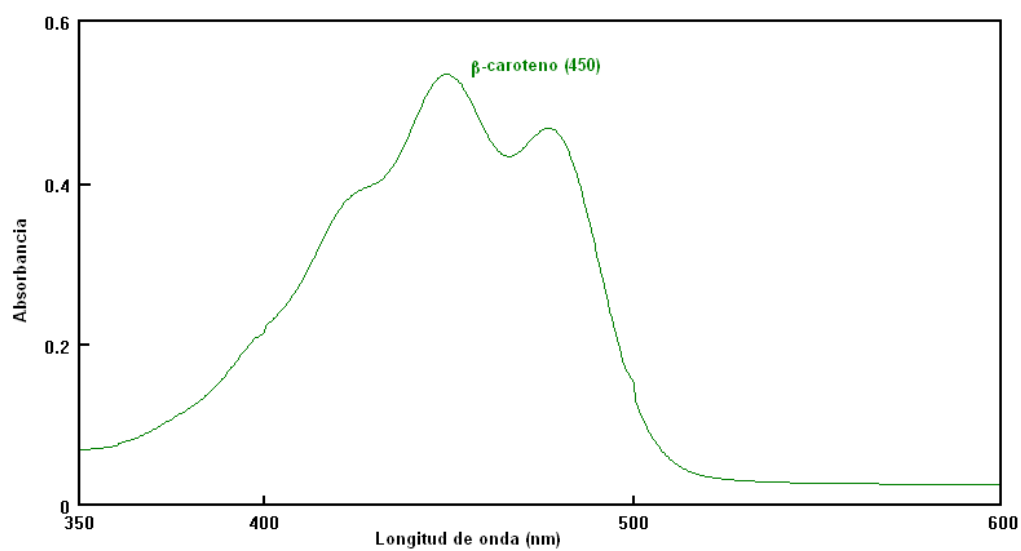


Figura 60. Espectro de absorción del β-caroteno

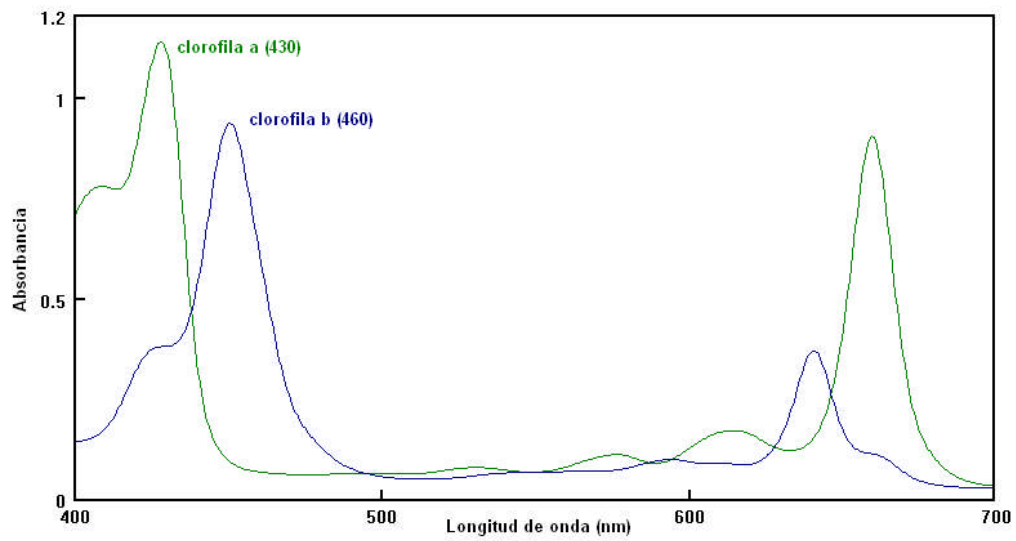


Figura 61. Espectros de absorción de clorofila a y clorofila b

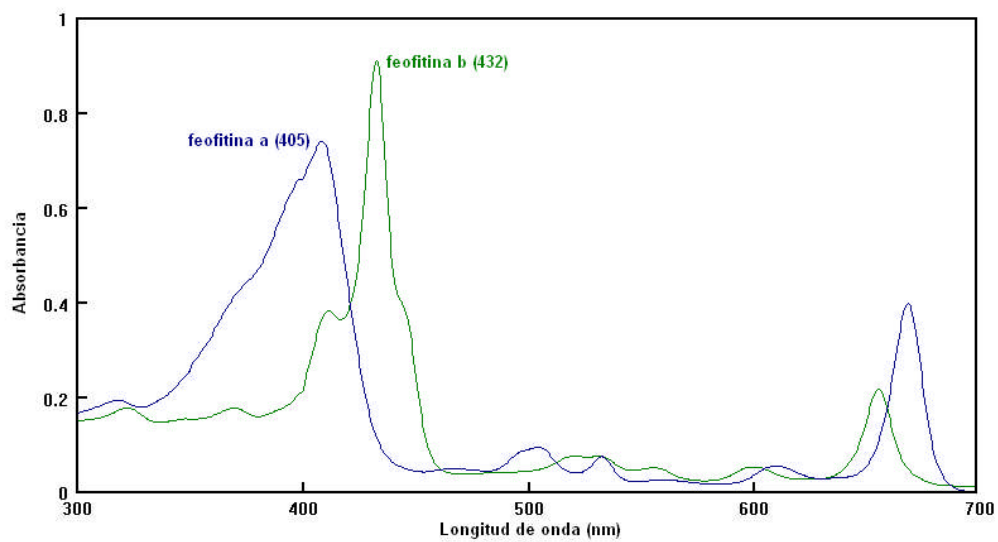


Figura 62. Espectros de absorción de feofitina a y feofitina b

4.3.3.2. Extracción de los pigmentos

Para la extracción de los pigmentos, inicialmente, se ensayó el uso de acetona-éter de petróleo (1:1) (López-Hernández y col., 1993), encontrando que esta mezcla de extracción daba buen resultado para las muestras de grelo en estado fresco, ya que el tejido quedaba incoloro y se obtenían picos cromatográficos adecuados. Sin embargo, su uso en muestras liofilizadas no dio buen resultado ya que, aún añadiendo grandes volúmenes de este solvente, el tejido de grelo no perdía su color verde y aún más, al evaluar la variación del método en varias muestras, se obtuvieron coeficientes muy elevados (20-30 %), debido a que era imposible determinar con que volumen de solvente se lograba una extracción adecuada.

Por lo anterior, se buscó otro solvente que fuera adecuado para su uso en tejido liofilizado y se encontró que el metanol (Wright y col., 1997; Cartaxana y Brotas, 2003; Gökmen y col., 2002; Gökmen y col., 2005) podría ser la opción. Se hicieron los análisis respectivos, teniendo en cuenta que resultados anteriores señalaban que el uso de metanol, combinado con tiempos de extracción largos (6-24 h), podría producir rendimientos muy bajos, posiblemente debido a la isomerización y/o degradación de los pigmentos (Cartaxana y Brotas, 2003). Se realizaron pruebas, aplicando tiempos de 2, 5, 10, 15, 20 y 25 min, encontrando que a mayor tiempo de extracción, se obtenían picos con áreas más elevadas, pero los picos de luteína y clorofila a comenzaban a distorsionarse. Se optó por realizar la extracción con el tiempo de 20 min, pero dividiéndolo en dos etapas (Gökmen y col., 2002), es decir, la muestra se homogeniza en el ultrasonidos durante 10 min, con 10 mL del solvente, se filtra y nuevamente se homogeniza durante otros 10 min con otros 10 mL. Esto se debe a que si la extracción se realiza durante 20 min seguidos, sin cambio del solvente, éste se satura y ya no extrae más los pigmentos de la muestra.

Al metanol se le añadió 1 % de BHT, como agente estabilizante para los pigmentos frente a la oxidación, pero teniendo cuidado de añadirlo momentos antes de la extracción (se comprobó que el añadirlo con mucha anticipación provocaba que los picos se distorsionaran). Asimismo, la extracción se realizó a temperatura baja y con luz tenue

para evitar la fotodegradación de los pigmentos. También se adicionó carbonato de calcio, para alcalinizar la muestra y evitar que por efecto del pH ácido, las clorofilas se transformaran en feofitinas.

Cabe señalar que la fase móvil usada para estos análisis fue una mezcla isocrática de acetonitrilo (75 %), metanol (15 %) y diclorometano/hexano (1:1) (10 %) (López-Hernández y col., 1993), por lo cual, los extractos metabólicos obtenidos anteriormente, tuvieron que ser transferidos a una fase de éter de petróleo, ya que en el metanol, los picos eran muy deformes y pequeños, en cambio, en la fase etérea, los picos fueron grandes y simétricos. La adición de sulfato de sodio anhidro, tras la transferencia a la fase etérea, fue necesaria para atrapar el agua que pudiera quedar en ésta y así facilitar el análisis de los pigmentos más hidrosolubles, como la luteína.

4.3.3.3. Parámetros de validación del método

Los parámetros de validación para la extracción y cuantificación de los pigmentos, fueron los siguientes:

- La precisión del método, expresada como porcentaje del coeficiente de variación (% CV), se obtuvo al someter 6 muestras de grelo fresco, por duplicado, a los procesos de extracción y cuantificación, alcanzando valores de **3.26 %** para la luteína, **3.14 %** para el β -caroteno, **2.25 %** para la clorofila a, **1.31 %** para la clorofila b, **3.28 %** para la feofitina a y **2.27 %** para la feofitina b. Los resultados se consideran adecuados.
- La precisión de la medida, expresada como % CV, se consiguió al inyectar por duplicado 6 veces una misma muestra de grelo fresco extraído, y se obtuvieron valores de **0.85 %** para la luteína, **0.58 %** para el β -caroteno, **0.70 %** para la clorofila a, **0.29 %** para la clorofila b, **0.81 %** para la feofitina a y **0.23 %** para la feofitina b. Los resultados se consideran satisfactorios.

- En cuanto a las rectas de calibración:

Luteína: se prepara una solución madre que contiene 100 µg/mL de luteína disuelta en acetona. Dicha solución se protege de la luz y se almacena a -20 °C. A partir de la misma, se preparan los patrones para la recta de calibración. Se toman alícuotas de 1 mL, se evaporan en corriente de nitrógeno y se redisuelven en 10, 8, 4, 2.5, y 2 mL de hexano, respectivamente, para obtener concentraciones de 10.0, 12.50, 25.0, 40.0 y 50.0 µg/mL (Tabla 30). Las áreas que se obtienen de cada patrón se representan frente a su concentración correspondiente (10.0 hasta 50.0 µg/mL) (Figura 63) y se logra un coeficiente de correlación de **0.9999**.

β-caroteno: se prepara una solución madre que contiene 1140 µg/mL de β-caroteno disuelto en acetona. Se toma 1 mL, se evapora en corriente de nitrógeno y se disuelve en 10 mL de hexano. Dicha solución se protege de la luz y se almacena a -20 °C. A partir de la misma se preparan los patrones para la recta de calibración, se toman alícuotas de 1 mL, se evaporan en corriente de nitrógeno y se redisuelven en 10, 5, 2.5, 2 y 1 mL de hexano, respectivamente, para obtener concentraciones de 11.4, 22.8, 45.6, 57.0 y 114.0 µg/mL (Tabla 30). Las áreas que se obtienen de cada patrón se representan frente a su concentración correspondiente (11.4 hasta 114.0 µg/mL) (Figura 64) y se logra un coeficiente de correlación de **0.9997**.

Clorofila a: se prepara una solución madre que contiene 100 µg/mL de clorofila a disuelta en acetona. Dicha solución se protege de la luz y se almacena a -20 °C. A partir de la misma, se preparan los patrones para la recta de calibración, se toman alícuotas de 0.4 mL, se evaporan en corriente de nitrógeno y se redisuelven en 10, 8, 4 y 2 mL de hexano, respectivamente, con ello se obtienen las concentraciones de 4.0, 5.0, 10.0 y 20.0 µg/mL (Tabla 31). Asimismo, de la solución madre se toman alícuotas de 1.0 mL, que se evaporan en corriente de nitrógeno y se redisuelven en 2 y 1 mL de hexano,

respectivamente, para obtener las concentraciones de 50.0 y 100.0 $\mu\text{g/mL}$. Las áreas que se obtienen de cada patrón se representan frente a su concentración correspondiente (4.0 hasta 100.0 $\mu\text{g/mL}$) (Figura 65) y se logra un coeficiente de correlación de **0.9990**.

Clorofila b: se prepara una solución madre que contiene 100 $\mu\text{g/mL}$ de clorofila b disuelta en acetona. Dicha solución se protege de la luz y se almacena a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. A partir de la misma, se preparan los patrones para la recta de calibración, se toman alícuotas de 0.4 y 0.8 mL, se evaporan en corriente de nitrógeno y se redisuelven en 10 mL de hexano, cada una, con ello se obtienen las concentraciones de 4.0 y 8.0 $\mu\text{g/mL}$ (Tabla 31). Asimismo, de la solución madre se toma una alícuota de 0.5 mL, que se evapora en corriente de nitrógeno y se redisuelve en 2 mL de hexano, para obtener la concentración de 25.0 $\mu\text{g/mL}$. A partir de esta dilución, se toman alícuotas de 1 mL y se diluyen en 2 y 10 mL de hexano, con lo cual se tienen las concentraciones de 12.5 y 2.5 mL. Las áreas que se obtienen de cada patrón se representan frente a su concentración correspondiente (2.5 hasta 25.0 $\mu\text{g/mL}$) (Figura 66) y se logra un coeficiente de correlación de **0.9999**.

Feofitina a: la feofitina a se prepara a partir de una solución madre que contiene 100 $\mu\text{g/mL}$ de clorofila a disuelta en acetona. Dicha solución se protege de la luz y se almacena a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. La clorofila a se convierte en feofitina a, añadiéndole a cada alícuota, 3 gotas de HCl 0.1 N, y manteniéndola en la oscuridad durante 15 min. Para la curva de calibración, se toman alícuotas de 0.5 mL, se transforman en feofitinas, se evaporan en corriente de nitrógeno y se redisuelven en 10, 5 y 2 mL de hexano, respectivamente, con ello se obtienen las concentraciones de 5.0, 10.0 y 25.0 $\mu\text{g/mL}$ (Tabla 32). Asimismo, de la solución madre se toman alícuotas de 0.6 y 0.9 mL, se transforman en feofitinas, se evaporan en corriente de nitrógeno y se redisuelven en 1 mL de hexano, para obtener las concentraciones de 60.0 y 90.0 $\mu\text{g/mL}$. Las áreas que se obtienen de cada patrón

se representan frente a su concentración correspondiente (5.0 hasta 90.0 $\mu\text{g/mL}$) (Figura 67) y se logra un coeficiente de correlación de **0.9997**.

Feofitina b: la feofitina b se prepara a partir de una solución madre que contiene 100 $\mu\text{g/mL}$ de clorofila b disuelta en acetona. Dicha solución se protege de la luz y se almacena a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. La clorofila b se convierte en feofitina b, añadiéndole a cada alícuota, 3 gotas de HCl 0.1 N, y manteniéndola en la oscuridad durante 15 min. Para la curva de calibración, se toman alícuotas de 0.5 mL, se transforman en feofitinas, se evaporan en corriente de nitrógeno y se redisuelven en 50, 10, 5, 2 y 0.5 mL de hexano, respectivamente, con ello se obtienen las concentraciones de 1.0, 5.0, 10.0, 25.0 y 100 $\mu\text{g/mL}$ (Tabla 32). Las áreas que se obtienen de cada patrón se representan frente a su concentración correspondiente (1.0 hasta 100.0 $\mu\text{g/mL}$) (Figura 68) y se logra un coeficiente de correlación de **0.9998**.

- El método utilizado para determinar el límite de detección está basado en las directrices de la American Chemical Society (1980) las cuales indican que el límite de detección es igual a la concentración del analito que proporciona una señal 3 veces superior al ruido. Los límites de detección para luteína, β -caroteno, clorofila a, clorofila b, feofitina a y feofitina b son de **0.0125, 0.023, 0.050, 0.015, 0.025 y 0.025 $\mu\text{g/mL}$** . Los valores encontrados señalan que la sensibilidad del método es adecuada para cuantificar cualquier valor encontrado en las muestras analizadas.

Tabla 30. Datos de las rectas de calibración para luteína y β -caroteno

luteína		β -caroteno	
concentración ^a	área	concentración ^a	área
10.0	942751.21	11.4	490012.69
12.5	1232865.61	22.8	1036425.61
25.0	2520363.23	45.6	2279218.43
40.0	4123015.26	57.0	2909428.84
50.0	5101795.27	114.0	5914449.98
a	103179.3299	a	52447.7505
b	-44394.5432	b	-87393.3815
r	0.9999	r	0.9997

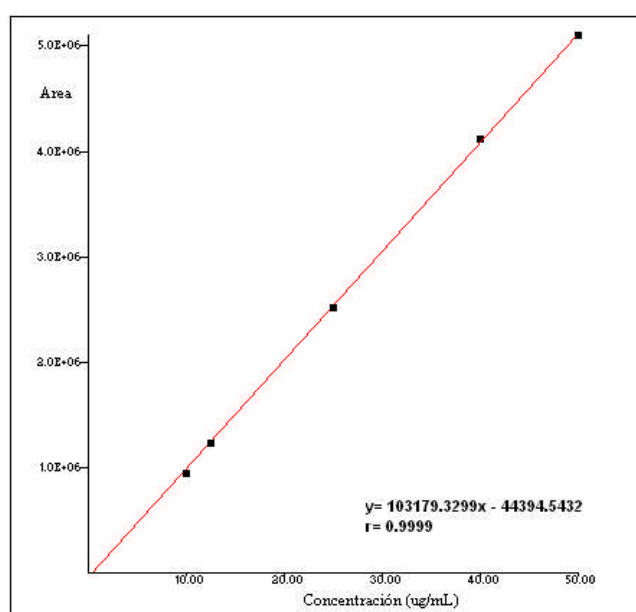
^a $\mu\text{g/mL}$.

Figura 63. Recta de calibración para luteína

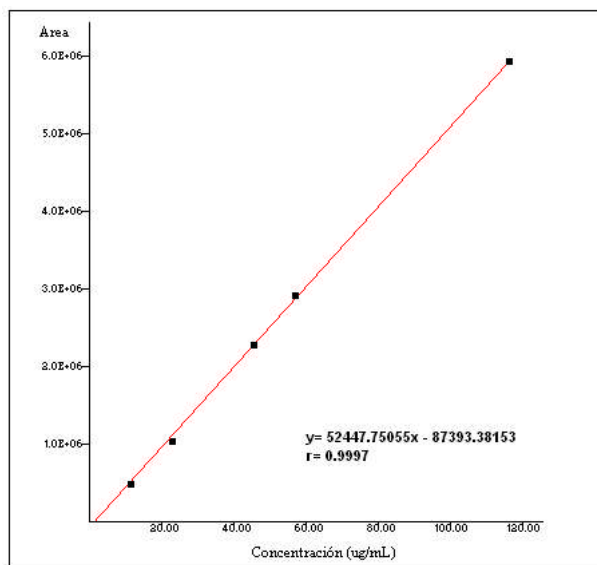


Figura 64. Recta de calibración para β -caroteno

Tabla 31. Datos de las rectas de calibración para clorofila a y clorofila b

clorofila a		clorofila b	
concentración ^a	área	concentración ^a	área
4.0	57844.80	2.5	341062.40
5.0	311397.49	4.0	591368.80
10.0	547062.00	8.0	1219717.61
20.0	2015987.23	12.5	1929324.82
50.0	6558587.42	25.0	4030032.06
100.0	12857461.20		
a	133263.9252	a	162039.6269
b	-405505.9574	b	-52425.8129
r	0.9990	r	0.9999

^aµg/mL.

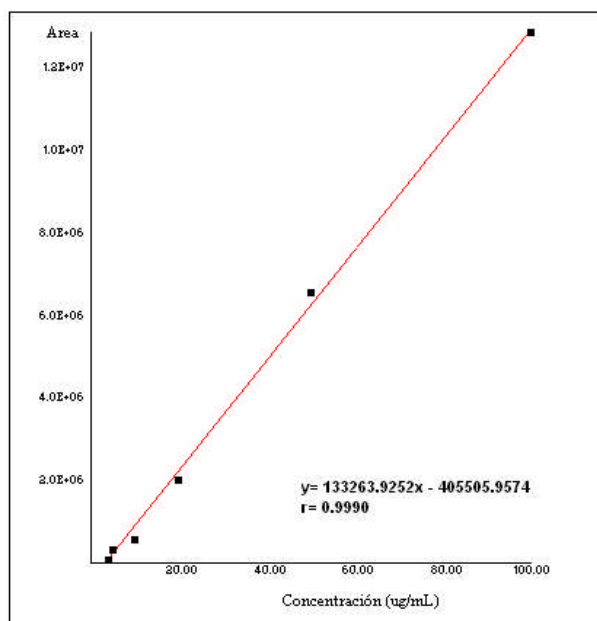


Figura 65. Recta de calibración para clorofila a

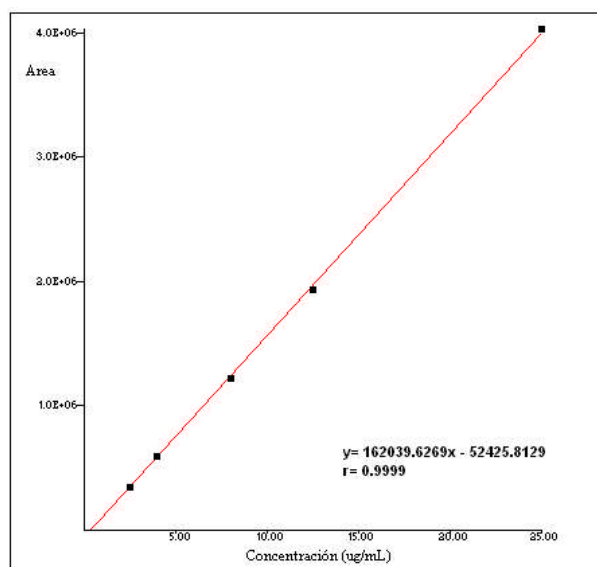


Figura 66. Recta de calibración para clorofila b

Tabla 32. Datos de las rectas de calibración para feofitina a y feofitina b

feofitina a		feofitina b	
concentración ^a	área	concentración ^a	área
5	415635.21	1.0	242644.70
10	1485029.62	5.0	1294692.81
25	3718097.66	10.0	2242333.63
60	8965462.53	25.0	4716969.67
90	13513221.00	100.0	18180504.27
a	151437.217	a	179019.1035
b	-112604.214	b	287090.3009
r	0.9997	r	0.9998

^aµg/mL.

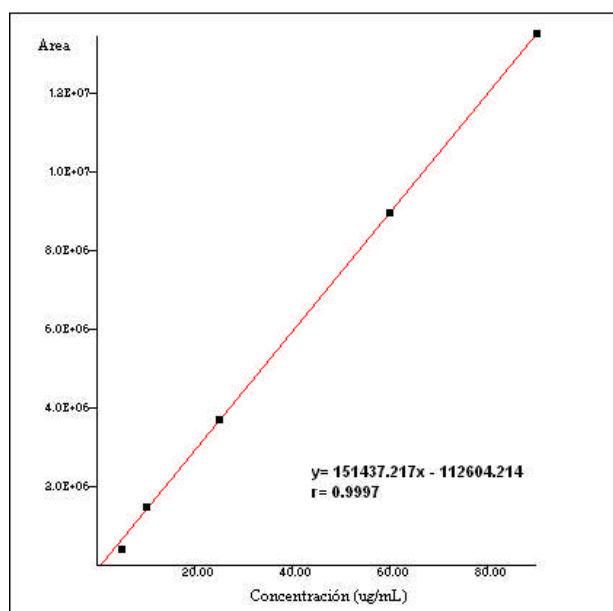


Figura 67. Recta de calibración para feofitina a

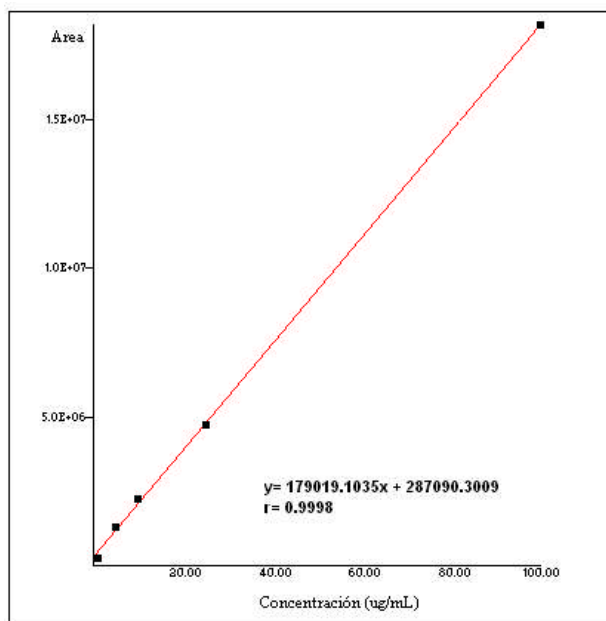


Figura 68. Recta de calibración para feofitina b

4.3.3.4. Cromatogramas

En la Figura 69 se recoge el cromatograma de una mezcla de patrones de luteína, β -caroteno, clorofila a y clorofila b, y en la Figura 70 el correspondiente a la mezcla de patrones de feofitina a y feofitina b.

En las Figuras 71, 72, 73, 74 y 75 se recogen los cromatogramas a las longitudes de onda de 450, 430, 460, 405 y 432 nm, correspondientes a las determinaciones de pigmentos en grelo fresco, grelo escaldado y grelo cocido.

A partir de las áreas obtenidas para cada una de las muestras, y en base a las rectas de calibración, se obtienen las concentraciones correspondientes de luteína, β -caroteno, clorofila a, clorofila b, feofitina a y feofitina b, en cada una de ellas (ver sección de resultados de pigmentos).

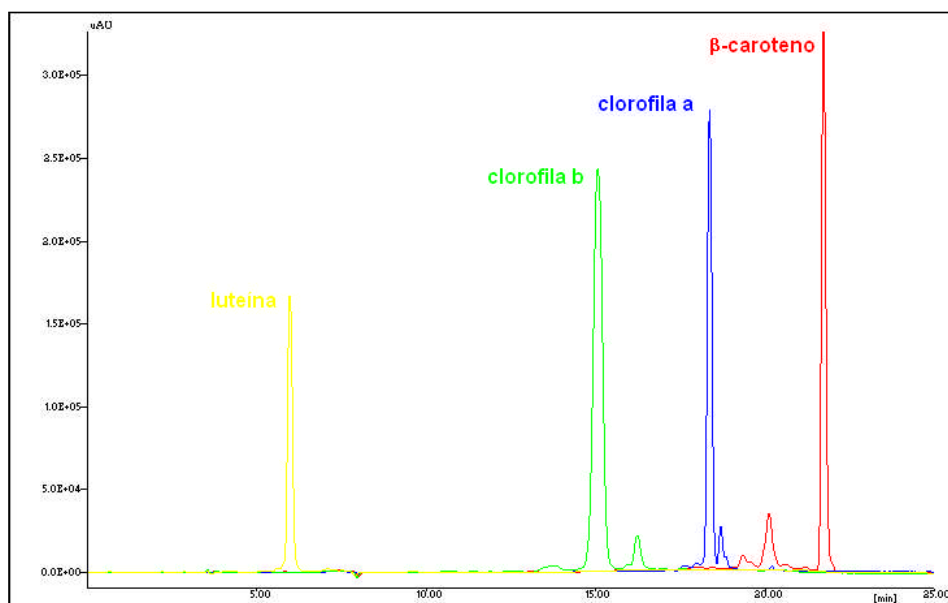


Figura 69. Cromatogramas de patrones de luteína, β-caroteno, clorofila a y clorofila b.

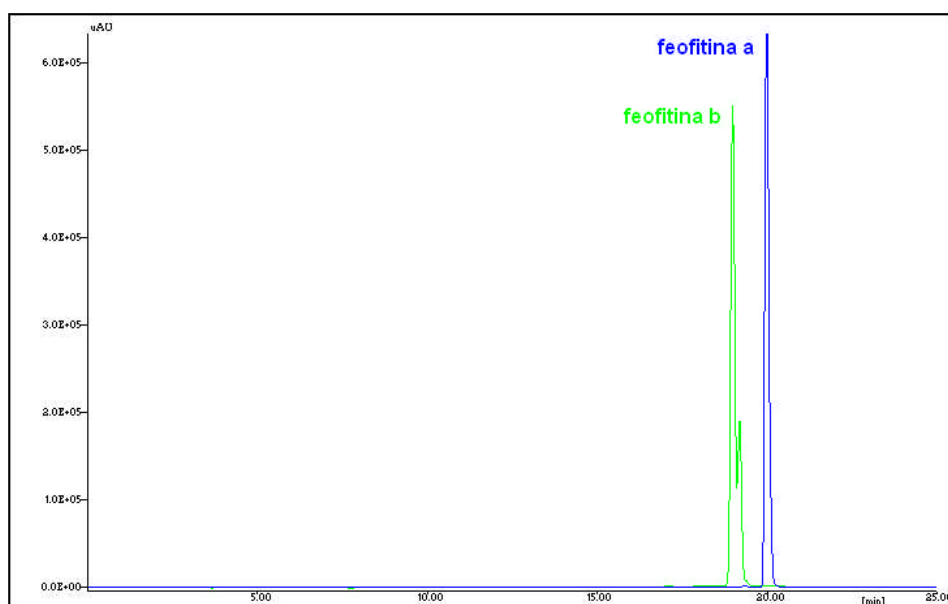


Figura 70. Cromatogramas de patrones de feofitina a y feofitina b.

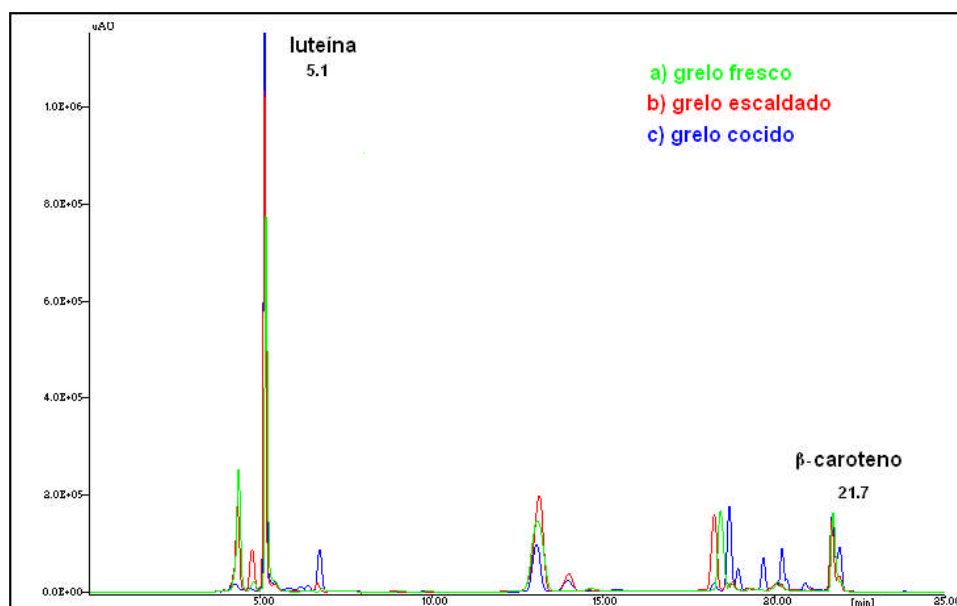


Figura 71. Cromatogramas a 450 nm de muestras de a) grelo fresco, b) grelo escaldado y c) grelo cocido.

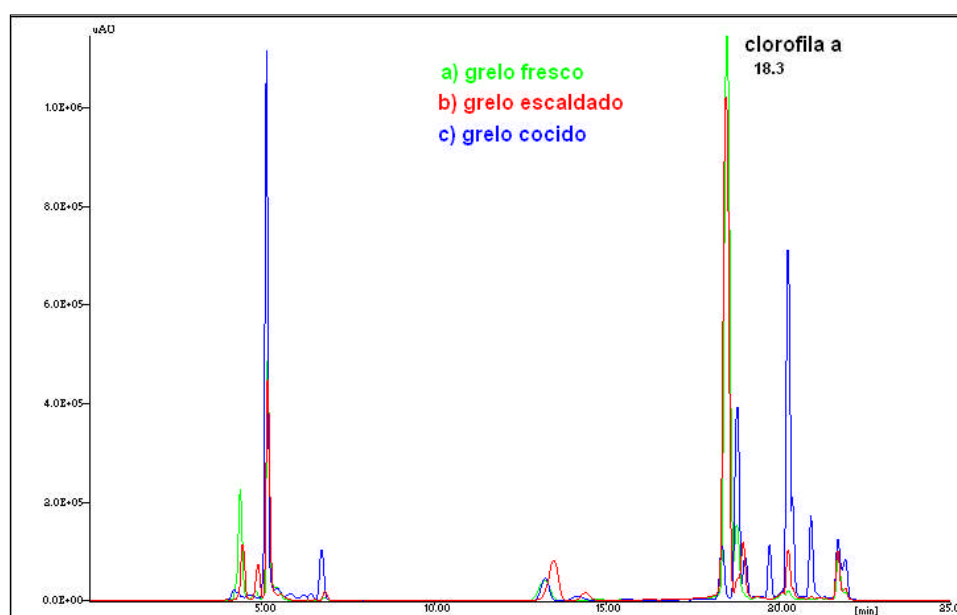


Figura 72. Cromatogramas a 430 nm de muestras de a) grelo fresco, b) grelo escaldado y c) grelo cocido.

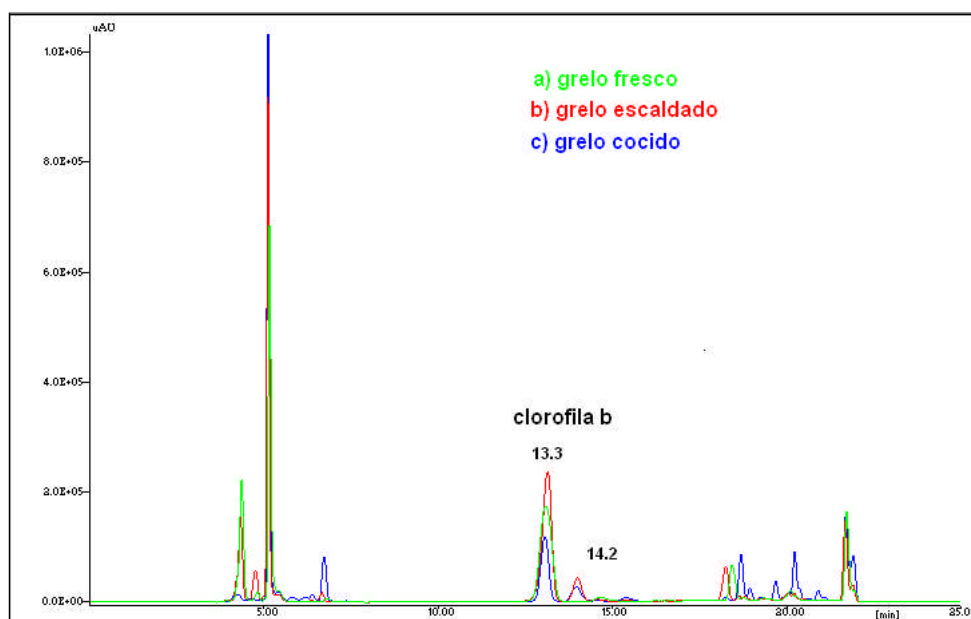


Figura 73. Cromatogramas a 460 nm de muestras de a) grelo fresco, b) grelo escaldado y c) grelo cocido.

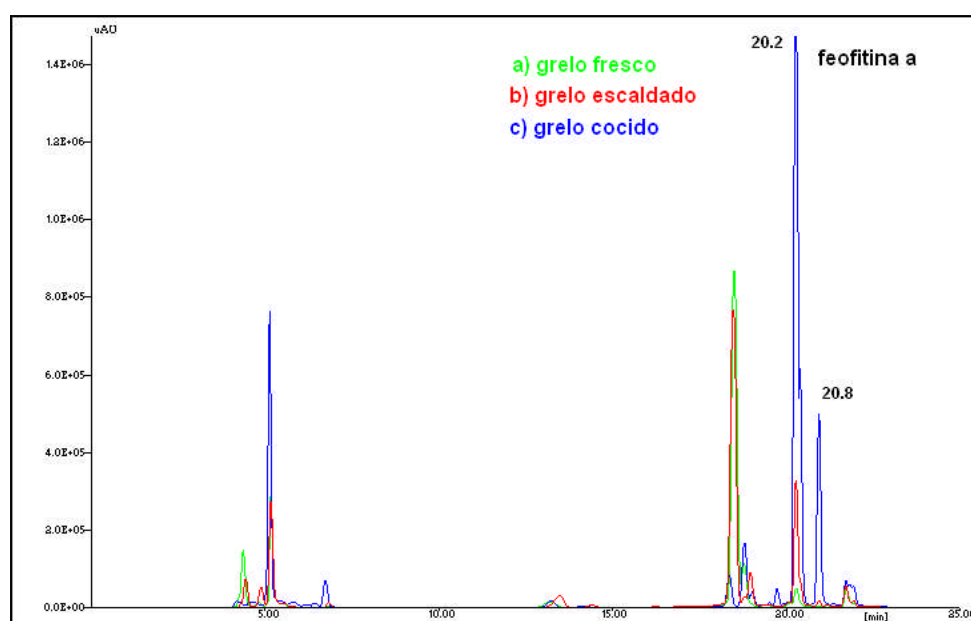


Figura 74. Cromatogramas a 405 nm de muestras de a) grelo fresco, b) grelo escaldado y c) grelo cocido.

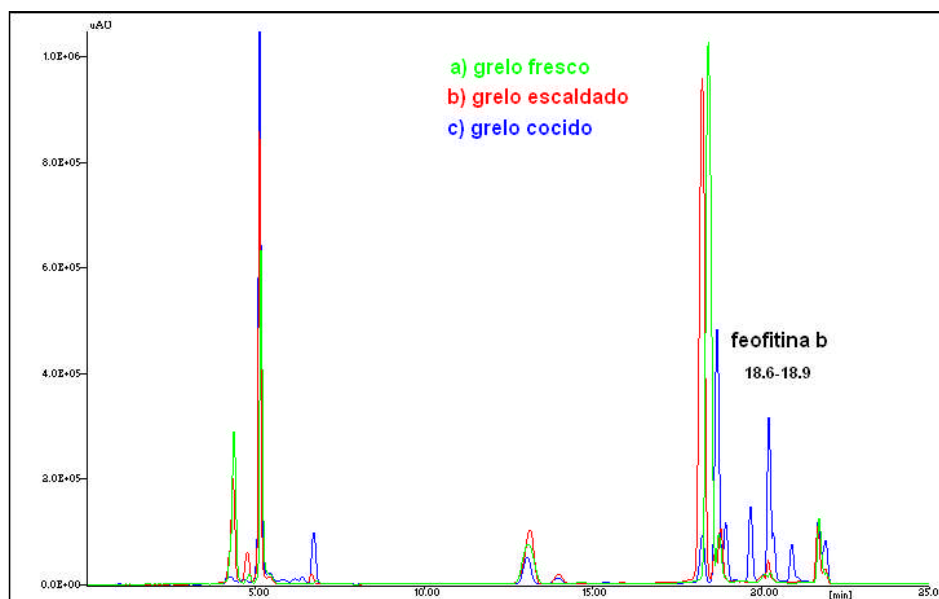


Figura 75. Cromatogramas a 432 nm de muestras de a) grelo fresco, b) grelo escaldado y c) grelo cocido.

4.3.4. Fenoles totales

Para realizar la recta de calibración (Tabla 33), se seleccionó el ácido tánico como patrón (Oboh, 2005). Se prepara una solución madre que contiene 1060 $\mu\text{g/mL}$ y se diluye en agua Milli-Q. A partir de la misma, se preparan los patrones para la recta de calibración, se toman alícuotas de 0.25, 0.50, 0.75, 1.0, 1.5 y 1.75 mL, y se enrasan a 20 mL, con ello se obtienen concentraciones de ácido tánico de 13.25, 26.5, 39.75, 53.0, 79.5 y 92.75 $\mu\text{g/mL}$ de ácido tánico. Una alícuota de cada patrón (2 mL) se trata como una muestra y se utiliza acetona al 70 % como blanco de referencia.

Tabla 33. Datos de la recta de calibración para ácido tánico

concentración ^a	absorbancia
0	0
13.25	0.1270
26.50	0.2680
39.75	0.3918
53.0	0.5221
79.5	0.7808
92.75	0.9299
a	0.00995228
b	-0.00190833
r	0.9998

^aµg/mL.

Las áreas que se obtienen de cada patrón se representan frente a su concentración correspondiente (13.25 hasta 92.75 µg/mL) (Figura 76) y se logra un coeficiente de correlación de **0.9998**. La concentración de fenoles totales en las muestras, se calcula a partir de la ecuación obtenida para la recta de calibrado.

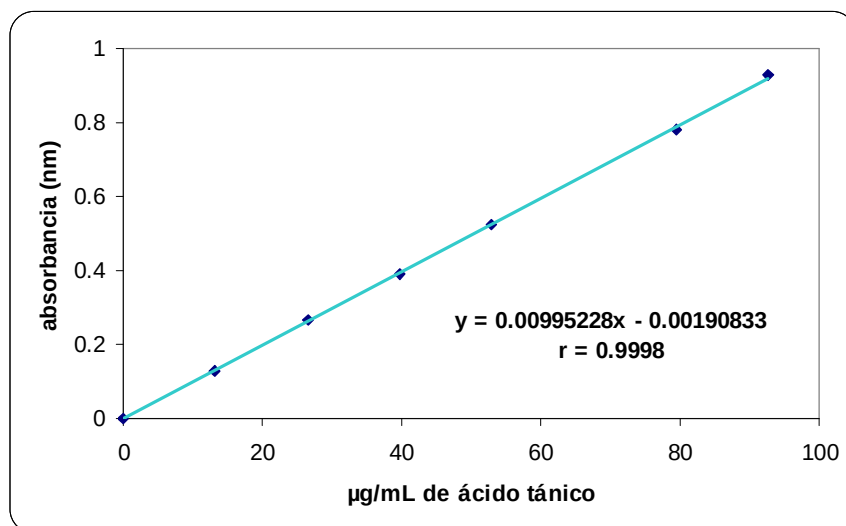


Figura 76. Recta de calibración para ácido tánico

4.4. RESULTADOS DE DETERMINACIONES ANALÍTICAS

Las muestras de grelo procesadas, según el apartado 4.2, fueron analizadas por una parte, para comprobar la influencia del tratamiento térmico aplicado (escaldado o cocción) y, por otra parte, para conocer los cambios producidos a lo largo del tiempo de almacenamiento en congelación. Para ello se realizaron los análisis enzimáticos y físico-químicos, descritos en los apartados 3.3.1 y 3.3.2, respectivamente. Además se efectuó un control microbiológico (apartado 3.3.3) a la mitad y al final del período de almacenamiento.

Los muestreos correspondientes a las determinaciones enzimáticas y físico-químicas son las recogidas en la Tabla 9 (apartado 4.1.1). El muestreo 0 se corresponde con el grelo fresco (sin tratamiento). La muestra de grelo se dividió en dos lotes, una fue escaldada y otro cocida (siguiendo los procedimientos descritos dentro del apartado 4.2). Tras el enfriado y escurrido las dos muestras fueron analizadas (muestreo 1). A continuación, las muestras fueron envasadas a vacío y congeladas analizándose cada 15 días (muestreos 2 a 8) hasta un total de 105 días de almacenamiento a -20 °C. Para realizar el análisis de las muestras congeladas, éstas se descongelaron previamente a 4 °C durante toda la noche (Figura 77).



Figura 77. Aspecto de los grelos escaldados y cocidos tras la descongelación.

4.4.1. Determinación de enzimas

Tal y como se ha indicado en el apartado 4.1, durante la optimización del proceso de congelación en el grelo se utilizó la determinación cualitativa de la enzima peroxidasa para el establecimiento del tiempo mínimo necesario para la inactivación enzimática. Igualmente, se realizó la determinación cuantitativa de la peroxidasa, tanto en las muestras frescas, como tras el escaldado y a lo largo del almacenamiento en congelación.

Diferentes autores señalan que la actividad de la enzima peroxidasa no tiene relación directa con el deterioro en la calidad que sufren los vegetales durante un almacenamiento en congelación, por lo que se ha recomendado el uso de la enzima lipoxigenasa (LOX) como indicador, ya que se supone que su uso es más adecuado para evaluar la estabilidad de los vegetales congelados, durante el almacenamiento (Barret y Theerakulkait, 1995; Williams y col., 1986; Sheu y Chen, 1991; Nagy-Gasztonyi y col., 2000; Garrote y col., 2003). La enzima LOX ha sido asociada con el deterioro de la calidad debido a su relación con la producción de sabores y olores indeseables, pérdida de pigmentos como carotenoides y clorofilas y destrucción de ácidos grasos esenciales (King y Klein, 1987).

Los resultados se detallan a continuación:

4.4.1.1. Enzima peroxidasa (POD)

La cinética de la enzima POD se evaluó durante 1200 s (Figura 78), sin embargo la pendiente de la recta se calculó en el rango de 180 a 600 s, ya que fue donde se mostraba la mayor velocidad de la reacción. Se obtuvieron 9 rectas (por duplicado) correspondientes a las 9 muestras analizadas y los coeficientes de regresión, $r=0.96$ a $r=0.99$, se consideran adecuados para este análisis.

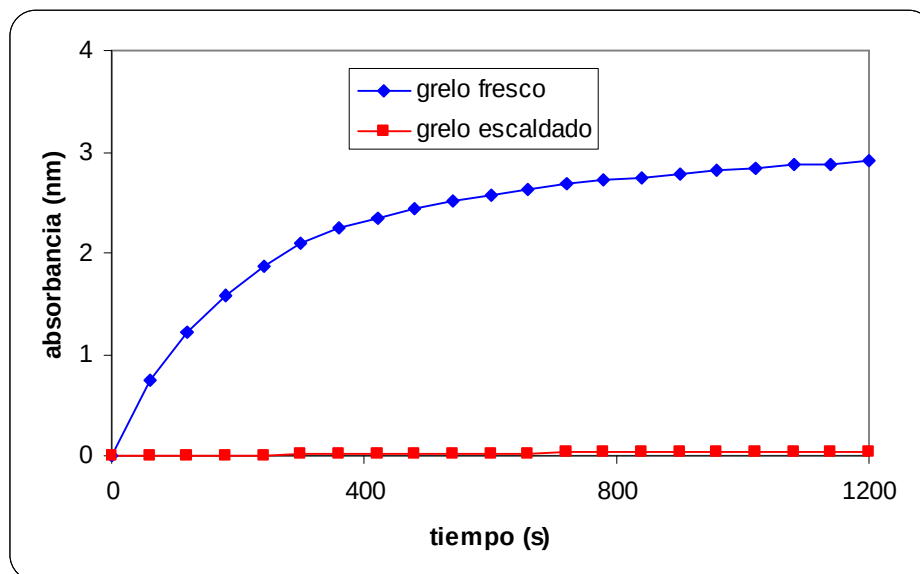


Figura 78. Cinética enzimática de la peroxidasa en grelo fresco y grelo escaldado.

La POD en el grelo fresco, tiene una actividad de 35.30 ± 0.93 U (Tabla 34). Este valor disminuye considerablemente, tras el escaldado a vapor durante 2 min, a 1.27 ± 0.34 U, lo cual da una reducción aproximada del 96.4 % de la actividad de la enzima. La reducción en la actividad de la enzima, demuestra que el tratamiento térmico de escaldado, efectuado en este trabajo, ha sido efectivo para inactivar la misma, ya que según Bahçeci y col. (2005), una reducción de >90 % de la actividad de la enzima indicadora es lo que se recomienda para tener una calidad óptima de los vegetales durante el almacenamiento a temperatura de congelación.

Tabla 34. Actividad de peroxidasa en grelo escaldado.

Nº muestreo	actividad POD ^a	actividad retenida POD ^b
0	35.30 ± 0.93	100
1	1.27 ± 0.34	3.59
2	1.79 ± 0.33	5.08
3	3.99 ± 0.03	11.30
4	4.13 ± 0.08	11.70
5	1.79 ± 0.22	5.06
6	2.22 ± 0.02	6.29
7	5.51 ± 0.39	15.61
8	1.74 ± 0.25	4.93

Promedio ± desviación estándar (n=2); ^a1 U POD = incremento en la absorbancia de 0.001 a 420 nm por min por mg de proteína, bajo las condiciones de ensayo, ^b%.

Durante el período de almacenamiento en congelación se aprecian diferencias estadísticamente significativas, tras la aplicación del ANOVA de un factor ($F=75.971$, $p<0.001$), para la actividad de la peroxidasa. Se observa que a medida que transcurre el tiempo de almacenamiento, la actividad retenida de la enzima fluctúa significativamente (Figura 79). Algunos autores indican que la inactivación térmica de las enzimas es reversible, existen estudios (realizados en sistemas modelo), que señalan que la reactivación de la actividad enzimática, tras su inactivación por calor, es una de las propiedades de la POD (Powers y col., 1984; Halpin y col., 1989; Adams y col., 1996; Rodrigo y col., 1997). Sin embargo, también existen otros trabajos donde se señala que no existe reactivación de la POD durante el almacenamiento en congelación de vegetales (McDaniel y col., 1988; Sheu y Chen, 1991; Barret y Theerakulkait, 1995; Rodríguez-Saona y col., 1995; Bahçeci y col., 2005; Gökmen y col., 2005).

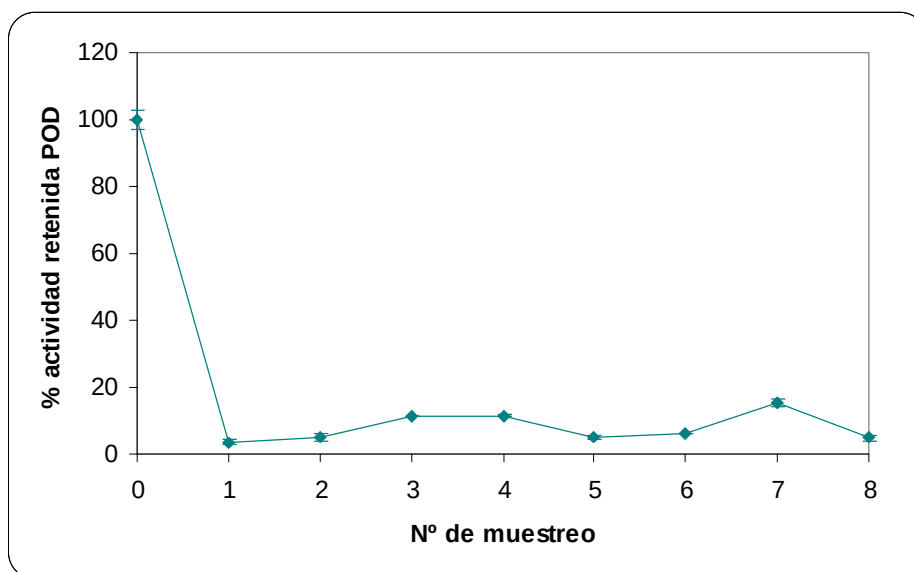


Figura 79. Evolución en la actividad de la peroxidasa en grelo escaldado durante el almacenamiento a temperatura de congelación.

4.4.1.2. Enzima lipoxigenasa (LOX)

La cinética de la enzima LOX se evaluó durante 300 s, y la pendiente de la recta se calculó en ese rango ya que la velocidad de la reacción fue lineal durante ese período de tiempo. Se obtuvieron 9 rectas (por duplicado) correspondientes a las 9 muestras analizadas y los coeficientes de regresión, $r=0.98$ a $r=0.99$, se consideran adecuados para este análisis.

La LOX en producto fresco, tiene una actividad de 68.32 ± 1.89 U (Tabla 37). Este valor disminuye considerablemente, tras el escaldado a vapor durante 2 min, a 2.37 ± 0.23 U, lo cual da una reducción aproximada del 96.5 % de actividad de la enzima. Estos resultados, similares a los obtenidos para la POD, demuestran que el tratamiento térmico de escaldado, efectuado en este trabajo, ha sido efectivo para inactivar la misma, ya que según Bahçeci y col. (2005), una reducción de >90 % de la actividad de la enzima indicadora es lo que se recomienda para tener una calidad óptima de los vegetales durante el almacenamiento a temperatura de congelación.

Tabla 35. Actividad de lipoxigenasa en grelo escaldado.

Nº muestreo	actividad LOX ^a	actividad retenida LOX ^b
0	68.32 ± 1.89	100
1	2.37 ± 0.23	3.47
2	2.80 ± 0.06	4.10
3	2.91 ± 0.12	4.26
4	1.82 ± 0.18	2.67
5	1.80 ± 0.14	2.64
6	3.31 ± 0.10	4.84
7	2.32 ± 0.03	3.40
8	2.95 ± 0.25	4.31

Promedio ± desviación estándar (n=2); ^a1 U LOX = incremento en la absorbancia de 0.001 a 234 nm por min por mg de proteína, bajo las condiciones de ensayo, ^b%.

Durante el período de almacenamiento en congelación se aprecian diferencias estadísticamente significativas, tras la aplicación de un ANOVA de un factor ($F=23.807$, $p<0.001$), para la actividad de la lipoxigenasa. Se observa que a medida que transcurre el tiempo de almacenamiento, la actividad retenida de la enzima fluctúa desde 2.64 % (tras 60 días de almacenamiento) hasta un máximo de 4.84 % (tras 75 días de almacenamiento) (Figura 80).

Un problema que ya ha sido identificado en otros trabajos (Suurmeijer y col., 1998; Parraud y col., 1999; Gökmen y col., 2002a), y que fue comprobado al realizar las determinaciones de la enzima lipoxigenasa, es la baja solubilidad del ácido linoleico, lo cual provoca que el medio de reacción pierda su claridad óptica y, por consiguiente, se produzca un incremento en la absorbancia a 234 nm, lo cual puede ser medido como una “pseudo” actividad de la LOX, aún sin que esté presente el extracto enzimático en el medio de reacción.

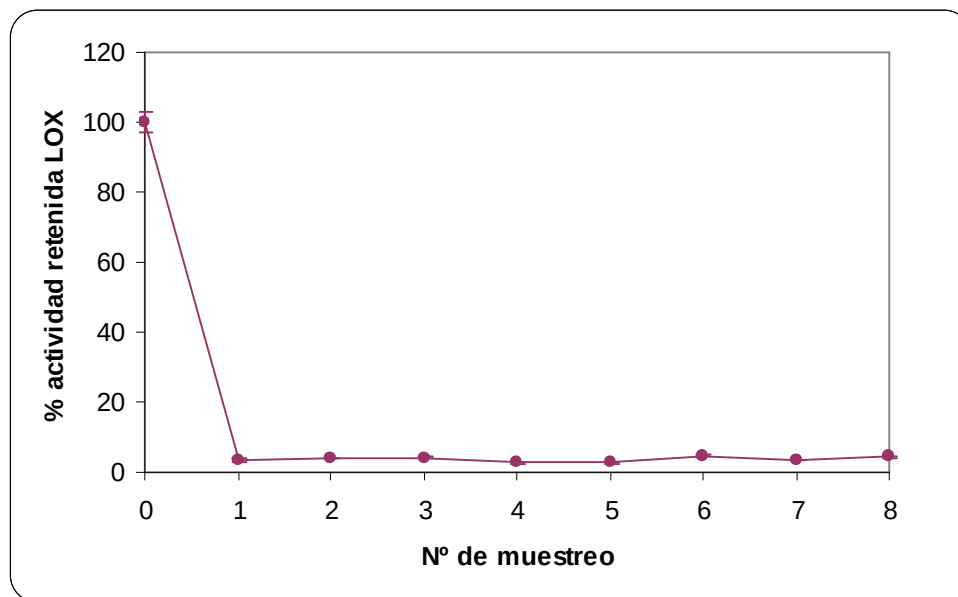


Figura 80. Evolución en la actividad de la lipoxigenasa en grelo escaldado durante el almacenamiento a temperatura de congelación.

En este estudio, no se observó que existiera una reactivación ni de la enzima peroxidasa, ni de la enzima lipoxigenasa, a lo largo del almacenamiento en congelación. La enzima lipoxigenasa fue más estable que la peroxidasa coincidiendo con los resultados obtenidos en judías y zanahorias (Kaur y col., 1999), judías verdes (Bahçeci y col., 2005) y guisantes (Kaur y col., 1999; Gökmen y col., 2005). Se aplicó el coeficiente de correlación de Pearson entre la actividad de la lipoxigenasa y de la peroxidasa obteniendo un valor de ($r=0.990$, $p=0.000$).

En base a los resultados obtenidos, el uso de las enzimas peroxidasa y lipoxigenasa, como indicadoras del escaldado, pueden ser de utilidad en el grelo sometido a escaldado y posterior almacenamiento en congelación. Sin embargo, valorando la rapidez del método, la facilidad del mismo, y los resultados obtenidos, hasta el momento, la determinación cualitativa de la enzima peroxidasa sería la elegida para actuar como enzima indicadora del escaldado en grelo.

4.4.2. Determinaciones físico-químicas

Con los datos obtenidos en los parámetros analizados, se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) de dos factores, siendo éstos el método de escaldado o cocción (TT) y el tiempo de almacenamiento (t), con la interacción de ambos (TT × t), cuyos resultados se recogen en la Tabla 36.

Tabla 36. ANOVA de dos factores (tratamiento térmico y tiempo de almacenamiento, con interacción).

variables	TT	t	TT × t
a_w	371.571***	7.490***	8.796***
humedad	106.176***	2.943*	2.351
pH	241.704***	20.151***	6.662**
acidez titulable	5000.894***	32.793***	32.729***
tiamina	2586.530***	24.934***	34.035***
riboflavina	2052.605***	17.529***	11.655***
AA	15630.235***	10.181***	18.366***
DHAA	18.220**	3.098*	5.780**
L*	238.482***	20.691***	6.406**
a*/b*	5226.643***	4.219**	4.361**
H°	5990.390***	4.364**	4.561**
C*	137.405***	20.299***	11.416***
luteína	0.231	10.371***	11.720***
β-caroteno	96.698***	32.474***	18.350***
clorofila a	16834.733***	31.604***	26.689***
clorofila b	8431.019***	47.881***	80.505***
feofitina a	19536.506***	124.194***	127.069***
feofitina b	4360.503***	74.147***	83.980***
cenizas	1850.989***	64.488***	11.644***
fenoles totales	436.994***	12.924***	2.731*
actividad reductora	1068.522***	23.151***	2.716*

*: p<0.05; **: p<0.01; ***: p<0.001; TT: tratamiento térmico; t: tiempo de almacenamiento.

Se observa que existen diferencias estadísticamente significativas para la práctica totalidad de los parámetros analizados, con respecto a los factores tratamiento térmico

(TT) y tiempo de almacenamiento (t) y a la interacción de ambos. Únicamente la **luteína** no presenta diferencias estadísticamente significativas con respecto al tratamiento térmico (TT), y la **humedad**, en la interacción de los dos factores considerados.

En los casos en que la interacción es significativa, se procede al análisis de los resultados de forma independiente, en función del tratamiento térmico aplicado. Para ambos casos, grelo escaldado y grelo cocido, se aplica un ANOVA de un factor (tiempo de almacenamiento). Los datos obtenidos se recogen en las Tablas 37 y 38.

Tabla 37. ANOVA de un factor (tiempo de almacenamiento) en grelo escaldado.

variables	F
a_w	26.286***
humedad	3.182
pH	9.762**
acidez titulable	32.696***
tiamina	128.663***
riboflavina	26.541***
AA	6.457**
DHAA	4.136*
L*	16.674***
a*/b*	2.388
H°	2.348
C*	6.219*
luteína	5.851*
β-caroteno	5.804*
clorofila a	30.308***
clorofila b	52.409***
feofitina a	21.947***
feofitina b	18.982***
cenizas	39.298***
fenoles totales	13.541**
actividad reductora	11.364**

*: p<0.05; **: p<0.01; ***: p<0.001.

Tras la aplicación del ANOVA de un factor (tiempo de almacenamiento) sobre los datos obtenidos para el grelo escaldado (Tabla 37), se observan diferencias estadísticamente significativas para todos los parámetros analizados, excepto para la **humedad**, la relación **a*/b*** y el **tono (H°)**.

Tabla 38. ANOVA de un factor (tiempo de almacenamiento) en grelo cocido.

variables	F
a_w	0.886
humedad	1.985
pH	21.012***
acidez titulable	33.120***
tiamina	0.678
riboflavina	2.993
AA	43.575***
DHAA	5.193*
L*	10.214**
a*/b*	21.610***
H°	22.422***
C*	55.767***
luteína	14.521**
β-caroteno	49.409***
clorofila a	13.919**
clorofila b	116.364***
feofitina a	141.111***
feofitina b	89.654***
cenizas	36.718***
fenoles totales	4.872*
actividad reductora	15.973***

*: p<0.05; **: p<0.01; ***: p<0.001.

Al realizar el ANOVA de un factor (tiempo de almacenamiento) sobre los datos obtenidos para el grelo cocido (Tabla 38), se observan diferencias estadísticamente significativas para todos los parámetros, excepto para la **actividad de agua**, **humedad**, **tiamina** y **riboflavina**.

Asimismo, para comparar los resultados entre el grelo fresco, y el recién escaldado o cocido, se utiliza el test t-Student para muestras independientes y los datos se recogen en las tablas 39 y 40, respectivamente.

Tabla 39. Test t-Student entre el grelo fresco y el grelo escaldado.

variables	valor p
a_w	-
humedad	0.063
pH	0.070
acidez titulable	0.000***
tiamina	0.074
riboflavina	0.012*
AA	0.030*
DHAA	0.017*
L*	0.120
a*/b*	0.220
H°	0.219
C*	0.005**
luteína	0.266
β-caroteno	0.441
clorofila a	0.008**
clorofila b	0.002**
feofitina a	0.090
feofitina b	0.144
cenizas	0.003**
fenoles totales	0.010*
actividad reductora	0.047*

Al aplicar el test t-Student sobre los datos correspondientes al grelo fresco y al grelo tras el escaldado (Tabla 39). Se observa que existen diferencias estadísticamente significativas para los parámetros analizados, excepto **humedad**, **pH**, **tiamina**, **L***, **a*/b***, **H°**, **luteína**, **β -caroteno**, **feofitina a** y **feofitina b**. Para el parámetro a_w no se obtiene un valor p ya que las desviaciones típicas son iguales a 0.

Tabla 40. Test t-Student entre el grelo fresco y el grelo cocido.

Variables	Tiempo de almacenamiento
a_w	0.126
humedad	0.049*
pH	0.019*
acidez titulable	0.000***
tiamina	0.024*
riboflavina	0.003**
AA	0.013**
DHAA	0.008**
L*	0.377
a^*/b^*	0.008**
H°	0.007**
C*	0.033*
luteína	0.091
β-caroteno	0.038*
clorofila a	0.010*
clorofila b	0.004**
feofitina a	0.001**
feofitina b	0.036*
cenizas	0.002**
fenoles totales	0.004**
actividad reductora	0.005**

Tras la aplicación del test t-Student entre los datos obtenidos para el grelo fresco y para el grelo tras la cocción (Tabla 40), se observa que existen diferencias estadísticamente significativas para los parámetros analizados, excepto para **a_w** , **L*** y **luteína**.

A continuación, se analizarán cada uno de los parámetros estudiados.

4.4.2.1. Actividad de agua (a_w)

Muchas de las propiedades de los alimentos, pero especialmente su susceptibilidad al crecimiento microbiano, están relacionadas con el contenido en agua, aunque lo realmente importante no es el contenido en sí, sino la disponibilidad del agua para los microorganismos. Esta disponibilidad está estrechamente relacionada con el término actividad de agua. La velocidad de las reacciones enzimáticas y no enzimáticas, también está influenciada por este parámetro (Coultate, 1996).

La actividad de agua en el grelo fresco presentó un valor de 0.996 ± 0.00 . Tras el escaldado y la cocción este valor aumentó a 0.997 ± 0.00 y 0.999 ± 0.00 , respectivamente (Tabla 41), incrementos no significativos, tal y como se ha comprobado tras la aplicación del test t-Student (Tabla 40).

Tabla 41. A_w y humedad en grelo escaldado y grelo cocido a lo largo del tiempo de almacenamiento a temperaturas de congelación.

Nº muestreo	actividad de agua (a_w)		humedad ^a	
	grelo escaldado	grelo cocido	grelo escaldado	grelo cocido
0	0.996 ± 0.00	0.996 ± 0.00	92.7 ± 0.10	92.7 ± 0.10
1	0.997 ± 0.00	0.999 ± 0.00	93.8 ± 0.20	93.3 ± 0.00
2	0.994 ± 0.00	0.999 ± 0.00	93.8 ± 0.40	93.3 ± 0.00
3	0.997 ± 0.00	0.998 ± 0.00	94.1 ± 0.10	93.3 ± 0.10
4	0.995 ± 0.00	0.998 ± 0.00	94.3 ± 0.00	93.5 ± 0.10
5	0.993 ± 0.00	0.999 ± 0.00	94.0 ± 0.10	93.1 ± 0.40
6	0.995 ± 0.00	0.998 ± 0.00	93.7 ± 0.10	93.3 ± 0.10
7	0.995 ± 0.00	0.999 ± 0.00	93.7 ± 0.00	93.5 ± 0.00
8	0.995 ± 0.00	0.998 ± 0.00	93.9 ± 0.10	93.2 ± 0.10

Promedio $\pm$ desviación estándar (n=2); ^a %.

A lo largo del tiempo de almacenamiento existen diferencias estadísticamente significativas para el grelo escaldado, donde los valores fluctúan desde 0.997 ± 0.00 hasta 0.993 ± 0.00 , tendiendo a disminuir a medida que avanza el período de almacenamiento.

(Figura 81). Estos resultados coinciden con lo indicado por Fellows (1994) y Aleixandre (1997), los cuales señalan que la congelación en los alimentos provoca una disminución de la actividad de agua. Sin embargo, para el grelo cocido esto no se cumple ya que no existen diferencias estadísticamente significativas durante el almacenamiento.

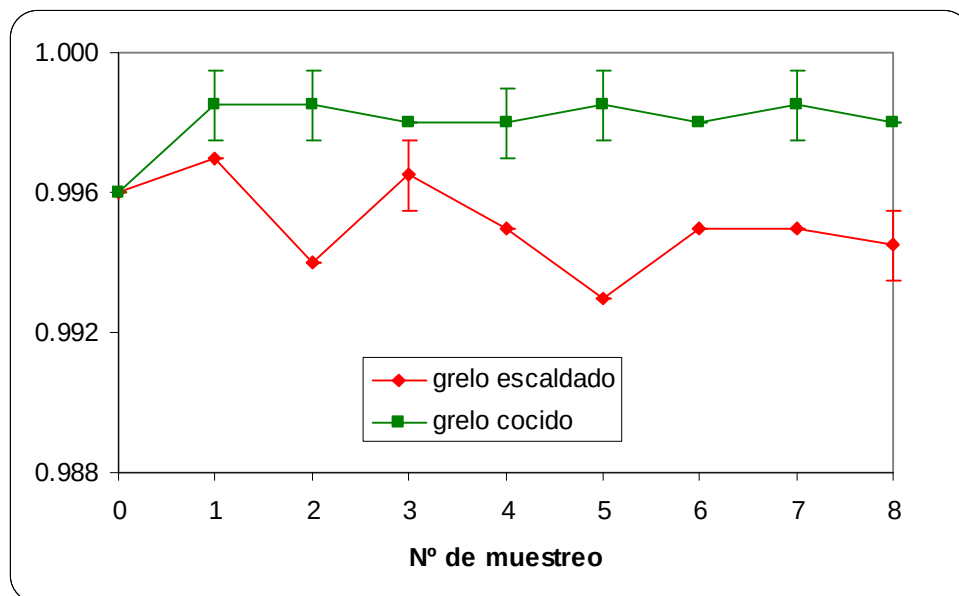


Figura 81. Evolución de la actividad de agua en grelo escaldado y grelo cocido durante el almacenamiento a temperatura de congelación.

4.4.2.2. Humedad

Con respecto a la humedad, se obtuvo un valor de 92.7 ± 0.10 para el grelo fresco, 93.8 ± 0.20 para el grelo escaldado y 93.3 ± 0.00 para el grelo cocido (Tabla 41). Este ligero incremento que sufre el grelo tras el tratamiento térmico aplicado no es significativo en el caso del grelo escaldado (Tabla 39), y si lo es en el caso del grelo cocido, no obstante el valor de p es elevado (Tabla 40).

Durante el almacenamiento a -20°C , el contenido de humedad permanece relativamente estable, no existiendo diferencias estadísticamente significativas, a lo largo del tiempo de almacenamiento en ninguna de las dos muestras (Tablas 37 y 38, Figura

82). Estos datos coinciden con Wu y col. (1992), los cuales observaron que durante el almacenamiento en congelación de brócoli, el contenido de humedad apenas varió.

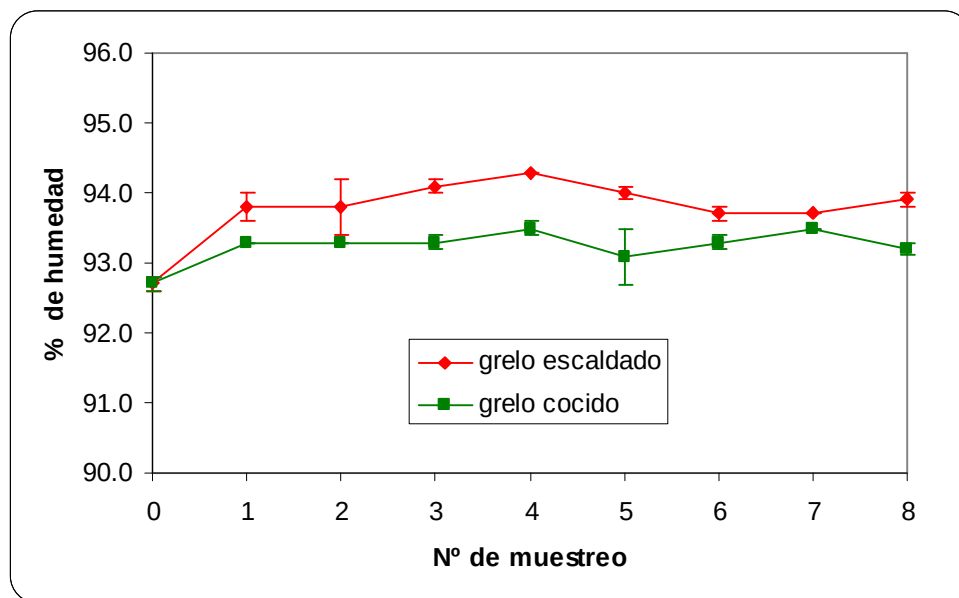


Figura 82. Evolución de la humedad en grelo escaldado y grelo cocido durante el almacenamiento a temperatura de congelación.

Ensayos preliminares, realizados por el grupo de investigación (García, 2005), determinaron que no existe una correlación significativa entre las variables actividad de agua y humedad, lo cual se comprobó en esta serie de experimentos, al aplicar el análisis de correlación de Pearson ($r = -0.469$, $p = 0.050$).

4.4.2.3. pH

Los valores de pH varían desde un valor inicial de 6.34 ± 0.00 para el grelo fresco, a un valor de 6.39 ± 0.01 , tras el escaldado y de 6.51 ± 0.01 , tras la cocción (Tabla 42). Los incrementos sufridos por el pH son estadísticamente significativos, en el caso de la cocción, tal y como se puede observar con el test t-Student (Tablas 39 y 40).

Tabla 42. pH y acidez en grelo escaldado y grelo cocido.

Nº muestreo	pH		acidez ^a	
	grelo escaldado	grelo cocido	grelo escaldado	grelo cocido
0	6.34 ± 0.00	6.34 ± 0.00	0.09 ± 0.00	0.09 ± 0.00
1	6.39 ± 0.01	6.51 ± 0.01	0.03 ± 0.00	0.01 ± 0.00
2	6.35 ± 0.01	6.46 ± 0.00	0.05 ± 0.00	0.01 ± 0.00
3	6.46 ± 0.00	6.56 ± 0.01	0.05 ± 0.00	0.01 ± 0.00
4	6.38 ± 0.04	6.47 ± 0.03	0.05 ± 0.00	0.01 ± 0.00
5	6.42 ± 0.01	6.53 ± 0.00	0.04 ± 0.00	0.01 ± 0.00
6	6.41 ± 0.03	6.48 ± 0.01	0.04 ± 0.00	0.01 ± 0.00
7	6.45 ± 0.00	6.48 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.02 ± 0.00
8	6.42 ± 0.01	6.44 ± 0.01	0.04 ± 0.00	0.02 ± 0.00

Promedio ± desviación estándar (n=2); ^a % de ácido málico.

Durante el almacenamiento del grelo congelado, tal y como puede observarse en la Figura 83, existen fluctuaciones significativas en los dos tipos de muestras (Tablas 37 y 38), aunque la tendencia a lo largo del almacenamiento a temperatura de congelación, es que haya un incremento del pH, tal y como ocurría en los primeros ensayos realizados (Mondragón-Portocarrero y col., 2006).

Estas fluctuaciones han sido analizadas por Cano (1996) y Canet y Álvarez (2000), los cuales señalan, que durante la congelación, las sales orgánicas e inorgánicas tienden a concentrarse en la fase acuosa del tejido. Estas sales pueden precipitar durante el enfriamiento y cambiar el pH de la fase acuosa no congelable. Tras la congelación, el pH disminuye inicialmente, pero posteriormente se incrementa, siendo más significativo en productos congelados y almacenados a temperaturas muy bajas.

Los cambios en el pH, durante el almacenamiento en congelación de productos vegetales, pueden ser importantes debido a que pueden afectar directamente la velocidad de algunas reacciones bioquímicas relacionadas con los cambios de calidad de productos congelados durante su almacenamiento y distribución (Cano, 1996).

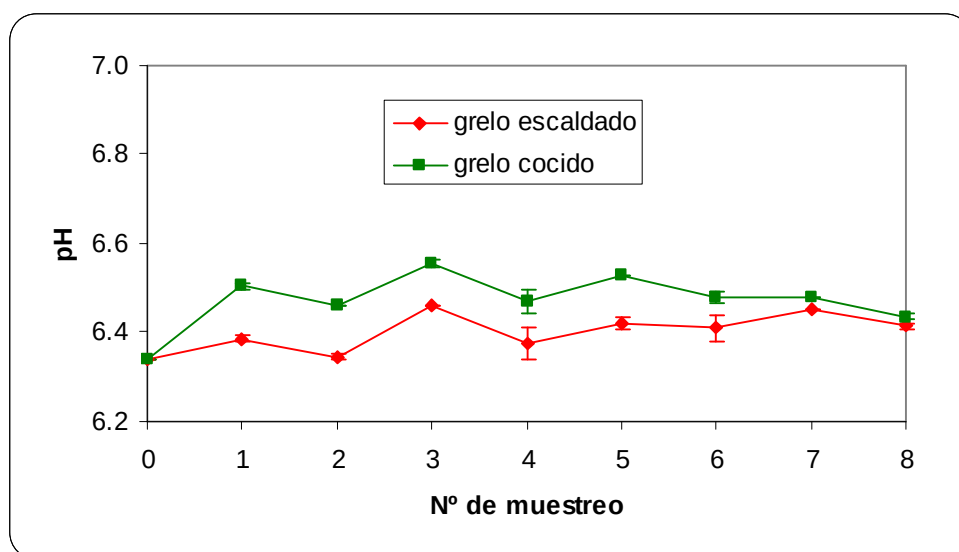


Figura 83. Evolución del pH en grelo escaldado y grelo cocido durante el almacenamiento a temperatura de congelación.

4.4.2.4. Acidez titulable

La acidez titulable se expresa como % de ácido málico, debido a que este es el ácido orgánico mayoritario en el grelo.

La aplicación de los tratamientos térmicos produjo un descenso importante de la acidez, desde valores en grelo fresco de 0.09 ± 0.00 % de ácido málico a valores de 0.03 ± 0.00 % de ácido málico, para la muestra tras el escaldado (disminución del 66.6 %) y de 0.01 ± 0.00 % de ácido málico, para la muestra tras la cocción (disminución del 88.8 %) (Tabla 42). Esta disminución en la acidez es estadísticamente significativa en los dos tipos de muestras (Tablas 39 y 40).

Tal y como se ha observado en el primer ensayo (Mondragón-Portocarrero y col., 2006) durante el almacenamiento en congelación, existen diferencias estadísticamente significativas, a lo largo del período de almacenamiento en los dos tipos de grelo (Figura 84). La acidez en el grelo escaldado fluctúa entre 0.03 ± 0.00 % de ácido málico y $0.05 \pm$

0.00 % de ácido málico, en cambio en el grelo cocido se observan los valores más bajos de acidez, siempre inferiores o iguales al 0.02 % de ácido málico.

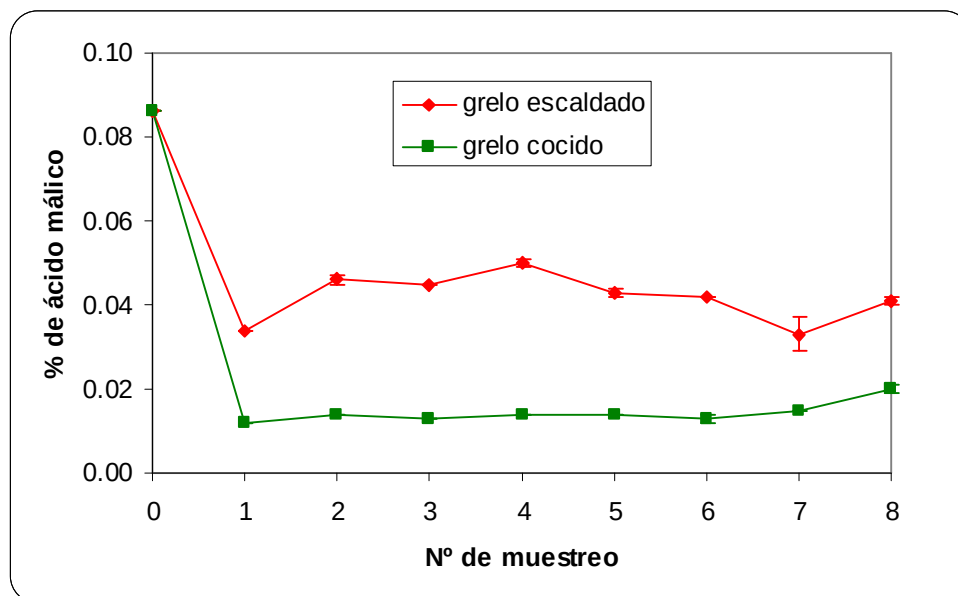


Figura 84. Evolución de la acidez titulable en grelo escaldado y grelo cocido durante el almacenamiento a temperatura de congelación.

4.4.2.5. Vitamina B₁ (tiamina) y vitamina B₂ (riboflavina)

Tiamina

El grelo fresco presenta un contenido de 0.12 ± 0.01 mg de tiamina/100 g de materia fresca. Este valor se sitúa entre los señalados por Simal y col. (1983) (0.21 mg de vitamina B₁/100 g) y Mataix y col. (2003) (0.06 mg de vitamina B₁/100 g). Muchos factores influyen para que exista gran variabilidad en los valores nutricionales de cada hortaliza, no sólo influye la especie de la misma, sino también la forma de cultivo, el área geográfica en donde se siembra, la forma de cosecharla, el tratamiento postcosecha a que se ve sometida, etc.

Esto fue comprobado durante la puesta a punto del método ya que, dependiendo del origen del grelo, de su frescura y de la fecha de cosecha y compra del mismo, se

observaron oscilaciones en el valor de este nutriente, desde 0.06 hasta 0.23 mg de vitamina B₁/100 g.

Existe una pérdida importante de este nutriente tras la aplicación de los tratamientos térmicos, 33.3 % tras el escaldado (0.08 ± 0.00 mg vitamina B₁/100 g) y 58.3 % tras la cocción (0.05 ± 0.00 mg vitamina B₁/100 g) (Tabla 43). El test t-Student señala que esta disminución es estadísticamente significativa solo en el caso de la cocción (Tablas 39 y 40).

La tiamina es una de las vitaminas más lábiles, y, por lo tanto, más fácilmente destruida por el calor (Cano, 1996), incluso la sensibilidad térmica de esta vitamina puede compararse perfectamente con las del ácido fólico y la vitamina C (Selman, 1994). Sólo en condiciones ácidas, es decir, a pH inferiores a 5, resiste el calentamiento. Asimismo, las mayores pérdidas de tiamina, tanto en el cocinado doméstico, como en el procesado industrial, tienen lugar más por lixiviación que por transformaciones químicas (Coulter, 1996). Por ejemplo, las espinacas pueden perder hasta el 90 % de su contenido de tiamina, especialmente si el agua usada para su cocción tiene un pH alto y contiene niveles elevados de cloro (Lynch y Young, 2000).

En base a lo anterior, se aplicó el análisis de correlación de Pearson entre el pH y el contenido en vitamina B₁, encontrando una correlación significativa ($r=-0.802$, $p=0.009$). Con ello se comprobó que este factor influye significativamente en la degradación de la tiamina, al presentar valores por encima de 6 (Tabla 42). No obstante, el factor que más pudo influir, fue el tratamiento térmico y su duración, ya que las mayores pérdidas se observaron en el proceso de cocción. Estos resultados coinciden con Kimura y col. (1982) los cuales señalan que entre varios métodos de cocción, el uso de agua hirviendo provoca pérdidas significativas de tiamina.

Tabla 43. Tiamina y riboflavina en grelo escaldado y grelo cocido.

Nº muestreo	tiamina (vitamina B ₁) ^a		riboflavina(vitamina B ₂) ^a	
	grelo escaldado	grelo cocido	grelo escaldado	grelo cocido
0	0.12 ± 0.01	0.12 ± 0.01	0.16 ± 0.01	0.16 ± 0.01
1	0.08 ± 0.00	0.05 ± 0.00	0.10 ± 0.01	0.06 ± 0.01
2	0.08 ± 0.00	0.05 ± 0.00	0.10 ± 0.00	0.05 ± 0.01
3	0.08 ± 0.00	0.05 ± 0.01	0.10 ± 0.00	0.05 ± 0.00
4	0.08 ± 0.00	0.05 ± 0.00	0.09 ± 0.00	0.05 ± 0.00
5	0.08 ± 0.00	0.05 ± 0.00	0.10 ± 0.00	0.05 ± 0.00
6	0.09 ± 0.00	0.05 ± 0.00	0.11 ± 0.00	0.06 ± 0.00
7	0.10 ± 0.00	0.05 ± 0.00	0.12 ± 0.00	0.05 ± 0.00
8	0.10 ± 0.00	0.05 ± 0.00	0.11 ± 0.00	0.06 ± 0.00

Promedio ± desviación estándar (n=4); ^a mg/100 g de materia fresca.

Por otra parte, durante el almacenamiento en congelación, existen diferencias estadísticamente significativas, a lo largo del tiempo en el caso de los grelos escaldados (Tabla 37). Los valores oscilan entre 0.08 ± 0.00 y 0.10 ± 0.00 , observándose un ligero incremento a medida que transcurre el tiempo de almacenamiento. Sin embargo, en el caso de los grelos cocidos, no existen diferencias estadísticamente significativas (Tabla 38), ya que los valores son relativamente constantes (Figura 85). Estos resultados coinciden con Mahan y Arlin (1995) y Cano (1996), los cuales observaron que la congelación no tiene efecto, o es muy ligero, sobre el contenido de tiamina de los alimentos congelados, siempre y cuando la temperatura de almacenamiento esté por debajo de $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$.

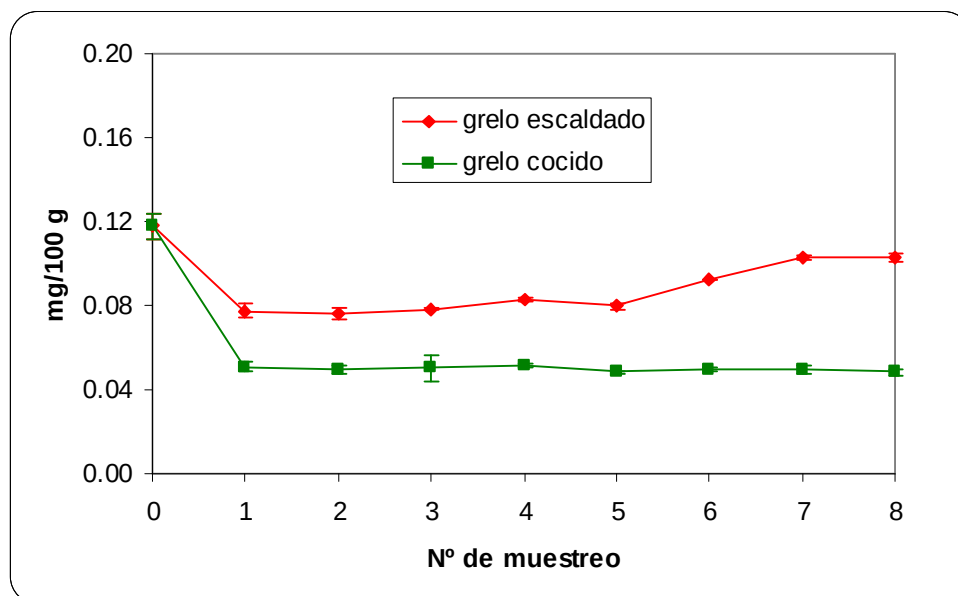


Figura 85. Evolución de la vitamina B₁ en grelo escaldado y grelo cocido durante el almacenamiento a temperatura de congelación.

Riboflavina

El contenido de riboflavina o vitamina B₂ del grelo fresco es de 0.16 ± 0.01 mg de vitamina B₂/100 g (Tabla 43). Este valor es ligeramente inferior a lo indicado por otros autores que se sitúan entre 0.39 mg de vitamina B₂/100 g (Simal y col., 1983) y 0.20 mg de vitamina B₂/100 g (Mataix y col., 2003). Tal y como se ha indicado para la vitamina B₁, la variabilidad en el contenido de esta vitamina, puede deberse a un cúmulo de factores.

También, este comportamiento fue comprobado durante la puesta a punto del método ya que, dependiendo del origen del grelo, de su frescura y de la fecha de cosecha y compra del mismo, se observaron oscilaciones en el valor de este nutriente, desde 0.15 mg de vitamina B₂/100 g hasta 0.21 mg de vitamina B₂/100 g.

Los valores encontrados para el grelo, tras el escaldado y tras la cocción, son de 0.10 ± 0.01 y 0.06 ± 0.01 mg de vitamina B₂/100 g, respectivamente (Tabla 43). Existe una pérdida importante de este nutriente, tras la aplicación de ambos tratamientos térmicos,

37.5 % para el escaldado y 62.5 % para la cocción, respectivamente. El test t-Student, señala diferencias estadísticamente significativas tras la aplicación de ambos tratamientos térmicos (Tablas 39 y 40).

Existen autores que señalan que la riboflavina es la vitamina más resistente al calor y a la oxidación, por lo que durante el tratamiento térmico y procesado de los alimentos se pierde muy poca cantidad (Selman, 1994; Mahan y Arlin, 1995). Sin embargo, otros autores establecen que esta vitamina es fácilmente destruida por un tratamiento térmico (Cano, 1996). Asimismo se ha observado que las pérdidas de riboflavina, dependen del tipo de vegetal que se procese ya que en un estudio realizado por Mosha y col. (1995) se observó que la aplicación de los procesos de escaldado y cocción en diferentes productos vegetales producía diferentes efectos en el contenido de riboflavina.

En el presente estudio, el tratamiento térmico ha influido también en la destrucción de esta vitamina. Aún cuando los resultados muestran una mayor pérdida de riboflavina que de tiamina, ambas vitaminas están estrechamente correlacionadas ($r=0.993$, $p=0.000$). Las mayores pérdidas de vitamina B₂ sobre vitamina B₁ coinciden con lo reportado por Cano (1996).

Por otra parte, durante el almacenamiento en congelación, existen diferencias estadísticamente significativas, a lo largo del tiempo de almacenamiento. En los grelos escaldados, los valores oscilan entre 0.09 ± 0.00 y 0.12 ± 0.00 mg de vitamina B₂/100 g, comportamiento similar al de la vitamina B₁. Sin embargo, en el caso de los grelos cocidos, no existen diferencias estadísticamente significativas, ya que los valores son relativamente constantes (Figura 86). Este comportamiento de la vitamina B₂ es similar al de la vitamina B₁ y coincide con lo indicado por Cano (1996).

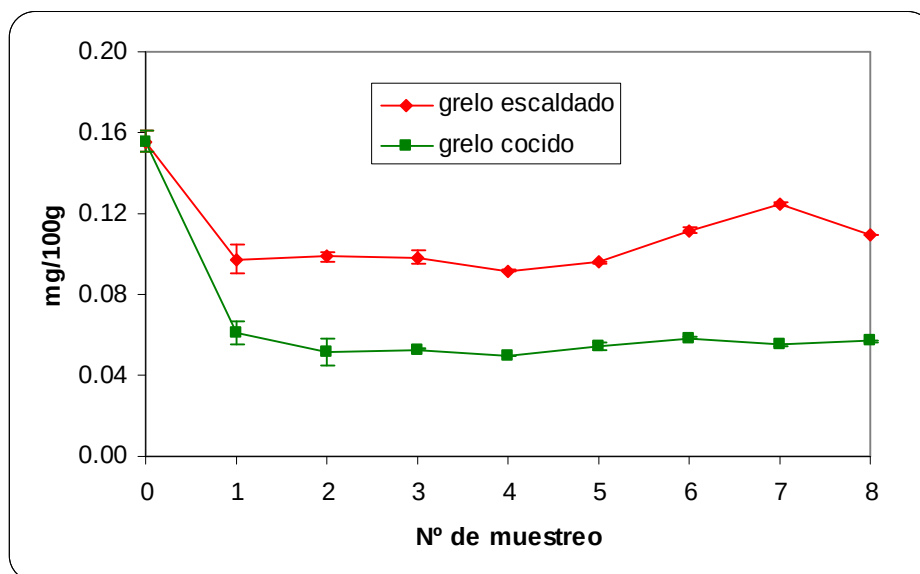


Figura 86. Evolución de la vitamina B₂ en grelo escaldado y grelo cocido durante el almacenamiento a temperatura de congelación.

4.4.2.6. Vitamina C (AA y DHAA)

Ácido ascórbico (AA)

El contenido promedio de AA en grelo fresco fue de 35.18 ± 0.81 mg AA/100 g (Tabla 44), resultado comparable al indicado en diferentes referencias bibliográficas, (Mataix y col., 2003; <http://www.sehlelha.org/busalimento.aspx>, 30/10/2005; <http://perso.wanadoo.es/conservaslou/p44.html>, 06/01/2006).

Tabla 44. Ácido ascórbico y ácido dehidroascórbico en grelo escaldado y grelo cocido.

Nº muestreo	AA ^a		DHAA ^a	
	grelo escaldado	grelo cocido	grelo escaldado	grelo cocido
0	35.18 ± 0.81	35.18 ± 0.81	5.52 ± 0.21	5.52 ± 0.21
1	30.17 ± 0.97	9.38 ± 0.07	1.10 ± 0.04	3.14 ± 0.16
2	28.29 ± 1.19	7.11 ± 0.06	1.80 ± 0.10	2.77 ± 0.07
3	31.32 ± 0.86	6.13 ± 0.05	1.62 ± 0.52	2.26 ± 0.11
4	32.12 ± 0.10	6.51 ± 0.07	2.63 ± 0.58	2.85 ± 0.34
5	30.28 ± 0.08	5.48 ± 0.55	2.51 ± 0.16	2.70 ± 0.10
6	29.81 ± 0.11	8.22 ± 0.24	2.58 ± 0.11	2.36 ± 0.42
7	29.47 ± 0.03	8.80 ± 0.62	2.15 ± 0.03	2.13 ± 0.18
8	30.42 ± 0.42	9.53 ± 0.34	2.18 ± 0.67	2.10 ± 0.26

Promedio ± desviación estándar (n=4); AA: ácido ascórbico, DHAA: ácido dehidroascórbico;
^a mg/100 g de materia fresca.

Los valores obtenidos en el grelo, tras el escaldado y tras la cocción, son de 30.17 ± 0.97 y 9.38 ± 0.07 mg AA/100 g, respectivamente. Esto supone una pérdida tras la aplicación de ambos tratamientos térmicos del 14.2 % para el escaldado y del 73.3 % para la cocción. El test t-Student señala que estas disminuciones son estadísticamente significativas, tras la aplicación de ambos tratamientos térmicos (Tablas 39 y 40).

La pérdida de vitamina C, en las muestras evaluadas, probablemente se deban al efecto de los tratamientos de calor que pueden haber desencadenado la degradación de este compuesto termolábil mediante la aceleración de la oxidación química a la forma dehidroascórbico (DHAA), seguida por la hidrólisis al ácido 2,3-dicetogulónico y la polimerización adicional para formar otros productos inactivos (Dewanto y col., 2002; Giannakourou y Taoukis, 2003).

Carbonell y col. (1985) expusieron nabos a vapor durante 1 min y encontraron que el contenido de vitamina C se reducía en un 25 %. Asimismo, Canet (1996) indica que las pérdidas medias de vitamina C en hortalizas son de un 30 % tras un escaldado a vapor. En

el presente estudio, las pérdidas de AA en los grelos expuestos al escaldado a vapor (14.2 %) son claramente inferiores a las reportadas por los anteriores autores, lo cual parece indicar que se realizó un tratamiento térmico en tiempo y temperatura adecuados. Además, estas pérdidas provocadas por el escaldado son similares a las encontradas en el primer estudio (Mondragón-Portocarrero y col., 2006) e independientes del contenido inicial de vitamina C. Garrote y col. (2006) señalan que se obtienen elevadas retenciones de ácido ascórbico usando altas temperaturas y tiempos de calentamientos cortos.

En cuanto a la cocción, Illo y col. (1995) indican pérdidas en vitamina C que oscilan entre 13.9 % y 53.3 %, en función del método de cocción utilizado. Las pérdidas en vitamina C tras la cocción, en el presente estudio, se encuentran muy por encima de las señaladas por estos autores, sin embargo, son próximas a las indicadas por Adragna-Bourgeois y Bourgeois (2002). Por el contrario, autores como Kala y Prakash (2004) no encontraron influencia del método de cocción aplicado.

Es importante tener en cuenta que las pérdidas vitamínicas generadas durante un tratamiento térmico, son muy dependientes de numerosos factores como por ejemplo, el cultivar, el método de recolección, el índice de madurez, el tamaño, y el contenido vitamínico inicial (Howard y col., 1999). Por ejemplo, en hojas de brócoli y espinaca la concentración de vitamina C se incrementó con la maduración de las plantas (Botero Omary y col., 2003; Yamada y col., 2003); pero disminuyó en lechuga (Drews y col., 1995, 1997). No obstante, las pérdidas más importantes dependen del tipo de hortaliza y de la parte de la planta que se analice. Giannakourou y Taoukis (2003) observaron que las espinacas (muy semejantes en morfología y contenido vitamínico a los grelos) son más susceptibles de sufrir pérdidas de vitamina C, comparadas con guisantes y judías verdes, por su elevada área superficial y su alto contenido en hierro. Asimismo, Oguchi y col. (1996) y Lisiewska y col. (2006) observaron que existen diferencias dependiendo de la parte de la planta que se analice, encontrando mayor contenido de vitamina C en hojas de espinaca que en otras partes de la planta.

Otros factores también pueden influir para que haya diferencias en el contenido de vitamina C, por ejemplo, Wekesa y col. (2001) observaron que se producen mayores pérdidas cuando se usan cantidades elevadas de agua durante la cocción, y cuando se utiliza un cuchillo sin filo, que cuando los vegetales se cortan con un cuchillo afilado. También se determinó que existían mayores pérdidas cuando el vegetal era cocido en piezas pequeñas que en piezas más grandes.

Por otra parte, durante el almacenamiento en congelación se apreciaron ligeras oscilaciones, aunque estadísticamente significativas, en las muestras sometidas a ambos tratamientos térmicos a lo largo del tiempo de almacenamiento (Tablas 37 y 38, Figura 87).

Estas oscilaciones fueron anteriormente señaladas por Toledo y col. (2003) y Viña y Chaves (2006), los cuales observaron que durante el almacenamiento, el contenido de AA en espinaca y perejil primero disminuyó y posteriormente se incrementó, lo cual puede estar relacionado con un aumento en la acidez de estas hortalizas (Lee y Kader, 2000). En este estudio se encontraron altas correlaciones entre el contenido de ácido ascórbico y el parámetro de acidez titulable ($r=0.989$, $p=0.000$).

El hecho de que las pérdidas de AA sean mayores después de un tratamiento térmico y relativamente menores durante el almacenamiento en congelación, sugiere que el factor principal de pérdida se debe más al tratamiento térmico que al período de almacenamiento. Esto coincide con lo señalado en el primer estudio (Mondragón-Portocarrero y col., 2006), en el cual se señaló que es el tratamiento térmico y no la congelación el proceso que provoca las pérdidas de vitamina C en vegetales congelados.

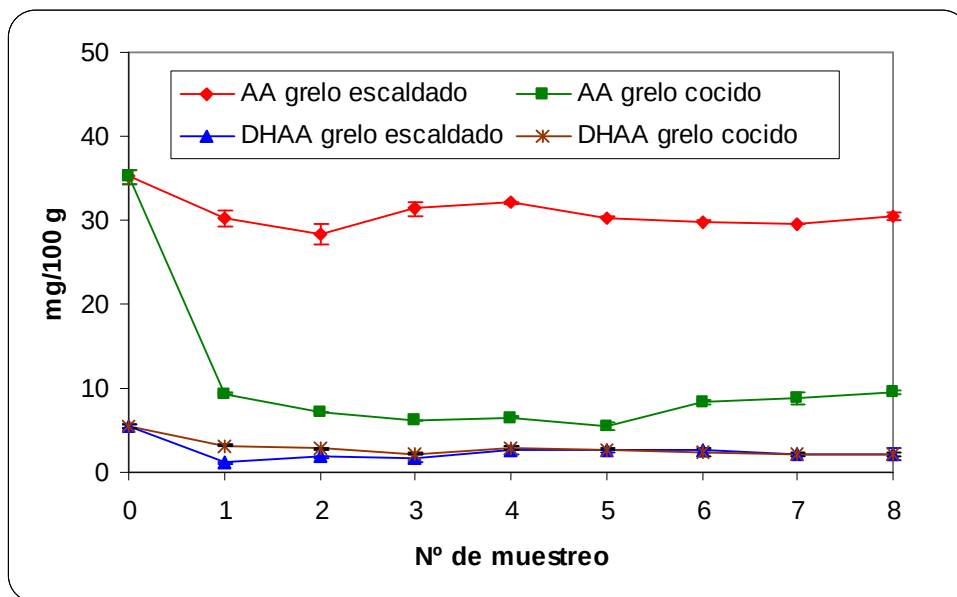


Figura 87. Evolución del AA y DHAA en grelo escaldado y grelo cocido durante el almacenamiento a temperatura de congelación.

Ácido dehidroascórbico (DHAA)

Como ya se señaló anteriormente, el contenido de ácido dehidroascórbico (DHAA), se determinó como la diferencia entre el contenido de ácido ascórbico total (tras la reacción de reducción del DHAA) y el contenido de ácido ascórbico (AA) de la muestra original.

El contenido del DHAA en el grelo fresco fue de 5.52 ± 0.21 mg DHAA/100 g. Tras el escaldado fue de 1.10 ± 0.04 mg DHAA/100 g y tras la cocción fue de 3.14 ± 0.16 mg DHAA/100 g (Tabla 44), lo que suponen retenciones del 19.9 % y 56.9 %, para el escaldado y la cocción, respectivamente. El test t-Student señala que estas retenciones son estadísticamente significativas, tras la aplicación de ambos tratamientos térmicos (Tablas 39 y 40).

Las mayores retenciones de DHAA producidas en el grelo tras la cocción, son debidas a que el AA expuesto al calor sufre una transformación a DHAA, y ésta se ve

más acentuada según la intensidad del tratamiento térmico, por lo tanto, existirá mayor cantidad de DHAA en el grelo cocido (Giannakourou y Taoukis, 2003).

Durante el almacenamiento en congelación, se observan diferencias estadísticamente significativas para el DHAA, en ambos tipos de muestras (Figura 87). En el caso del grelo tras el escaldado, la tendencia general es a aumentar ligeramente el contenido de este ácido, no así para el grelo tras la cocción, en el que la tendencia es a disminuir su contenido. Esta disminución puede deberse a lo señalado por Favell (1998) y Makhoul y col. (1995), los cuales indican que durante el procesado, distribución y almacenamiento de los vegetales congelados, el AA se oxida a DHAA, que es irreversiblemente hidrolizado a ácido 2,3- dicetogulónico, el cual no posee actividad de vitamina C.

Resumen de vitaminas

Las vitaminas analizadas en este estudio, vitamina B₁, vitamina B₂, ácido ascórbico y ácido dehidroascórbico, junto con el β -caroteno, han cobrado mucha importancia en los últimos años debido a su relación con propiedades antioxidantes y anticarcinogénicas (Agte y col., 2002). Teniendo en cuenta que el contenido de vitamina C se usa como indicador de la severidad de un tratamiento térmico y del valor nutritivo de un alimento (por ser la más lábil de las vitaminas hidrosolubles) (Rumm-Kreuter y Demmel, 1990; Giannakourou y Taoukis, 2003), se puede decir que los contenidos de dichas vitaminas, en los grelos tras el escaldado y la cocción, son representativos de que los tratamientos térmicos aplicados fueron adecuados en tipo y duración, teniendo también en cuenta el tipo de hortaliza utilizada. Es importante conocer que la mayoría de los tratamientos industriales destruyen una parte de las vitaminas, pero no más que las preparaciones culinarias habituales, de forma que los productos transformados conservan un gran valor nutricional (Adragna-Bourgeois y Bourgeois, 2002).

4.4.2.7. Parámetros de color CIE_{L*a*b*}

El color es el principal índice de calidad por el cual los consumidores evalúan los productos naturales y los procesados. Los vegetales congelados están expuestos a modificaciones en el color provocadas durante el escaldado y/o almacenamiento en congelación (Bahçeci y col., 2005).

El sistema CIE_{L*a*b*} es el método más versátil y cómodo para evaluar el color de frutas y vegetales durante el procesado y su posterior almacenamiento (Alcedo y col., 1973; Gnanasekharan y col., 1992; Tian y col., 1995; Tian y col., 1996; Barret y col., 2000; Gunawan y Barringer, 2000; Smout y col., 2003). Los datos de color que se obtienen son L*, que indica el grado de luminosidad, a* que indica contribución al verde (-) y al rojo (+), y b*, que indica contribución al azul (-) y al amarillo (+). Asimismo, a partir de a* y b* se obtiene C*, que es la cromaticidad (la cual es 0 en el centro de la esfera de color y se va incrementando conforme se aleja del mismo) y H°, que es el ángulo de tono y se expresa en grados (su rotación inicia en el eje a*) (McGuire, 1992; Minolta, 1994). El parámetro H° ha sido utilizado por numerosos autores para caracterizar las modificaciones del color (Little, 1975; Akhtar y col., 1999; De Ell y col., 1999; Rocha y Morais, 2003; Brewer y Begum, 2004; Canet y col., 2005; Turkmen y col., 2006).

Luminosidad (L*)

La luminosidad en el grelo fresco presentó un valor de 43.93 ± 0.93 . Tras el escaldado este valor aumentó a 47.31 ± 0.09 , y tras la cocción disminuyó a 42.95 ± 0.06 (Tabla 45). Sin embargo, el test t-Student, no señala que estas diferencias sean estadísticamente significativas, para ninguna de las dos muestras, tras la aplicación de los tratamiento térmicos (Tablas 39 y 40).

En el caso del grelo escaldado, a lo largo del tiempo de almacenamiento, existen fluctuaciones significativas en la luminosidad (Tabla 37). Asimismo, en el caso del grelo cocido, existen diferencias estadísticamente significativas durante el almacenamiento. La tendencia general, para ambos tratamientos térmicos, es a disminuir su luminosidad,

siempre presentando los valores más bajos el grelo cocido, resultados que coinciden con el estudio realizado en brócoli, judías verdes y espárragos por Brewer y Begum (2004).

Tabla 45. Luminosidad y a*/b* en grelo escaldado y grelo cocido.

N° muestreo	luminosidad (L*)		a*/b*	
	grelo escaldado	grelo cocido	grelo escaldado	grelo cocido
0	43.93 ± 0.93	43.93 ± 0.93	-0.31 ± 0.02	-0.31 ± 0.02
1	47.31 ± 0.09	42.95 ± 0.06	-0.34 ± 0.00	0.18 ± 0.01
2	49.46 ± 0.74	43.01 ± 0.88	-0.34 ± 0.05	0.17 ± 0.00
3	47.14 ± 0.02	43.12 ± 0.59	-0.31 ± 0.01	0.21 ± 0.01
4	47.53 ± 0.35	40.62 ± 0.33	-0.31 ± 0.02	0.19 ± 0.00
5	46.25 ± 0.16	43.10 ± 1.66	-0.29 ± 0.05	0.18 ± 0.01
6	46.57 ± 1.99	38.37 ± 0.56	-0.30 ± 0.1	0.24 ± 0.01
7	40.72 ± 1.19	39.63 ± 0.87	-0.39 ± 0.02	0.22 ± 0.00
8	44.29 ± 0.75	39.38 ± 1.07	-0.32 ± 0.03	0.25 ± 0.01

Promedio ± desviación estándar (n=4).

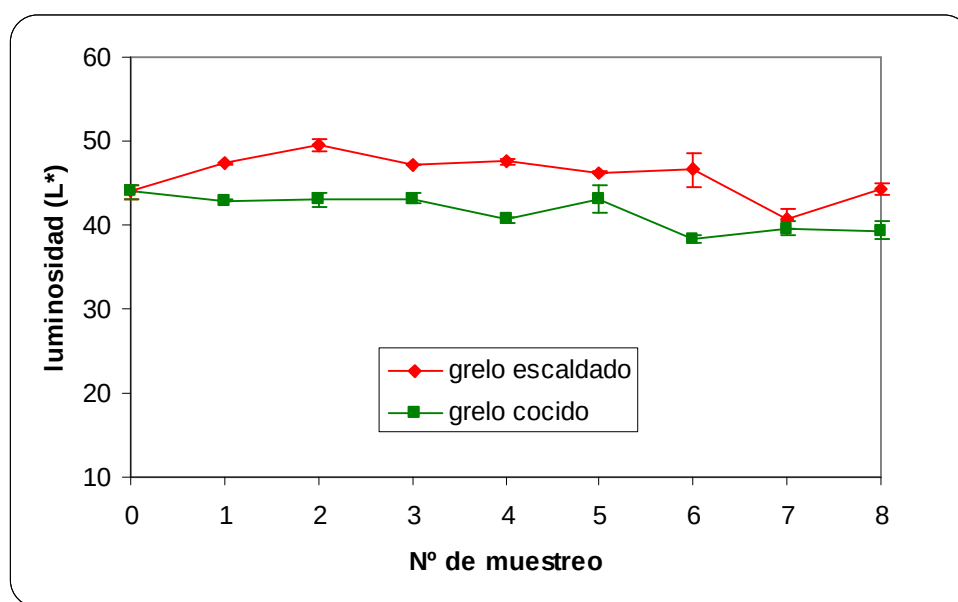


Figura 88. Evolución de L* en grelo escaldado y grelo cocido durante el almacenamiento a temperatura de congelación.

a^*/b^*

La relación a^*/b^* , ha sido utilizada anteriormente para analizar guisantes verdes enlatados, brócoli congelado (Gunawan y Barringer, 2000) y judías verdes enlatadas (Hayakawa y Timbers, 1977) y se ha relacionado con el contenido en clorofilas en estos alimentos (Nisha y col., 2004).

En este trabajo, la relación a^*/b^* presentó un valor de -0.31 ± 0.02 en el grelo fresco, -0.34 ± 0.00 en el grelo tras el escaldado y 0.18 ± 0.01 tras la cocción (Tabla 45). El test t-Student, no señala diferencias estadísticamente significativas entre el grelo fresco y tras el escaldado (Tabla 39), sin embargo, si existen diferencias estadísticamente significativas para el grelo tras la cocción, con respecto al grelo fresco (Tabla 40).

El tratamiento térmico, según Tijskens y col. (2001), puede provocar que existan cambios en el color verde, con un incremento inicial en la coloración, similar a lo que ocurre al aplicar el escaldado en este estudio, seguido de un descenso al continuar la duración del tratamiento térmico, es decir, lo que ocurriría en este caso al aplicar un tratamiento térmico más intenso como la cocción.

A lo largo del período de almacenamiento, en el grelo escaldado no existen diferencias estadísticamente significativas en función del tiempo (Tabla 37), no así en el grelo cocido donde las diferencias son significativas (Tabla 38) y existe una tendencia a incrementar este valor (Figura 89).

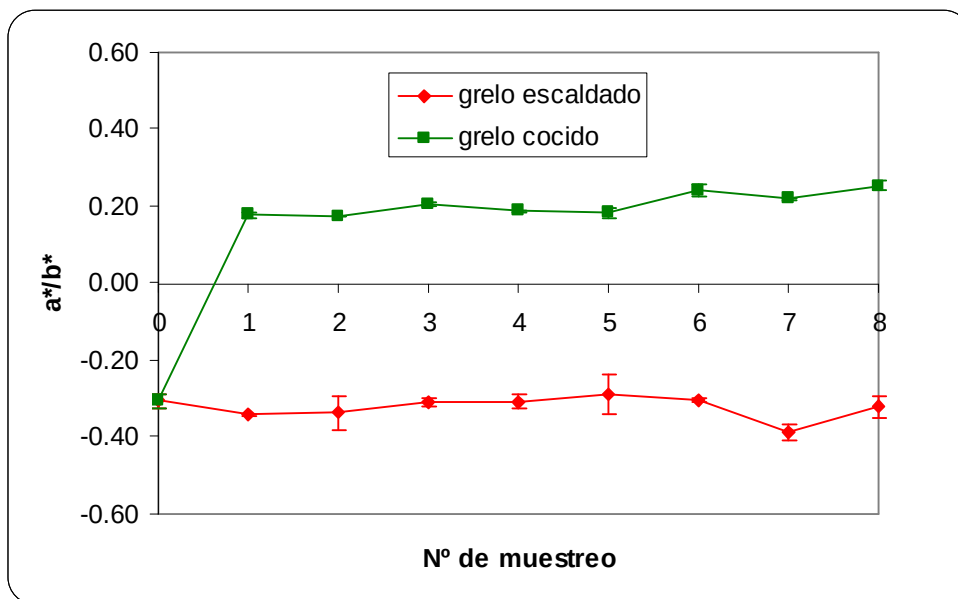


Figura 89. Evolución de a^*/b^* en grelo escaldado y grelo cocido durante el almacenamiento a temperatura de congelación.

Tono (H°)

El tono del grelo fresco presentó un valor de $107.00^\circ \pm 0.95$. Tras el escaldado es de $108.84^\circ \pm 0.11$ y tras la cocción de $79.94^\circ \pm 0.11$ (Tabla 46). El test t-Student señala únicamente diferencias estadísticamente significativas entre el tono del grelo fresco y tras la cocción (Tablas 39 y 40). Visualmente los grelos tras el escaldado tienen un tono verde brillante, muy semejante a los grelos en estado fresco, no así los grelos tras la cocción, que adquieren un tono verde oliva opaco (Figura 90).

Tabla 46. Tono y cromaticidad en grelo escaldado y grelo cocido.

No. muestreo	tono (H°)		cromaticidad (C*)	
	grelo escaldado	grelo cocido	grelo escaldado	grelo cocido
0	107.00 ± 0.95	107.00 ± 0.95	30.91 ± 1.36	30.91 ± 1.36
1	108.84 ± 0.11	79.94 ± 0.11	50.91 ± 1.47	47.39 ± 0.21
2	108.61 ± 2.31	80.12 ± 0.04	54.00 ± 6.06	46.83 ± 1.45
3	107.11 ± 0.50	78.33 ± 0.32	47.92 ± 1.47	41.98 ± 0.19
4	107.07 ± 0.85	79.33 ± 0.12	47.04 ± 0.57	41.20 ± 1.48
5	106.11 ± 2.68	79.69 ± 0.78	48.30 ± 0.19	42.03 ± 0.28
6	106.79 ± 0.28	76.42 ± 0.76	51.42 ± 5.34	34.60 ± 3.46
7	111.06 ± 1.01	77.62 ± 0.16	36.97 ± 0.67	31.53 ± 0.39
8	107.81 ± 1.43	75.79 ± 0.72	51.90 ± 0.01	25.38 ± 0.60

Promedio ± desviación estándar (n=4).

El aumento ligero del color verde en los grelos tras el escaldado puede estar relacionado con la formación de otros derivados de clorofila, como las clorofilidas, las cuales no producen cambios en las propiedades cromóforas y en el color de sus precursoras (Minguez-Mosquera y col.; 2002). Por otro lado, los cambios de color generados en el grelo tras la cocción (de verde brillante a marrón oliva) pueden estar relacionados con la conversión de clorofilas en feofitinas (Rocha y col., 1993; Ihl y col., 1998).

Estos resultados coinciden con los indicados por Turkmen y col. (2006), los cuales analizaron los cambios en el color en brócoli, espinaca, guisantes y judías verdes, entre otros vegetales, expuestos a 3 tratamientos térmicos, encontrando diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre los vegetales frescos y los cocinados.

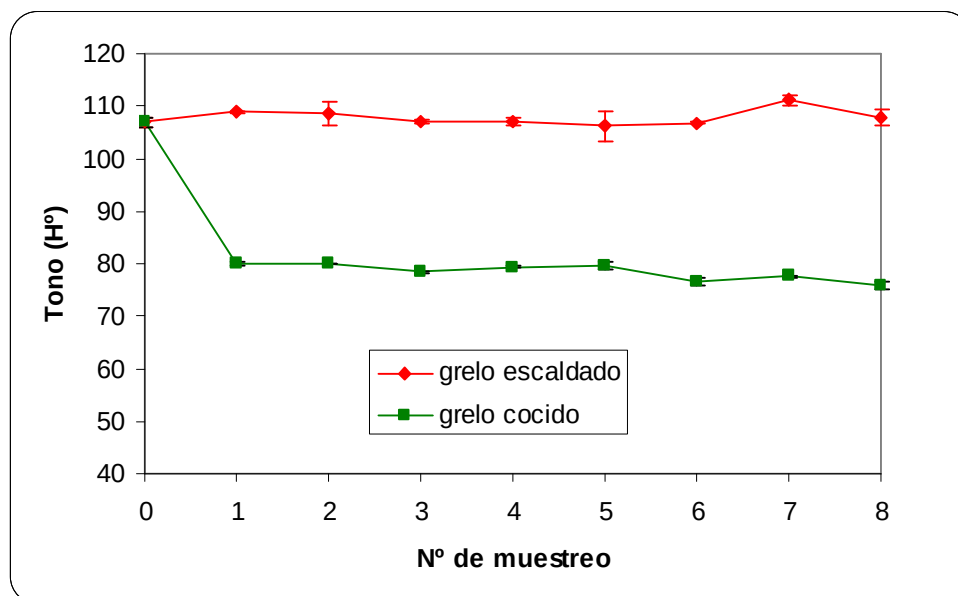


Figura 90. Evolución de H° en grelo escaldado y grelo cocido durante el almacenamiento a temperatura de congelación.

El tono se mantiene prácticamente constante a temperaturas de congelación a lo largo del período de almacenamiento en el grelo escaldado (Tabla 46 y Figura 90), tal y como ocurrió en trabajos anteriores (Mondragón-Portocarrero y col., 2006). En el caso del grelo cocido, sí se producen diferencias significativas a lo largo del tiempo de almacenamiento (Tabla 38) existiendo una ligera tendencia a la disminución (Figura 90).

Cromaticidad (C*)

La cromaticidad o croma indica el grado de saturación o la intensidad de matiz (McGuire, 1992). En el caso del grelo fresco, se obtiene un valor de 30.91 ± 1.36 , tras el escaldado de 50.91 ± 1.47 y tras la aplicación de la cocción de 47.39 ± 0.21 . Se observa un claro aumento de la cromaticidad tras la aplicación de ambos tratamiento térmicos, lo cual se comprueba con el test t-Student, ya que se encuentran diferencias estadísticamente significativas entre el valor de C* del grelo fresco y del grelo escaldado (Tabla 39) y entre el valor de C* del grelo fresco y del grelo cocido (Tabla 40).

Existen diferencias estadísticamente significativas (Tablas 37 y 38) para ambos tipos de muestra a lo largo del período de almacenamiento en congelación. En el grelo cocido, la cromaticidad disminuye a medida que transcurre el tiempo de almacenamiento (Tabla 46 y Figura 91).

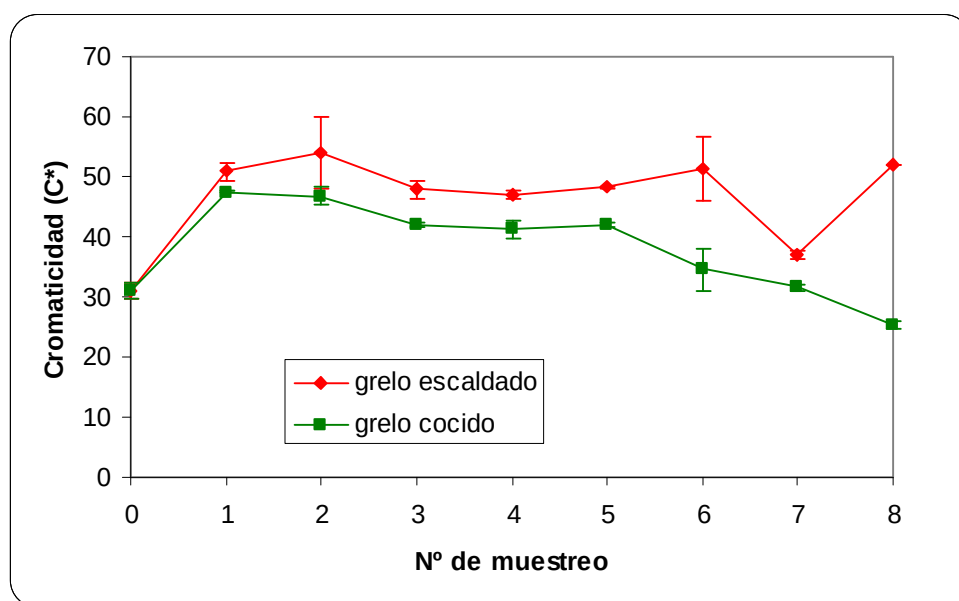


Figura 91. Evolución de C* en grelo escaldado y grelo cocido durante el almacenamiento a temperatura de congelación.

De este análisis del color, se concluye que los parámetros H^0 y a^*/b^* son los indicadores más adecuados para determinar los cambios de color ocurridos tras el procesamiento térmico, y el almacenamiento posterior, en los grelos escaldados y cocidos.

4.4.2.8. Pigmentos

El color de los vegetales verdes, está principalmente determinado por las clorofilas presentes en el material vegetal (Boekel, 1999; Tijskens y col., 2001) y por la proporción en que éstas se encuentran presentes (Lisiewska y col., 2006). En las plantas verdes las clorofilas están acompañadas por los carotenoides, lo cual afecta al color del material

fresco y de los productos obtenidos del mismo y además aumenta su contenido vitamínico por la presencia del β -caroteno (Bhaskarachary y col., 1995; Agte y col., 2000).

Los vegetales de hoja verde son la fuente más accesible de carotenoides, durante todo el año (Heinonen y col. 1989; Kopsell y col., 2004; Chandrika y col., 2006). A diferencia de las frutas, en las cuales la composición de carotenoides varía cuantitativa y cualitativamente, en los vegetales de hoja se sabe que existe un patrón cualitativo constante de carotenoides, siendo los principales, luteína, β -caroteno, violaxantina y neoxantina (Rodríguez-Amaya, 1999; Kimura y Rodríguez-Amaya, 2002). β -caroteno es el principal carotenoide pro-vitamina A presente en los vegetales de hoja verde al cual se le asigna una equivalencia de actividad de vitamina A (Simpson y Tsou, 1986), por tanto, una adecuada contribución a la ración dietética recomendada (RDA) de la vitamina A puede ser obtenida por el consumo de vegetales de hoja verde (Chandrika y col., 2006).

De forma paralela a la vitamina C y a los polifenoles, los carotenoides también se clasifican entre los constituyentes básicos del efecto antioxidante (Duthie y col., 1993; Pulido y col., 2000; Kidmose y col., 2001; Liu, 2003; Saura-Calixto y Goñi, 2006) y, junto con la luteína y las clorofilas se encuadran dentro del grupo de compuestos que tienen actividad antimutagénica (Krinsky, 2001; Krinsky y col., 2003; Mizda y col., 2002).

En el caso del grelo fresco, los pigmentos identificados fueron luteína, β -caroteno, clorofila a y clorofila b, siendo los mayoritarios la luteína y la clorofila a. Cabe señalar que también se encontraron otros picos cromatográficos que no fueron identificados ya que sus áreas eran muy pequeñas.

Luteína

El contenido en luteína del grelo fresco fue de 11.29 ± 0.28 mg/100 g. Este valor disminuye ligeramente tras el proceso de escaldado (10.90 ± 0.14 mg/100 g) y aumenta también ligeramente tras la cocción (15.06 ± 0.14 mg/100 g) (Tabla 47). A pesar de estas

variaciones, el test t-Student no señala diferencias estadísticamente significativas para ninguno de los tratamientos térmicos aplicados (Tablas 39 y 40).

Tabla 47. Luteína y β -caroteno en grelo escaldado y grelo cocido.

N° muestreo	luteína ^a		β -caroteno ^a	
	grelo escaldado	grelo cocido	grelo escaldado	grelo cocido
0	11.29 $\pm$ 0.28	11.29 $\pm$ 0.28	8.66 $\pm$ 1.16	8.66 $\pm$ 1.16
1	10.90 $\pm$ 0.14	15.06 $\pm$ 0.14	9.77 $\pm$ 1.17	14.26 $\pm$ 1.07
2	11.77 $\pm$ 1.11	12.43 $\pm$ 0.74	9.70 $\pm$ 0.51	12.42 $\pm$ 1.10
3	10.71 $\pm$ 0.11	12.71 $\pm$ 0.01	9.44 $\pm$ 0.59	11.20 $\pm$ 0.16
4	11.38 $\pm$ 0.24	13.91 $\pm$ 0.11	8.94 $\pm$ 0.87	13.14 $\pm$ 0.48
5	13.35 $\pm$ 0.51	12.12 $\pm$ 0.41	10.76 $\pm$ 0.09	13.66 $\pm$ 0.43
6	13.72 $\pm$ 0.01	13.15 $\pm$ 2.28	11.22 $\pm$ 0.49	15.39 $\pm$ 0.29
7	10.11 $\pm$ 1.46	9.18 $\pm$ 0.42	7.56 $\pm$ 0.64	8.84 $\pm$ 0.05
8	12.77 $\pm$ 1.01	7.34 $\pm$ 0.06	10.28 $\pm$ 0.37	6.41 $\pm$ 0.06

Promedio $\pm$ desviación estándar (n=4); ^a mg/100 g de materia fresca.

Sin embargo, en el transcurso del período de almacenamiento en congelación, si existen diferencias estadísticamente significativas para los dos tipos de muestras (Tablas 37 y 38). En el grelo escaldado, la tendencia es a ir aumentando el contenido en luteína, tendencia contraria a la que presenta el grelo cocido (Figura 92).

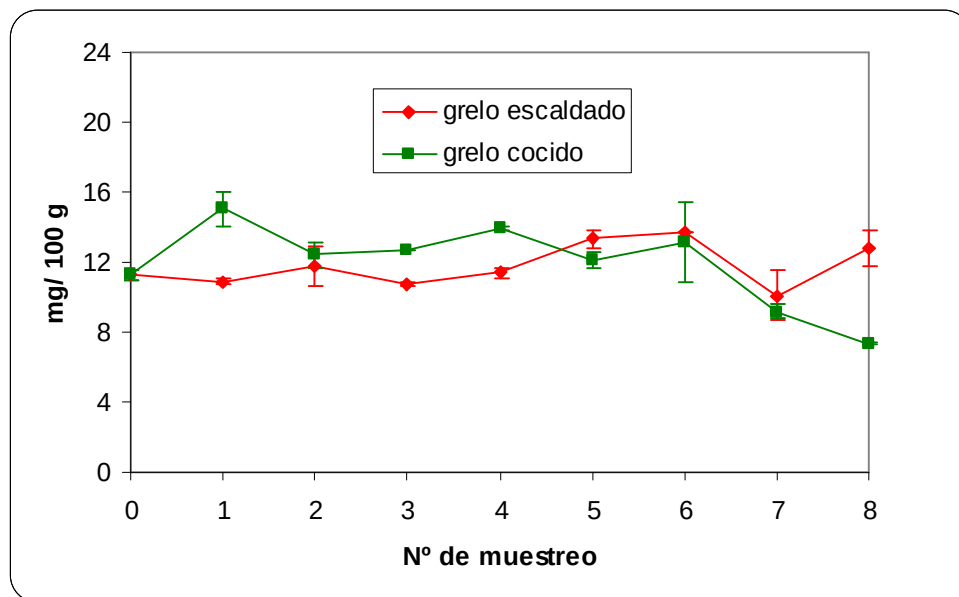


Figura 92. Evolución de la luteína en grelo escaldado y grelo cocido durante el almacenamiento a temperatura de congelación.

β -caroteno

El contenido en β -caroteno del grelo fresco fue de 8.66 ± 1.16 mg/100 g. Este valor aumenta ligeramente tras el proceso de escaldado, 9.77 ± 1.17 y visiblemente, tras la cocción, 14.26 ± 1.07 mg/100 g (Tabla 47). Al aplicar el test t-Student se comprueba que únicamente son significativas las diferencias producidas en el contenido en β -caroteno tras la cocción (Tablas 39 y 40).

Estos resultados se corresponden con los encontrados por varios investigadores (Dietz y col., 1988; Lisiewska y col., 2004; Kidmose y col., 2005), los cuales señalan que los tratamientos térmicos incrementan la extractibilidad química de α - y β -caroteno en algunos vegetales.

Generalmente, al comparar los valores de retención de los pigmentos, antes y después de un tratamiento, se encuentra que, como en este caso, exceden el 100 % tras el tratamiento. Tal paradoja ha sido frecuentemente reportada en vegetales y frutas

escaldadas y cocidas. Y ello se atribuye a la mayor extractibilidad de los pigmentos tras la exposición al calor. Se cree que el calentamiento dispara la ruptura de la pared celular facilitando la liberación de los pigmentos (Schoefs, 2002). Además, los carotenoides son compuestos estables frente a tratamientos térmicos, tal y como indican Lin y Chen (2005), siendo un posible factor de la estabilidad térmica de estos compuestos el hecho de estar disueltos en compuestos lipídicos que los protegen de la acción del calor (Camacho y col., 2004).

En cuanto a los carotenoides provitamina A, en este estudio solo se determinó el contenido de β -caroteno debido a que fue el que se encontraba en mayor concentración en el grelo (Mataix y col., 2003). Se ha tomado como base el factor de conversión adoptado por el Instituto de Medicina (IOM, 2001), el cual asume que una sexta parte del contenido de carotenoides totales es absorbido dentro de la mucosa y que la mitad del β -caroteno absorbido es convertido a retinol. En base a este criterio se determinó la actividad de la vitamina A en las muestras y se obtuvo un valor de 1433 $\mu\text{g eq. de retinol/100 g}$ en el grelo fresco. Tras el escaldado se incrementó a 1628 $\mu\text{g eq. de retinol/100 g}$ y tras la cocción el incremento fue superior (2376 $\mu\text{g eq. de retinol/100 g}$). Los valores obtenidos en el grelo fresco son comparables a los indicados en diferentes referencias bibliográficas, (Mataix y col., 2003; <http://www.sehlehla.org/busalimento.aspx>, 30/10/2005; <http://perso.wanadoo.es/conservaslou/p44.html>, 06/01/2006), pudiéndose clasificar al grelo como uno de los vegetales ricos en contenido de vitamina A (Mataix y Aranceta, 2002; Mataix y col., 2003).

Durante el almacenamiento en congelación, existen diferencias estadísticamente significativas a lo largo del tiempo (Tablas 37 y 38). En el grelo escaldado se observa un comportamiento estable hasta el 4º muestreo, a partir del cual se inicia una tendencia ascendente, resultado similar al indicado por Lisiewska y col. (2004).

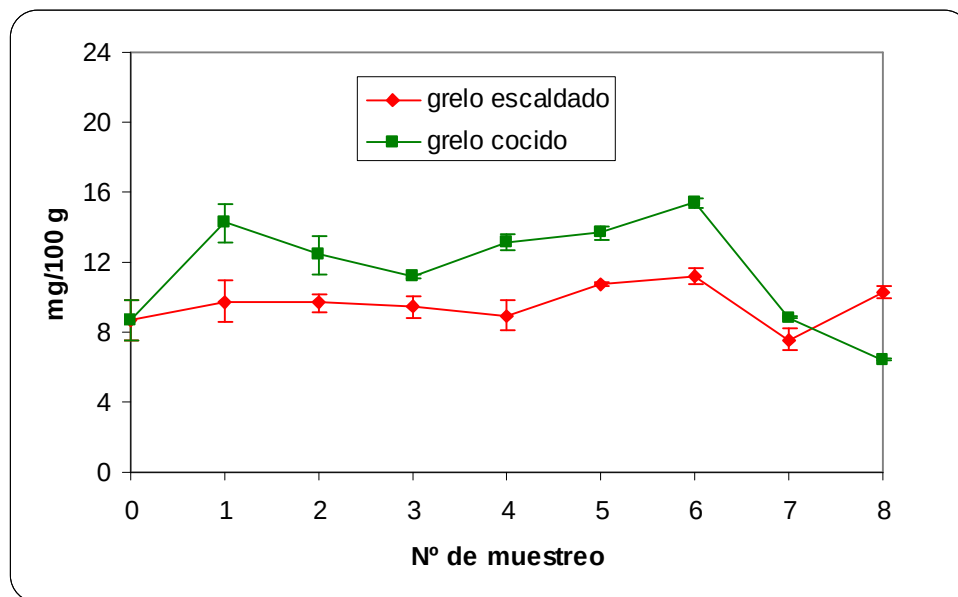


Figura 93. Evolución del β -caroteno en grelo escaldado y grelo cocido durante el almacenamiento a temperatura de congelación.

Clorofila a y clorofila b

El contenido en clorofila a en el grelo fresco fue de 60.19 ± 1.74 mg/100 g, en el grelo tras el escaldado de 46.58 ± 0.03 mg/100 g y en el grelo tras la cocción de 6.49 ± 0.40 mg/100 g (Tabla 48). Existen diferencias estadísticamente significativas para ambas muestras tras los tratamientos térmicos (Tablas 39 y 40).

Con respecto a la clorofila b, se obtuvieron valores en el grelo fresco de 20.54 ± 0.10 mg/100 g, en el grelo tras el escaldado de 18.50 ± 0.08 mg/100 g y en el grelo tras la cocción de 9.65 ± 0.27 mg/100 g (Tabla 48). Al aplicar el test t-Student se comprueba que existen diferencias significativas entre el valor inicial y los obtenidos tras aplicar ambos tratamientos térmicos, para ambas muestras. Kidmose y col. (2005) señalan que el escaldado a vapor afecta significativamente el contenido de clorofila a puesto que hay una disminución proporcional al tiempo de escaldado.

Los valores de clorofila a y clorofila b encontrados en el grelo fresco, coinciden con los señalados por Krumbein y col. (2005), determinados en varios cultivares de brassicas (*B. juncea*, *B. rapa* subsp. *nipposinica* var. *chinoleifera*, *B. rapa* subsp. *chinensis* y *B. rapa* subsp. *rapa*).

El “grado de verdor” de los vegetales verdes atribuido a las clorofilas, es importante para determinar la calidad final de este tipo de vegetales (Nisha y col., 2004) ya que el color es uno de los principales indicadores de calidad en los productos vegetales (Teng y Chen, 1999; Tan y col., 2000; Tijkskens y col., 2001). Las clorofilas son fácilmente degradadas durante el procesamiento de los vegetales (Boekel, 1999), ya que son susceptibles de sufrir cambios químicos y físicos durante dicho procesamiento (Teng y Chen, 1999; Rehman y col., 2003; Zhang y Hamauzu, 2004). Así, los vegetales verdes procesados térmicamente muestran variaciones en el color respecto a los vegetales frescos. Los cambios de color en estos productos se deben a la conversión de clorofilas en feofitinas a través de la sustitución del magnesio de la clorofila por el hidrógeno (Canjura y col., 1991; Heaton y Marangoni, 1996; Lau y col., 2000; Ahmed y col., 2002). Los compuestos de clorofila desempeñan ciertas funciones biológicas que son efectivas mientras la clorofila conserve la estructura del anillo de porfirina básica, de esta forma la presencia de las clorofilas y sus productos de transformación contribuyen a dar un valor añadido a los productos vegetales (Minguez-Mosqueda y col., 2002). Recientemente, se ha demostrado que la clorofila y sus derivados presentan una relación importante con la salud promoviendo funciones tales como actividades antimutagénicas y anticarcinogénicas (Yoshikawa y col., 1996; Negishi y col., 1997; Chernomorsky y col., 1999; Higashi-Okai y col., 1999; Ma y Dolphin, 1999; Morita y col., 2001).

En este estudio, se observó que existe mayor cantidad de clorofila a, que de clorofila b en el grelo fresco, ya que la relación que se mantiene entre ellas es de 3:1, aproximadamente; resultados coincidentes con lo indicado por diferentes autores en vegetales verdes (Khachik y col., 1986; Belitz y Grosch, 1997; Lisiewska y col., 2004).

Las pérdidas por escaldado fueron del 23.7 % para la clorofila a y del 9.9 % para la clorofila b, en cambio, con la cocción, las pérdidas fueron del 89.2 % para la clorofila a y del 53.0 % para la clorofila b. Es evidente que la cocción es el tratamiento que más pérdidas produjo a nivel de clorofilas y que es la clorofila a la más sensible, debido a su mayor labilidad, lo cual aumenta su susceptibilidad a transformarse en su respectiva feofitina, durante el calentamiento, como ya ha sido señalado anteriormente (López-Ayerra y col., 1998; Teng y Chen (1999); Tan y col., 2000; Tenorio y col., 2004; Turkmen y col., 2006).

Tabla 48. Clorofila a y clorofila b en grelo escaldado y grelo cocido.

Nº muestreo	clorofila a ^a		clorofila b ^a	
	grelo escaldado	grelo cocido	grelo escaldado	grelo cocido
0	60.19 ± 1.74	60.19 ± 1.74	20.54 ± 0.10	20.54 ± 0.10
1	46.58 ± 0.03	6.49 ± 0.40	18.50 ± 0.08	9.65 ± 0.27
2	53.37 ± 0.72	6.00 ± 0.73	22.97 ± 0.83	8.40 ± 0.28
3	48.20 ± 1.39	5.24 ± 0.31	19.84 ± 0.40	7.84 ± 0.08
4	46.61 ± 1.51	5.98 ± 0.28	20.12 ± 0.25	9.93 ± 0.27
5	53.12 ± 1.93	5.48 ± 0.11	21.28 ± 0.56	6.86 ± 0.44
6	55.00 ± 0.19	5.66 ± 0.33	25.33 ± 0.75	8.45 ± 0.10
7	39.36 ± 1.62	4.43 ± 0.16	17.98 ± 0.66	5.82 ± 0.28
8	50.23 ± 1.54	3.57 ± 0.01	27.46 ± 0.40	4.13 ± 0.01

Promedio ± desviación estándar (n=4); ^a mg/100 g de materia fresca

Para ambos tipos de muestras (grelo cocido y grelo escaldado), durante el almacenamiento en congelación, existen diferencias estadísticamente significativas en el contenido en clorofila a y en clorofila b (Tablas 37 y 38). En el caso del grelo cocido, las clorofilas a y b van disminuyendo de forma progresiva, aunque ligera, y en el caso del grelo escaldado existen fluctuaciones de ambas clorofilas con respecto al valor inicial. Lisiewska y col. (2004) indican que el almacenamiento a temperatura de congelación en

vegetales escaldados, presenta un efecto beneficioso ya que se mantiene el contenido de ambas clorofilas (Figuras 94 y 95).

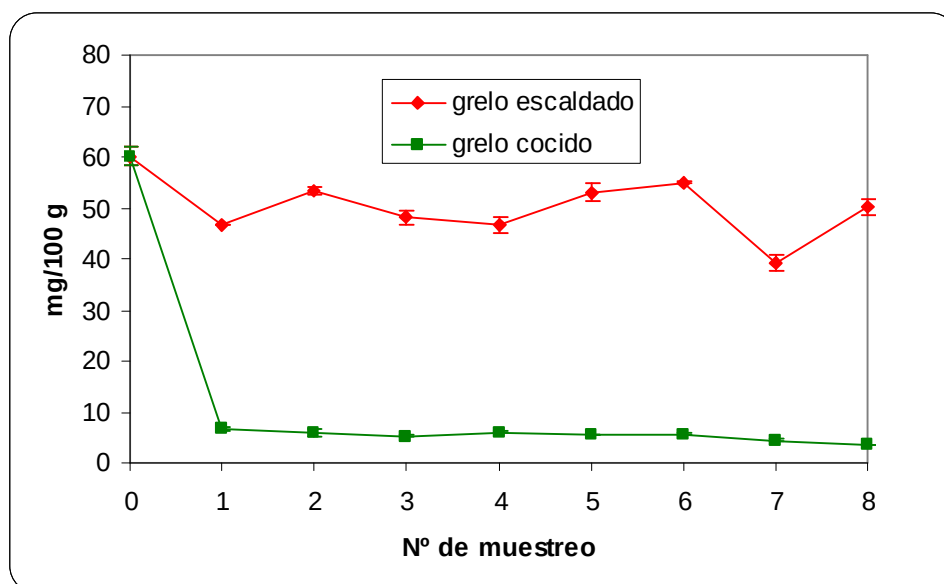


Figura 94. Evolución de la clorofila a en grelo escaldado y grelo cocido durante el almacenamiento a temperatura de congelación.

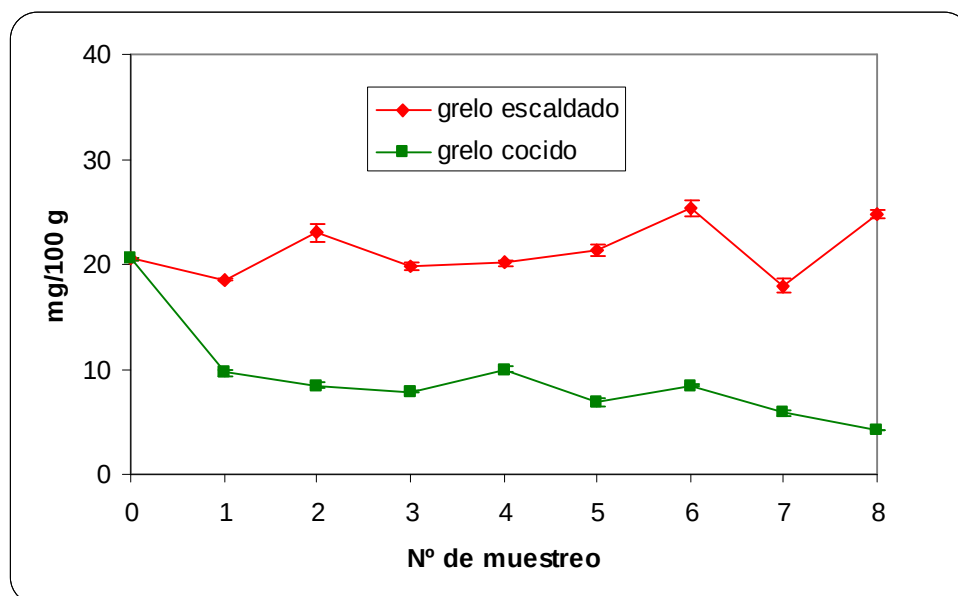


Figura 95. Evolución de la clorofila b en grelo escaldado y grelo cocido durante el almacenamiento a temperatura de congelación.

Feofitina a y feofitina b

El grelo en estado fresco contiene 1.81 ± 0.73 mg de feofitina a /100 g. Este valor se incrementa tras el escaldado hasta 4.26 ± 0.34 mg/100 g, aunque el incremento mas notable se da tras la cocción, hasta 33.40 ± 0.99 mg/ 100 g (Tabla 49). De hecho, al aplicar el test t-Student, sólo existen diferencias estadísticamente significativas entre el grelo cocido respecto al fresco (Tablas 39 y 40).

En cuanto a la feofitina b, el grelo en estado fresco contiene 0.39 ± 0.03 mg/100 g, este valor se incrementa tras el escaldado hasta 1.00 ± 0.21 mg/100 g, aunque el incremento mas notable, al igual que con la feofitina a, se da tras la cocción, hasta 7.84 ± 0.61 mg/ 100 g. (Tabla 49). Este comportamiento es semejante desde el punto de vista estadístico al de la feofitina a, ya que solo hay diferencias significativas entre el grelo cocido y el fresco (Tablas 39 y 40).

Tabla 49. Feofitina a y feofitina b en grelo escaldado y grelo cocido.

Nº muestreo	feofitina a ^a		feofitina b ^a	
	grelo escaldado	grelo cocido	grelo escaldado	grelo cocido
0	1.81 ± 0.73	1.81 ± 0.73	0.39 ± 0.03	0.39 ± 0.03
1	4.26 ± 0.34	33.40 ± 0.99	1.00 ± 0.21	7.84 ± 0.61
2	4.64 ± 0.08	31.23 ± 1.45	1.49 ± 0.05	7.05 ± 0.47
3	3.58 ± 0.06	29.18 ± 0.38	1.15 ± 0.05	8.06 ± 0.12
4	4.85 ± 0.31	36.01 ± 0.62	1.29 ± 0.06	9.72 ± 0.34
5	5.92 ± 0.18	34.64 ± 0.26	2.01 ± 0.10	7.19 ± 0.06
6	5.64 ± 0.20	34.44 ± 0.19	1.97 ± 0.26	7.52 ± 0.13
7	4.20 ± 0.47	25.38 ± 0.02	1.10 ± 0.06	4.84 ± 0.01
8	5.91 ± 0.20	19.10 ± 0.03	1.70 ± 0.04	3.13 ± 0.00

Promedio ± desviación estándar (n=4); ^a mg/100 g de materia fresca.

El incremento en el contenido de feofitinas a y b, tras la aplicación de los tratamientos térmicos en grelo, son lógicos debido a la formación de estos compuestos por efecto de la degradación de las clorofilas en presencia de calor, siendo más notable en el grelo cocido, a causa de la duración del tratamiento.

La reducción en los contenidos iniciales de clorofila a y clorofila b, analizados anteriormente, se deben a la degradación de ambas clorofilas en sus feofitinas respectivas, feofitina a y feofitina b (Schwartz y Elbe, 1983; Mangos y Berger, 1997; Boekel, 1999). En el grelo sometido a cocción, las cantidades de feofitina a fueron más elevadas que las de la feofitina b, con respecto al grelo sometido a escaldado, y esto tiene relación con el grado de tratamiento térmico aplicado, lo que se corresponde con los cambios producidos en el color desde un verde brillante inicial a un verde oliva opaco. Kidmose y Hansen (1999) señalaron que existe una buena correlación entre el color y el contenido de clorofilas en brócoli cocinado y almacenado, lo cual está en concordancia con los resultados obtenidos en el presente trabajo. Teng y Chen (1999) y De La Cruz-García y col. (1997) han encontrado la máxima concentración de feofitina en espinacas y judías verdes tras la cocción.

El contenido de feofitina a fue mayor que el de feofitina b, tanto en las muestras escaldadas, como en las cocidas, lo cual está de acuerdo con resultados previamente citados (Schwartz y Elbe, 1983; Khachick y col., 1986; Schwartz y Lorenzo, 1991; López-Ayerra y col., 1998).

Aún cuando a lo largo del almacenamiento en congelación, existen diferencias estadísticamente significativas para ambos tipos de muestras, existen menos fluctuaciones en el contenido en feofitina a y b en el grelo escaldado (Figura 96 y 97).

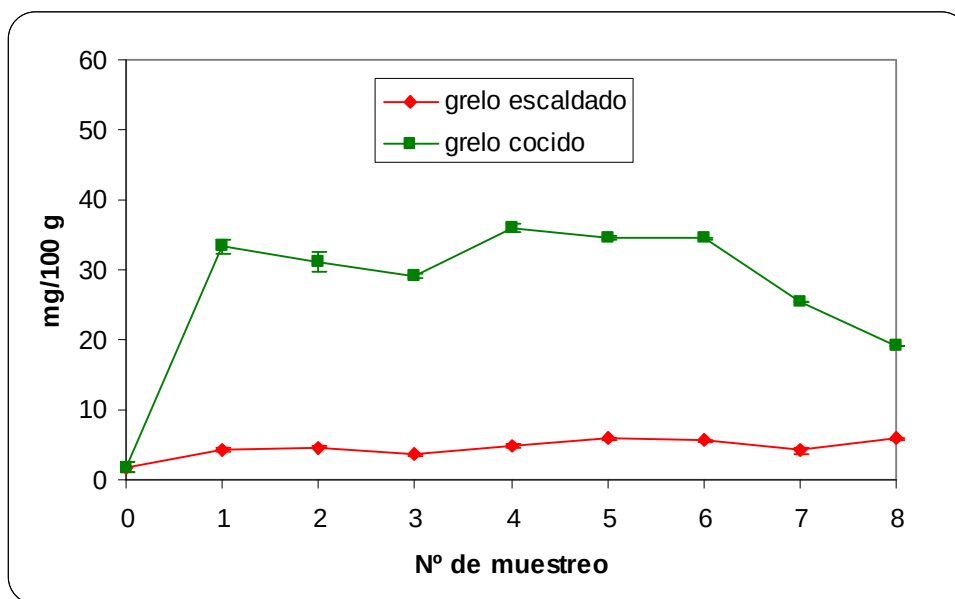


Figura 96. Evolución de la feofitina a en grelo escaldado y grelo cocido durante el almacenamiento a temperatura de congelación.

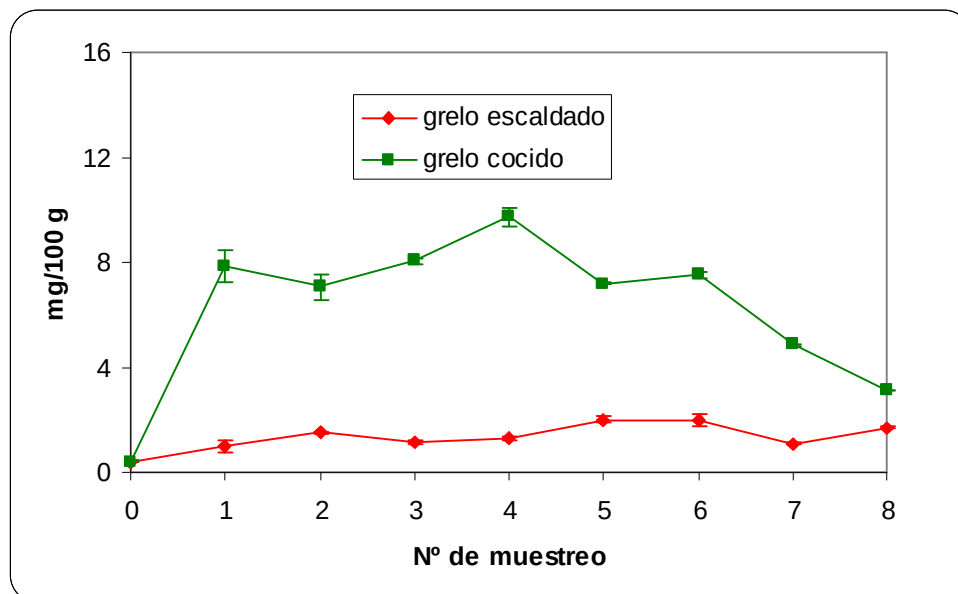


Figura 97. Evolución de la feofitina b en grelo escaldado y grelo cocido durante el almacenamiento a temperatura de congelación.

Las concentraciones de β -caroteno y luteína se analizaron mediante la correlación de Pearson, obteniendo un $r=0.883$ ($p=0.002$). Asimismo, las concentraciones de clorofila a y clorofila b, se correlacionaron altamente entre sí ($r=0.961$, $p=0.000$), lo cual sugiere que sus niveles pueden aumentarse simultáneamente, datos coincidentes con Mou (2005).

Las altas correlaciones obtenidas entre los parámetros de color (H^0 y a^*/b^*) y las concentraciones de clorofila a ($r=0.967$, $p=0.000$; $r=-0.966$, $p=0.000$); clorofila b ($r=0.950$, $p=0.000$; $r=-0.949$, $p=0.000$); feofitina a ($r=-0.945$, $p=0.000$; $r=0.944$, $p=0.000$) y feofitina b ($r=-0.883$, $p=0.000$; $r=0.882$, $p=0.000$) confirman que el contenido de clorofilas puede ser determinado indirectamente a través de la medición del color (Kidmose y Hansen, 1999).

4.4.2.9. Cenizas

El contenido en cenizas del grelo fresco fue de 1.26 ± 0.02 %. Este valor disminuyó considerablemente tras el proceso de escaldado, 0.79 ± 0.01 y tras la cocción, 0.59 ± 0.01 (Tabla 50), encontrando estos descensos estadísticamente significativos tras la aplicación del test t-Student (Tablas 39 y 40). La disminución ocurrida tras el tratamiento térmico de cocción es debida al método empleado (ebullición en agua). Por otro lado, la disminución ocurrida en el caso del grelo escaldado probablemente se debe, no al propio sistema de escaldado, sino al método de enfriado con agua (apartado 4.2) (Odland y Eheart, 1975). Se observan diferencias con lo ocurrido en los primeros ensayos (Mondragón-Portocarrero y col., 2006) debido a que el sistema de enfriamiento utilizado en el laboratorio era mediante hielo, lo cual no provocó pérdidas significativas.

Durante el almacenamiento en congelación, existen ligeras fluctuaciones estadísticamente significativas a lo largo del tiempo en ambos tipos de muestra. Autores como Canet-Parreño (2000) indican que no existen diferencias en los productos vegetales congelados a lo largo del almacenamiento.

Tabla 50. Cenizas y proteína en grelo escaldado y grelo cocido.

Nº muestreo	cenizas ^a		proteína ^a	
	grello escaldado	grello cocido	grello escaldado	grello cocido
0	1.26 ± 0.02	1.26 ± 0.02	2.79 ± 0.00	2.79 ± 0.00
1	0.79 ± 0.01	0.59 ± 0.01	2.41 ± 0.00	2.85 ± 0.00
2	0.71 ± 0.01	0.35 ± 0.03	2.50 ± 0.00	2.81 ± 0.00
3	0.67 ± 0.06	0.29 ± 0.03	2.34 ± 0.00	2.84 ± 0.00
4	0.72 ± 0.03	0.44 ± 0.04	2.36 ± 0.00	2.69 ± 0.00
5	0.92 ± 0.00	0.51 ± 0.02	2.52 ± 0.00	2.89 ± 0.00
6	0.92 ± 0.01	0.49 ± 0.01	2.75 ± 0.00	2.75 ± 0.00
7	0.76 ± 0.00	0.38 ± 0.00	2.82 ± 0.00	2.56 ± 0.00
8	0.93 ± 0.01	0.50 ± 0.00	2.78 ± 0.00	2.84 ± 0.00

Promedio $\pm$ desviación estándar (n=2); ^a %.

4.4.2.10. Proteína

El contenido en proteína del grelo fresco fue de 2.79 ± 0.00 %. Este valor disminuyó ligeramente tras el proceso de escaldado, 2.41 ± 0.00 y se mantuvo tras la cocción, 2.85 ± 0.00 (Tabla 50).

Los vegetales de hojas verdes con tejidos jóvenes que contienen gran cantidad de sustancias solubles (setas, maíz, guisantes, judías verdes) son los más afectados en su valor nutricional. Las operaciones de corte incrementan la pérdida de sustancias solubles. Asimismo, el daño mecánico en los vegetales que se produce durante la cosecha, afecta a la pérdida de compuestos nitrogenados (Cano, 1996).

Durante el almacenamiento en congelación, existen ligeras fluctuaciones estadísticamente significativas en el contenido en proteína para ambos tipos de muestra.

4.4.2.11. Fenoles totales

Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios en las plantas, los cuales están relacionados con el sabor y el color de las frutas y vegetales, y presentan interés debido a que se han relacionado con el hecho de que son protectores de la salud (Granado y col., 1996; Lopaczynski y Zeisel, 2001; Hunter y Fletcher, 2002; Andlauer y col., 2003; Cheung y col., 2003; Manach y col., 2004, Nilsson y col., 2004).

En este estudio, el contenido de fenoles totales disminuyó desde un valor inicial de 0.13 ± 0.00 g de ácido tánico/100 g para grelo fresco, a valores de 0.09 ± 0.00 g de ácido tánico/100 g para la muestra tras el escaldado y de 0.06 ± 0.00 g de ácido tánico/100 g para la muestra tras la cocción (Tabla 51). El test t-Student señala que las diferencias provocadas por los tratamientos térmicos son estadísticamente significativas (Tablas 39 y 40). Las pérdidas fueron del 30.76 % en el grelo escaldado y del 53.84% en el grelo cocido.

Tabla 51. Fenoles totales y actividad reductora en grelo escaldado y grelo cocido.

Nº muestreo	fenoles totales ^a		actividad reductora ^b	
	grelo escaldado	grelo cocido	grelo escaldado	grelo cocido
0	0.13 ± 0.00	0.13 ± 0.00	0.57 ± 0.02	0.57 ± 0.02
1	0.09 ± 0.00	0.06 ± 0.00	0.43 ± 0.01	0.20 ± 0.01
2	0.10 ± 0.00	0.05 ± 0.00	0.41 ± 0.03	0.16 ± 0.00
3	0.08 ± 0.00	0.05 ± 0.00	0.46 ± 0.03	0.15 ± 0.00
4	0.07 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.46 ± 0.04	0.22 ± 0.03
5	0.08 ± 0.00	0.04 ± 0.01	0.46 ± 0.02	0.19 ± 0.02
6	0.09 ± 0.01	0.05 ± 0.00	0.35 ± 0.01	0.13 ± 0.00
7	0.11 ± 0.00	0.05 ± 0.01	0.46 ± 0.00	0.25 ± 0.02
8	0.09 ± 0.01	0.05 ± 0.00	0.31 ± 0.02	0.11 ± 0.01

Promedio ± desviación estándar (n=2); ^a g de ácido tánico/100 g de materia fresca; ^b absorbancia (nm).

Ninfali y Bacchiocca (2003) realizaron un estudio en hortalizas (acelgas y espinacas entre otras), frescas y congeladas, observando igualmente que después de ser escaldadas, el contenido de fenoles era mayor en las muestras frescas que en las congeladas. Resultados coincidentes con los indicados por Yadav y Sehgal (2003), Ismail y col. (2004), Sahlin y col. (2004) y Turkmen y col. (2005), tras el escaldado de vegetales.

A lo largo del almacenamiento en estado congelado, la tendencia es que el contenido de fenoles totales, tanto en el grelo cocido como en el escaldado, disminuya (Figura 98), siendo las diferencias encontradas estadísticamente significativas (Tablas 37 y 38).

Estos resultados coinciden con los indicados por Puupponen-Pimiä y col. (2003) al analizar el contenido de fenoles totales en varias hortalizas (algunas del género *Brassica*), escaldadas y almacenadas en estado congelado, detectaron pérdidas significativas (entre 20-30%) en el contenido de fenoles totales. encontrados en el presente trabajo.

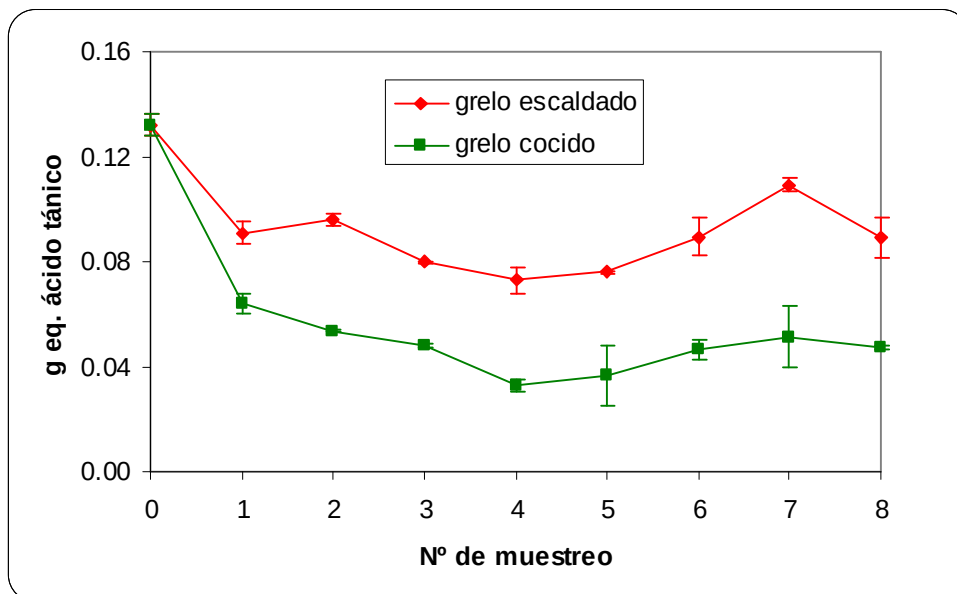


Figura 98. Evolución de fenoles totales en grelo escaldado y grelo cocido durante el almacenamiento a temperatura de congelación.

4.4.2.12. Actividad reductora

La actividad reductora se expresa como absorbancia, donde una mayor absorbancia indica una mayor actividad reductora. Los valores de dicha actividad disminuyeron desde un valor inicial de 0.57 ± 0.02 en grelo fresco a valores de 0.43 ± 0.01 tras el escaldado y 0.20 ± 0.01 tras la cocción (Tabla 51). La aplicación del test t-Student indica que ambos tratamientos térmicos (cocción y escaldado) provocan una disminución estadísticamente significativa en la actividad reductora (Tablas 39 y 40).

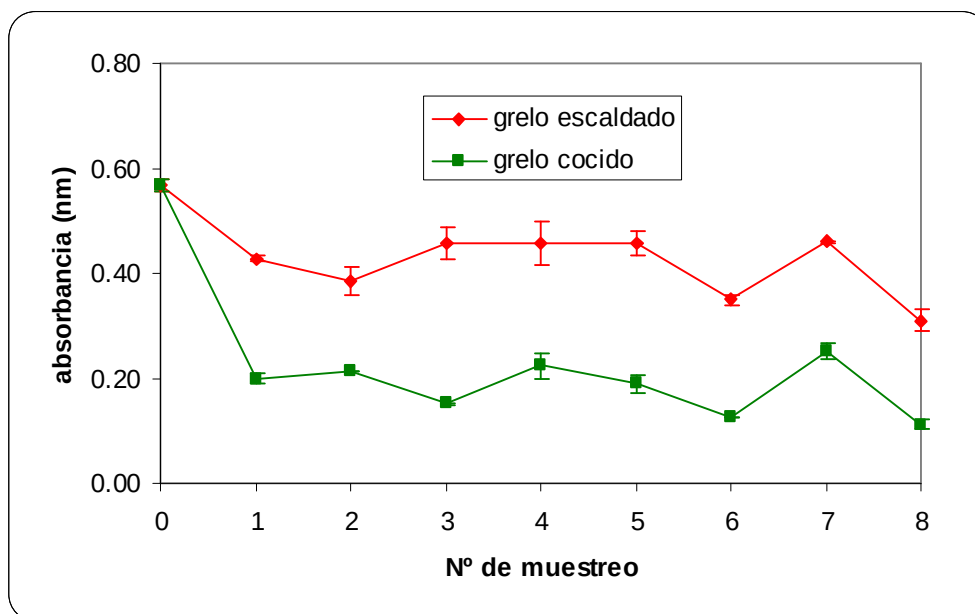


Figura 99. Evolución de la actividad reductora en grelo escaldado y grelo cocido durante el almacenamiento a temperatura de congelación.

Oboh (2005) estudió el efecto del escaldado sobre la actividad reductora de algunas plantas tropicales de hoja verde, y encontró que tras el escaldado se producía una disminución de dicha actividad.

Durante el almacenamiento en congelación, los valores de actividad reductora en las muestras escaldadas y cocidas presentan oscilaciones significativas (Tablas 37 y 38), existiendo una tendencia a la disminución (Figura 99) (García, 2006).

El análisis de la actividad reductora podría ser útil y un índice simple para evaluar a gran escala la potencia antioxidante de productos naturales (Nam y col., 2006).

4.4.3. Determinaciones microbiológicas

El procesamiento de los vegetales por congelación no es causa de problemas microbiológicos y sanitarios de gran importancia (Cano, 1996). El escaldado es la etapa más importante previa a la congelación de los vegetales y destruye la mayoría de los microorganismos presentes en estos vegetales, con excepción de las formas esporuladas

de algunas especies bacterianas, como las pertenecientes al género *Clostridium*. En consecuencia, el escaldado, al eliminar la mayor parte de la flora presente en los vegetales, favorece el desarrollo de las cepas más termoresistentes. En este sentido, el escaldado por agua representa un mayor riesgo microbiológico que el escaldado por vapor, debido principalmente a la dificultad encontrada en la limpieza de algunas partes del equipo de escaldado por agua.

Una vez que este tratamiento térmico provoca la muerte celular, el tejido vegetal puede ser fácilmente recontaminado, debido a la elevada sensibilidad provocada por la pérdida de su estructura tisular. En consecuencia, una vez escaldado el producto, éste debe ser enfriado de la manera más rápida posible hasta una temperatura en torno a los 15 °C. Asimismo, el tiempo transcurrido entre este enfriamiento y la posterior congelación del producto debe ser lo más reducido posible (Cano, 1996).

Otro aspecto a tener en cuenta en este tipo de proceso, es la posible presencia de microorganismos capaces de proliferar a bajas temperaturas, como las pertenecientes al género *Listeria*, las cuales pueden constituir un serio riesgo sanitario ya que durante el proceso de descongelación previo al consumo de los vegetales congelados, éstos se encuentran a una temperatura en la cual pueden proliferar con facilidad. Estudios microbiológicos han demostrado la presencia de *Listeria monocytogenes* en alimentos congelados presentes en supermercados (Petran y col., 1988), con el consecuente riesgo microbiológico para los consumidores.

Los resultados microbiológicos obtenidos en las muestras de grelo tras el escaldado (Tabla 52) y en las muestras de grelo tras la cocción (Tabla 53), cumplen todos los requisitos establecidos por el RD 3484/2000, de 29 de diciembre, en el que se establecen las normas de higiene para la elaboración, distribución y comercio de comidas preparadas. Asimismo, no han sido detectadas cantidades superiores a 10 ufc/g de *Clostridium perfringens*, microorganismo ampliamente utilizado como marcador de la presencia de esporulados. Este hecho refleja que el tratamiento térmico empleado ha sido adecuado. El bajo número de otras poblaciones bacterianas, como los aerobios mesófilos,

demuestra además que los procedimientos de congelación, almacenamiento y posterior descongelación de estas muestras no ha favorecido la proliferación bacteriana. Por lo tanto, el procedimiento de industrialización implantado puede considerarse adecuado desde el punto de vista microbiológico.

Tabla 52. Resultados microbiológicos obtenidos en grelo escaldado

determinación	valores mínimos obtenidos	valores máximos obtenidos
Aerobios mesófilos	2.3×10^3 ufc/g	4.1×10^3 ufc/g
Enterobacteriáceas lactosa positivas	< 10 ufc/g	< 10 ufc/g
<i>Escherichia coli</i>	< 10 ufc/g	< 10 ufc/g
<i>Staphylococcus aureus</i>	< 50 ufc/g	< 50 ufc/g
<i>Salmonella/ Shigella spp.</i>	Ausencia en 25 g	Ausencia en 25 g
<i>Listeria monocytogenes</i>	Ausencia en 25 g	Ausencia en 25 g
<i>Clostridium perfringens</i>	< 10 ufc/g	< 10 ufc/g

Tabla 53. Resultados microbiológicos obtenidos en grelo cocido

determinación	valores mínimos obtenidos	valores máximos obtenidos
Aerobios mesófilos	5×10^3 ufc/g	1.1×10^4 ufc/g
Enterobacteriáceas lactosa positivas	< 10 ufc/g	< 10 ufc/g
<i>Escherichia coli</i>	< 10 ufc/g	< 10 ufc/g
<i>Staphylococcus aureus</i>	< 50 ufc/g	< 50 ufc/g
<i>Salmonella/ Shigella spp.</i>	Ausencia en 25 g	Ausencia en 25 g
<i>Listeria monocytogenes</i>	Ausencia en 25 g	Ausencia en 25 g
<i>Clostridium perfringens</i>	< 10 ufc/g	< 10 ufc/g

CONCLUSIONES



CONCLUSIONES

1. Los tratamientos óptimos para el escaldado y cocción de los grelos (*Brassica rapa*, L.), son el de vapor durante 2 min, y la cocción en agua durante 45 min, respectivamente, bajo las condiciones ensayadas en este estudio.
2. El prensado resulta el sistema de escurrido más efectivo. Ya que las muestras prensadas presentan un porcentaje de humedad menor que sometidas a centrifugación.
3. Las técnicas analíticas propuestas para la extracción y cuantificación de vitaminas (ácido ascórbico, ácido dehidroascórbico, tiamina y riboflavina) y pigmentos (carotenoides, clorofilas y feofitinas), mediante HPLC, son válidas para obtener resultados satisfactorios, ya que cumplen con los parámetros de linealidad, precisión, exactitud y límites de detección establecidos. Asimismo, los métodos cromatográficos son adecuados puesto que desarrollan una separación definida, eficiente y libre de interferencias.
4. La peroxidasa es el indicador enzimático más adecuado para determinar la idoneidad del tratamiento de escaldado aplicado al grelo.
5. Se ha encontrado una influencia clara del tratamiento térmico aplicado (escaldado o cocido) sobre las características físico-químicas estudiadas en el grelo. La cocción provoca mayores pérdidas de acidez, cenizas, color, tiamina, riboflavina, ácido ascórbico, clorofilas, fenoles totales y actividad reductora que el escaldado. Sin embargo, los valores de luteína, β -caroteno y feofitinas, se incrementan tras la cocción.
6. El almacenamiento en congelación produce ligeras variaciones en los parámetros físicoquímicos analizados.

7. La ausencia de *Listeria monocytogenes* y el bajo número de otras poblaciones bacterianas, como los aerobios mesófilos, demuestra que el procedimiento de industrialización implantado, así como la congelación, almacenamiento y posterior descongelación de las muestras de grelo, es adecuado desde el punto de vista microbiológico, por lo que el grelo escaldado y/o cocido, bajo las condiciones aplicadas en este estudio, puede considerarse apto para consumo humano.
8. Los grelos son un producto apto para la congelación, tanto escaldados como cocidos.

BIBLIOGRAFÍA



BIBLIOGRAFÍA

- Adams, J.B., Harvey, A. y Dempsey, C.E. (1996).** Regenerated and denaturated peroxidase as potential lipid oxidation catalysis. *Food Chemistry*. 57(4): 505-514.
- Adragna-Bourgeois, O. y Bourgeois, C.M. (2002).** Valor nutricional de las hortalizas. En *Tecnología de las hortalizas*. Tirilly, Y. y Bourgeois, C.M. (Eds.). Ed. Acribia, S.A. Zaragoza, España.
- Agte, V.V., Tarwadi, K.V., Mengale, S. y Chiplonkar, S.A. (2000).** Potencial of traditionally cooked green leafy vegetables as natural sources for supplementation of eight micronutrients in vegetarian diets. *Journal of Food Composition and Analysis*. 13: 885-891.
- Agte, V., Tarwadi, K., Mengale, S., Hinge, A. Y Chiplonkar, S. (2002).** Vitamin profile of cooked foods: how healthy is the practice of ready-to-eat foods? *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 53(3): 197-208.
- Ahmed, J., Shivhare, U.S. y Debnath, S. (2002).** Colour degradation and rheology of green chilli puree during thermal processing. *International Journal of Food Science and Technology*. 37: 57-63.
- Akhtar, P., Gray, J.L., Cooper, T.H., Garling, D.L. y Booren, A.M. (1999).** Dietary pigmentation and deposition of α -tocopherol and carotenoids in rainbow trout muscle and liver tissue. *Journal of Food Science*. 64: 234-239.
- Alcedo, M.J., Durán, L. y Rodrigo, M. (1973).** La medida del color en conservas vegetales. V. guisantes. *Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos*. 13(1): 124-133.
- Aleixandre Benavent, J. R. (1997).** *Conservación de alimentos*. Universidad Politécnica de Valencia, Servicio de Publicaciones, D. L. Valencia, España.
- American Chemical Society (ACS). 1980.** Subcommittee on enviromental analytical chemistry. Guidelines for data adquisition and data quality evaluation in enviromental chemistry. *Analytical Chemistry*. 52: 2242-2249.
- Andlauer, W., Stumpf, C., Hubert, M., Rings, A. Y Fürts, P. (2003).** Influence of cooking process on phenolic marker compounds of vegetables. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*. 73(2): 152-159.

- Arbones Maciñeira, E., Gómez Fernández, J. y Vázquez Adan, E. (2001).** *Las instalaciones de aire comprimido en las industrias agroalimentarias*. Ed. Trymar, Lugo, España.
- Artigas, J.M., Gil, J.C. y Felipe, A. (1985).** El espacio uniforme de color $CIE_{L^*a^*b^*}$. Utilización. *Revista de Agroquímica y Tecnología de los Alimentos*. 25(3): 316-320.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists). (2002).** *Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL*. 17th Edition, Current Through Revision # 1. Gaithersburg, USA.
- Bahçeci, K.S., Serpen, A., Gökmen, V. y Acar, J. (2005).** Study of lipoxygenase and peroxydase as indicator enzymes in green beans: change of enzyme activity, ascorbic acid and chlorophylls during frozen storage. *Journal of Food Engineering*. 66: 187-192.
- Ball, G.F.M. (2000).** The fat-soluble vitamins. In *Food analysis by HPLC*. Nollet, L.M. (Ed.). Marcel Dekker, Inc., New York, USA.
- Barbosa Cánovas, G.V., Altunakar, B. y Mejía Lorio, D.J. (2005).** Freezing of fruits and vegetables. In *An agribusiness alternative for rural and semi-rural areas*. Ed. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), Roma, Italia.
- Barret, D.M., García, E.L., Russell, G.F., Ramírez, E., y Shirazi, A. (2000).** Blanch time and cultivar effects on quality frozen and stored corn and broccoli. *Journal of Food Science*. 65(3): 534-540.
- Barret, D.M. y Theerakulkait, C. (1995).** Quality indicators in blanched, frozen, stored vegetables. *Food Technology*. 49(62): 64-65.
- Belitz, H.D. y Grosch, W. (1997).** *Química de los alimentos*. Ed. Acribia, S.A. Zaragoza, España.
- Benavente, P. (1995).** *Guía de alimentación*. Ed. Centro de Investigaciones Lingüísticas y Literarias. Xunta de Galicia. España.
- Berg, H., Schaik F., Finglas, P.M. y Froidmont-Görtz, I. (1996).** Third EU MAT intercomparison on methods for the determination of vitamins B-1, B-2 and B-6 in food. *Food Chemistry*. 57(1): 101.108.

- Bettison, J. (1992).** Envasado. En *Procesado de hortalizas*. Arthey, D. y Dennis, C. (Eds.). Ed. Acribia, S.A. Zaragoza, España.
- Bhaskarachary, K., Sankar, R.D.S., Deosthale, Y.G. y Vinodini, R. (1995).** Carotene content of some common and less familiar foods of plant origin. *Food Chemistry*. 54: 189-193.
- Biton, M. (2002a).** Los congelados. En *Tecnología de las hortalizas*. Tirilly, Y. y Bourgeois, C.M. (Eds.). Ed. Acribia, S.A. Zaragoza, España.
- Biton, M. (2002b).** La conserva apertizada. En *Tecnología de las hortalizas*. Tirilly, Y. y Bourgeois, C.M. (Eds.). Ed. Acribia, S.A. Zaragoza, España.
- Blanco, M., Fernández-Garayzábal, J.F., Domínguez, L., Briones, V., Vázquez Boland, J.A., Blanco, J.L., y Suárez, G. (1989).** A technique for the direct identification of haemolytic-pathogenic listeria on selective plating media. *Letters in Applied Microbiology*. 9: 125-128.
- Board, P.W. (1989).** *Control de calidad en la elaboración de frutas y hortalizas*. Ed. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), Roma, Italia.
- Boekel, M.A.J.S. (1999).** Testing of kinetic models: usefulness of the multiresponse approach as applied to chlorophyll degradation in foods. *Food Research International*. 32: 261-269.
- Botero Omary, M., Brovelli, E.A., Pusateri, D.J., David, P., Rushing, J.W., Fonseca, J.M. (2003).** Sulforaphane potencial and vitamin C concentration in developing heads and leaves of broccoli (*Brassica oleracea* var. italica). *Journal of Food Quality*. 26: 523-530.
- Brewer, M.S. y Begum, S. (2004).** Effect of microwave power level and time on ascorbic acid content, peroxidase activity and color of selected vegetables. *Journal of Food Processing and Preservation*. 27(6): 411-426.
- CAE (Código Alimentario Español) y disposiciones complementarias. (2001).** Hortalizas y verduras. 4ª edición preparada por Deleuze, I.P. Ed. Tecnos, S.A. Madrid, España.

- Camacho B., Álvarez M., Alemán R y Álvarez F. (2004).** Efecto de la temperatura de secado sobre la degradación de carotenoides en frutos de coroba (*Jessenia polycarpa* Karst). *Ciencia y Tecnología Alimentaria*. 4 (3): 206-210.
- Candela Delgado, M. y Astiasarán Anchía, I. (2000).** Alimentos cocinados. En *Alimentos: composición y propiedades*. Astiasarán Anchía, I. y Martínez Hernández, J. (Eds.) Ed. McGraw-Hill-Interamericana de España, S.A.U. Madrid, España.
- Canet Parreño, W. (1996).** Estabilidad e importancia de la vitamina C en vegetales congelados. *Alimentación, Equipos y Tecnología*. 5: 75-87.
- Canet Parreño, W. y Álvarez Torres, M. D. (2000).** Congelación de alimentos vegetales. En *Aplicación del frío a los alimentos*. Lamua Soldevilla, M. Ed. Mundi-Prensa, Madrid, España.
- Canet, W., Alvarez, M.D., Luna, P., Fernández, C. y Tortosa, M.E. (2005).** Blanching effects on chemistry, quality and structure of green beans (cv. *Moncayo*). *European Journal of Research and Technology*. 200: 421-430.
- Canet, W., Gil, M.J., Alique, R. y Alonso, J. (1991).** Efecto de diferentes escaldados en la textura y contenido de ácido ascórbico de coles de Bruselas congeladas. *Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos*. 31 (1): 46-55.
- Canjura, F.L., Schwartz, S.J. y Nunes, R.V. (1991).** Degradation kinetics of chlorophylls and chlorophyllides. *Journal of Food Science*. 56 (6): 1639-1643.
- Cano, M.P. (1996).** Vegetables. In *Freezing effects on food quality*. Lester E. J. (Ed.). Ed Marcel Dekker, Inc. New York, USA.
- Carbonell, J.V., Piñaga, F., Peña, J.L. y García, M.J. (1985).** Deshidratación de frutas y hortalizas con aire ambiente. V Ensayos con nabos (*Brassica rapa*, L). *Revista de Agroquímica y Tecnología de los Alimentos*. 25 (2): 257-266.
- Cartaxana, P. y Brotas, V. (2003).** Effects of extraction on HPLC quantification of major pigments from benthic microalgae. *Archiv für Hydrobiologie*. 157 (3): 339-349.
- Chandrika, U.G., Svanberg, U. Y Jansz, E.R. (2006).** In vitro accessibility of β -carotene from cooked Sri Lankan green leafy vegetables and their estimated contribution to vitamin A requirement. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 86: 54-61.

- Chernomorsky, S., Segelman, A. y Poretz, R.D. (1999).** Effect of dietary chlorophyll derivatives on mutagenesis and tumor cell growth. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis*. 19: 313–322.
- Cheung, L.M., Cheung, P.C.K. y Ooi, V.E.C. (2003).** Antioxidant activity and total phenolics of edible mushroom extracts. *Food Chemistry*. 81: 249-255.
- Cid Canda, C. (2000).** Hortalizas y verduras. En *Alimentos: composición y propiedades*. Astiasarán Anchía, I. y Martínez Hernández, J. (Eds.) Ed. McGraw-Hill-Interamericana de España, S.A.U. Madrid, España.
- Conning, D. (1992).** Introducción. En *Procesado de hortalizas*. Arthey, D. y Dennis, C. (Eds.) Ed. Acribia, S.A. Zaragoza, España.
- Cordeiro, X., Dávila, M. y Núñez, A. (1998).** *A nosa horta*. Ed. Xerais de Galicia S.A. Vigo, España.
- Coultate, T.P. (1996).** *Manual de Química y Bioquímica de los Alimentos*. 2ª edición. Ed. Acribia, S.A. Zaragoza, España
- De Ell, J.R., Van Kooten, O., Prange, R.K. y Murr, D.P. (1999).** Application of chlorophyll fluorescent techniques in post-harvest physiology. *Horticultural Review*. 23: 69-107.
- De La Cruz-García, C., González-Castro, M.J., Oruña-Concha, M.J., López-Hernández, J., Simal-Lozano, J.A. y Simal-Gándara, J. (1997).** The effects of various culinary treatments on the pigment content of green beans (*Phaseolus vulgaris*, L.). *Food Research International*. 30: 787-791.
- Descamps, P. (1987).** Compte rendi d'expérimentation sur le blanchiment de produits destinés à la surgélation. *Bulletin semestriel du CTCPA* juin 1987, n° 58.
- Dewanto V., Wu X., Adom K.K., and Liu R.H. (2002).** Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 50. 3010-3014.
- Díaz, D. (1974).** *Gran Enciclopedia Gallega*. Ed. Silverio Cañada. Gijón, España.
- Dietz, J.M., Kantha, S.S., Erdman, J.W, Jr. (1988).** Reversed phase HPLC analysis of α - and β - carotene from selected raw and cooked vegetables. *Plant Foods for Human Nutrition*. 38(4): 333-341.

- Directiva (CE) No. 43/1993**, de 14 de Junio. Productos alimentarios. Higiene de los productos alimentarios. D.O.U.E. 19 de Julio de 1999. No. 175, pág. 1-12.
- Drews, M., Schonhof, I. y Krumbein, A. (1995).** Gehalt und verteilung von inhaltsstoffen in kopfsalat. *Gartenbauwissenschaft*. 60: 287-293. (resumen en inglés).
- Drews, M., Schonhof, I. y Krumbein, A. (1997).** Gehat an inhaltssoffen in eissalat (*Lactuca sativa* var. Capitala L.) in abhaengigkeit von sorte und stadium der kopfentwicklung beim anbau im gewaechshaus. *Gartenbauwissenschaft*. 62: 65-72. (resumen en inglés).
- Duthie, G.G., Gardner, P.T., y Kyle, J.A.M. (1993).** Plant polyphenols: are they the new magic bullet. *Proceedings of the Nutrition Society*. 62: 599-603.
- Favell, D.J. (1998).** A comparison of the vitamin C content of fresh and frozen vegetables. *Food Chemistry*. 62 (1): 59-64.
- Fellows, P. (1994).** *Tecnología del procesado de los alimentos. Principios y prácticas*. Ed. Acribia, S. A. Zaragoza, España.
- Font, R., Rio Celestino, M., Cartea, E. y Haro Bailón, A. (2005).** Quantification of glucosinolates in leaves of leaf rape (*Brassica napus* ssp. *Pabularia*) by near-infrared spectroscopy. *Phytochemistry*. 66: 175-185.
- García Arias, N. (2006).** *Estudio del grelo cocido y escaldado tras la congelación*. Proyecto Fin de Carrera en Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Universidad de Santiago de Compostela.
- García Muiña, E. (2005).** *Optimización del proceso de congelación del grelo*. Proyecto Fin de Carrera en Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Universidad de Santiago de Compostela.
- Garrote, R.L., Silva, E.R. y Bertone, R.A. (2003).** Kinetic parameters for thermal inactivation of cut green beans lipoxygenase using unsteady-state methods. *Latin American Applied Research*. 33(2): 87-90.
- Garrote, R.L., Silva, E.R., Bertone, R.A. y Roa, R.D. (2006).** Changes of ascorbic acid and surface colour of green peas sterilized in cans subjected to end-over-end agitation. *Journal of Food Engineering*. 73: 29-37.
- Giannakourou M.C. y Taoukis P.S. (2003).** Kinetic modelling of vitamin C in frozen green vegetables under variable storage conditions. *Food Chemistry*. 83: 33-41.

- Gisport, C. (1990).** *Enciclopedia práctica de la agricultura y la ganadería*. Ed. Océano. Madrid, España.
- Gnanasekharan, V., Shewfelt, R.L. y Chinnan, M.S. (1992).** Detection of color changes in green vegetables. *Journal of Food Science*. 57: 149-154.
- Gökmen, V., Kahraman, N., Demir, N. y Acar, J. (2000).** Enzymatically validated liquid chromatographic method for the determination of ascorbic and dehydroascorbic acids in fruit and vegetables. *Journal of Chromatography A*. 881: 309-316.
- Gökmen, V., Bahçeci, S. y Acar, J. (2002a).** Characterization of crude lipoxygenase extract from green pea using a modified spectrophotometric method. *European Food Research and Tecnology*. 215: 42-45.
- Gökmen, V., Bahçeci, S. y Acar, J. (2002b).** Liquid chromatographic method for the determination of chlorophylls, carotenoids, and their derivatives in fresh and processed vegetables. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. 25(8): 1201-1213.
- Gökmen, V., Bahçeci, K.S., Serpen, A. y Acar, J. (2005).** Study of lipoxygenase and peroxidase as blanching indicator enzymes in peas: change of enzyme activity, ascorbic acid and chlorophylls during frozen storage. *Lebensmittel-Wissenschaft und –Technologie*. 38: 903-908.
- Granado, F., Olmedilla, B., Blanco, I. y Rojas-hidalgo, E. (1996).** Major fruits and vegetable contributions to the main serum carotenoids in the Spanish diet. *European Journal of Clinical and Nutrition*. 50: 246-250.
- Gregory III, J. (2000).** Vitaminas. En *Química de los alimentos*. Fennema O. R. (Ed.) Ed. Acribia S.A. Zaragoza, España.
- Gruda, Z. y Postolski, J. (1986).** *Tecnología de los alimentos congelados*. Ed. Acribia, S. A. Zaragoza, España.
- Guillén Salvador, A. (1988).** *Introducción a la neumática*. Ed. Marcombo, Barcelona, España.
- Gunawan, M.I. y Barringer, S.A. (2000).** Green colour degradation of blanched broccoli (*Brassica Oleracea*) due to acid and microbial growth. *Journal of Food Processing Preservation*. 24: 253-263.

- Hägg, M. (1994).** Effect of various commercially available enzymes in the liquid chromatographic determination with external standardization of thiamine and riboflavin in foods. *Journal of AOAC International*. 77(3): 681-686.
- Halpin, B.E. y Lee, C.Y. (1987).** Effect of blanching on enzyme activity and quality changes in green peas. *Journal of Food Science*. 52(4): 1002-1005.
- Halpin, B., Pressey, R., Jen, J. y Mondy, N. (1989).** Purification and characterization of peroxydase isoenzymes from green peas (*Pisum sativum*). *Journal of Food Science*. 54(3): 644-649.
- Harris, R.S. y Karmas, E. (1975).** *Nutritional evaluation of food processing*. AVI, 2ª ed. Westport.
- Hayakawa, K. y Timbers, G.E. (1977).** Influence of heat treatment on the quality of vegetables: changes in visual green colour. *Journal of Food Science*. 42(3): 778-781.
- Heaton, J.W. y Marangoni, A.G. (1996).** Chlorophyll degradation in processed foods and senescent plant tissues. *Trend in Food Science and Technology*. 7(1): 8-15.
- Heinonen, M.I., Ollilainen, V., Linkola, E.K., Varo, P.T., Koivistoinen, P.E. (1989).** Carotenoids in finish foods: vegetables, fruits and berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 37: 655-659.
- Hemeda, H.M., y Klein, B.P. (1991).** Inactivation and regeneration of peroxidase activity in vegetable extracts treated with antioxidants. *Journal of Food Science*. 56(1): 68-71.
- Herranz, J., Vidal Valverde, C. y Rojas Hidalgo, E. (1983).** Cellulose, hemicellulose and lignin content of raw and cooked processed vegetables. *Journal of Food Science*. 48:274-275.
- Hessayon, D.G. (1988).** *Manual de horticultura*. Ed. Blume, S.A. Barcelona, España.
- Higashi-Okai, K., Otani, S. y Okai, Y. (1999).** Potent suppressive effect of a Japanese edible seaweed, *Enteromorpha prolifera* (Sujiao-nori) on initiation and promotion phases of chemically induced mouse skin tumorigenesis. *Cancer Letters*. 140: 21-25.
- Holdsworth, S.D. (1987).** *Conservación de frutas y hortalizas*. Ed. Acribia, S.A., Zaragoza, España

- Howard, L.A., Wong, A.D, Perry, A.K. y Klein, B.P. (1999).** β -Carotene and ascorbic acid retention in fresh and processed vegetables. *Journal of Food Science*. 64 (5): 929-936.
- Hunter, K.J. y Fletcher, J.M. (2002).** The antioxidant activity and composition of fresh, frozen, jarred and canned vegetables. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 3: 399-406.
- <http://es.wikipedia.org/wiki/Nabo>**, (06/01/2006).
- http://nutriserver.com/Divulgacion/Consumo_de_alimentos_ENNA_91/Galicia/Galicia.html**, (05/04/2006).
- <http://perso.wanadoo.es/conservaslou/p44.html>**, (06/01/2006).
- <http://physics.nist.gov/cvv/pdf/sp811.pdf>**, (01/04/2006).
- <http://www.aerobicos.com.mx/alimenta147.htm>**, (02/02/2006).
- <http://www.ainia.es/esp/Servicios/ippc/pdf/mtd/Elaboradosveg.pdf>**, (13/04/2005).
- http://www.consumer.es/web/es/alimentacion/aprender_a_comerbien**, (06/01/2006).
- <http://www.ejpau.media.pl/series/volume6/issue1/horticulture/art-02.html>**, (08/04/06).
- <http://www.marronglace.net/grelosdegalicia.htm>**, (06/01/2006).
- http://www.nutrinfo.com.ar/pagina/info/vita_min.html**, (02/02/2006).
- <http://www.sehlelha.org/busalimento.aspx>**, (30/10/2005).
- Ihl, M., Monslaves, M. y Bifani, V. (1998).** Chlorophyllase inactivation as a measure of blanching efficacy and colour retention of Artichokes (*Cynara scolymus* L.). *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*. 31: 50-56.
- Illow, R.; Regulska-Ilow, B. y Szymczak, J. (1995).** Assessment of vitamin C losses in conventionally cooked and microwave-processed vegetables. *Bromatologia i chemia toksykologiczna*. 28 (4): 317-321.
- Instituto Internacional del frío. (1990).** *Alimentos congelados: procesado y distribución*. Ed. Acirbia, S. A., Zaragoza, España.
- Ismail, A., Marjan, Z.M. Foong, C.W. (2004).** Total antioxidant activity and phenolic content in selected vegetables. *Food Chemistry*. 87. 581-586.

- IOM (Institute of Medicine). (2001).** Dietary reference intakes for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium and zinc. National Academy Press, Washington, D.C.
- Kala, A. y Prakash, J. (2004).** Nutrient composition and sensory profile of differently cooked green leafy vegetables. *International Journal of Food Properties*. 7(3) 659-669.
- Kaur, C., Kumar, S. Y Kapoor, H.C. (1999).** Heat stability of lipoxigenase and peroxidase during blanching of vegetables. *Journal of Scientific and Industrial Research*. 58(12): 1005-1009.
- Khachik, F., Beecher, G.R. y Whittaker, N.F. (1986).** Separation, identification and quantification of the major carotenoid and chlorophyll constituents in extracts of several green vegetables by liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 34: 603-616.
- Kidmose, U., Edelenbos, M., Chistensen, L.P., Hegelund, E. (2005).** Chromatographic determination of changes in pigments in spinach (*Spinacia oleracea* L.) during processing. *Journal of Chromatographic Science*. 43(9): 466-472.
- Kidmose, U. y Hansen, M. (1999).** The influence of postharvest storage, temperature and duration on quality of cooked broccoli florets. *Journal of Food Quality*. 22: 135-146.
- Kidmose, U., Knuthsen, P., Edelenbos, M., Justesen, U. Y Hegelund, E. (2001).** Carotenoids and flavonoids in organically grown spinach (*Spinacia oleracea* L.) genotypes after deep frozen storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 81: 918-923.
- Kimura, M. Y Rodriguez-Amaya, D.B. (2002).** A scheme for obtaining standards and HPLC quantification of leafy vegetable carotenoids. *Food Chemistry*. 23: 171-201.
- Kimura, M., Saito, N. Y Itokawa, Y. (1982).** Cooking loss of vitamin B₁ in foods and its nutritional significance. 411-426. *Vitamins*. 56(8): 415-423.
- King, D.L. y Klein, B.P. (1987).** Effect of flavonoids and related compounds on soybean lipoxygenase-1 activity. *Journal of Food Science*. 52(1): 220-221.
- Kirwan, M.J. y Strawbridge, J.W. (2004).** Los plásticos en el envasado de alimentos y bebidas. En *Manual del envasado de alimentos y bebidas*. Coles, R., McDowell, D. y

- Kirwan, M.J (Eds.). 1ª edición. Eds. AMV Ediciones y Mundi-Prensa. Madrid, España.
- Kopsell, D.A., Kopsell, D.E., Lefsrud, M.G., Curran-Calentano, J. y Dukach, L.E. (2004).** Variation in lutein, β -carotene, and chlorophyll concentrations among *Brassica oleracea* cultigens and seasons. *HortScience*. 39(2): 361-364.
- Krinsky, N.I. (2001).** Carotenoids as antioxidants. *Nutrition*. 17: 815-817.
- Krinsky, N.I., Landrum, J.N. y Bone, R.A. (2003).** Biologic mechanisms of the protective role of lutein and zeaxanthin in the eye. *Annual Review of Nutrition*. 23: 171-201.
- Krumbein, A., Schonhof, I. Y Schreiner, M. (2005).** Composition and contents of phytochemicals (glucosinolates, carotenoids and chorophylls) and ascorbic acid in selected Brassica species (B. Juncea, B. Rapa subsp. Nipposinica var. Chinoleifera, B. Rapa subsp. Chinensis and B. Rapa subsp. Rapa). *Journal of Applied Botany and Food Quality*. 79(3): 168-174.
- Lau, M.H., Tang, J. y Swanson, B.G. (2000).** Kinetics of textural and colour changes in green asparagus during thermal treatments. *Journal of Food Engineering*. 45: 231–236.
- Le Bohec, J. (2001).** Hortalizas de tallo y de hojas. En *Tecnología de las hortalizas*. Tirilly, Y. y Bourgeois, C.M. (Eds.). Ed. Acribia, S.A. Zaragoza, España.
- Lee, S.K. y Kader, A.A. (2000).** Preharvest and postharvest factors influencing vitamin C content of horticultural crops. *Postharvest Biology Technology*. 20: 207-220.
- Legland, J.P. y Wolf, J.M. (1985).** *Technologie culinaire a la carte*. Ed. Lanore, J. Paris, Francia.
- Lin C.H., and Chen B.H. (2005).** Stability of carotenoids in tomato juice during storage. *Food Chemistry*. 90: 837-846.
- Lin, Z. y Schyvens, E. (1995).** Influence of blanching treatments on the texture and color of some processed vegetables and fruits. *Journal of Food Processing and Preservation*. 19 (6): 451-465.
- Lisiewska, Z., Kmiecik, W. y Korus, A. (2006).** Content of vitamin C, carotenoids, chlorophylls and polyphenols in green parts of dill (*Anethum graveolens* L.) depending on plant height. *Journal of Food Composition and Analysis*. 19: 134-140.

- Lisiewska, Z., Kmiecik, W. y Slupski, J. (2004).** Contents and chlorophylls and carotenoids in frozen dill: effect of usable part and pre-treatment on the content of chlorophylls and carotenoids in frozen dill (*Anethum graveolens* L.), depending on the time and temperature of storage. *Food Chemistry*. 84(4): 511-518.
- Lisiewska, Z., Slupski, J. y Korus, A. (2001).** Influence of cultivation period, cultivar and usable part on content of chlorophylls and volatile oils in dill (*Anethum graveolens* L.). *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities s. Food Science and Technology*.
- Little, A.C. (1975).** Off on a tangent. *Journal of Food Science*. 40: 410-412.
- Liu, R.H. (2003).** Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals. *American Journal of Clinical and Nutrition*. 78: 517S-520S.
- Llamazares, J.M. (2000).** La producción de grelos en Galicia busca salidas industriales al mercado. *Xóvenes Agricultores, Asaja Galicia*. 181: 52-61.
- Lopaczynsky, W. y Zeisel, S.H. (2001).** Antioxidants, programmed cell death, and cancer. *Nutrition Research*. 21. 295-307.
- López, A., Montaña, A., García, P y Garrido, A. (2005).** Note: Quantification of ascorbic acid and dehydroascorbic acid in fresh olives and in commercial presentations of table olives. *Food Science and Technology International*. 11(3): 199-204.
- López Andreu, F.J., Moya Lorente, E., Palacios Vallejo, P.L. y Esteban Álvarez, R.M. (1994).** Estudio de la degradación de clorofilas durante la conservación y manipulación de guisantes y espinacas. *Alimentación, Equipos y Tecnología*. 10: 101-105.
- López-Ayerra, B., Murcia, M.A. y García-Carmona, F. (1999).** Lipid peroxidation and chlorophyll levels in spinach during refrigerated storage and after industrial processing. *Food Chemistry*. 61 (1): 113-118.
- López-Hernández, J. Vázquez-Odériz, L. Vázquez-Blanco, E. Romero-Rodríguez y Simal-Lozano, J. (1993).** HPLC determination of major pigments in the bean *Phaseolus vulgaris*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 41: 1613-1615.

- Lovett, J. (1988).** Isolation and enumeration of *Listeria monocytogenes*. *Food Technology*. 42 (4): 172-175.
- Lynch, P.L.M. y Young, I.S. (2000).** Determination of thiamine by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 881: 267-284.
- Lyon, D. y Churchill, H. (1992).** Calidad. En *Procesado de hortalizas*. Arthey, D. y Dennis, C. (Eds). Ed. Acribia, S.A. Zaragoza, España.
- Ma, L. y Dolphin, D. (1999).** The metabolites of dietary chlorophylls. *Phytochemistry*. 50: 195–202.
- Mahan, L.K. y Arlin, M.T. (1995).** *Krause, Nutrición y Dietoterapia*. Ed. Interamericana McGraw-Hill. México, D.F.
- Mainardi, F. (1985).** *Manual práctico del horticultor moderno*. Ed. De Vecchi, S.A. Barcelona, España.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C. Y Jimenez, L. (2004).** Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical and Nutrition*. 79: 727-747.
- Mangos, T. y Berger, R.G. (1997).** Determination of major chlorophyll degradation products. *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und-Forschung*. 204: 345-350.
- Marín Rodríguez, J.M. (2004).** *Portagrano, 2004. Vademécum de variedades hortícolas*. Ed. Escobar Impresores, S.L. Almería, España.
- Maroto, J.V. (1995).** *Horticultura herbácea especial*. Ed. Mundi-Prensa, Madrid, España.
- Mataix, J. y Aranceta, J. (2002).** Recomendaciones nutricionales y alimentarias. En *Nutrición y alimentación humana tomo I*. Mataix, V.J. (Ed.). Ed. Ergon. Madrid, España.
- Mataix, J. y Ochoa, H.J. (2002).** Vitaminas antioxidantes. En *Nutrición y alimentación humana tomo I*. Mataix, V.J. (Ed.). Ed. Ergon. Madrid, España.
- Mataix, J. y Sánchez, M.F. (2002).** Vitaminas y proliferación celular. En *Nutrición y alimentación humana tomo I*. Mataix, V.J. (Ed.). Ed. Ergon. Madrid, España.
- Mataix, J., García, D.L., Mañas, A.M., Martínez, V.E. y Llopis, G.J. (2003).** Composición en nutrientes de los alimentos: verduras y hortalizas. En *Tabla de composición de alimentos*. Mataix, V.J. (Ed.). 4ª edición. Ed. Universidad de

Granada. Granada, España.

- McLeod, G. y Seyyedain-Ardebili, M. (1981).** Natural and simulated meat flavors (with particular reference to beef). *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 14(4): 309-381.
- McDaniel, M.R., Montgomery, M.W., Latham, D. y Lundahl, D.S. (1988).** Evaluation of high temperature-short time (HTST) blanched frozen sweet corn. *Journal of Food Science*. 53(3): 760-764.
- McGuire, R.G. (1992).** Reporting of objective color measurements. *HortScience*. 27 (12): 1254-1255.
- Minguez-Mosquera, M.I., Gandul-Rojas, B., Gallardo-Guerrero, L. y Jaren-Galan, M. (2002).** Chlorophylls. In *Methods of Analysis for Functional Foods and Nutraceuticals*. Hurst, W.J. (Ed.). Ed. CRC Press. Boca Ratón, USA.
- Minolta. (1994).** Precise color communication. Color control from feeling to instrumentation. Minolta, Co. Ltd., Osaka, Japón.
- Miyoshi, K., Tani, T. y Tonoizuka, F. (1995).** Changes in the contents of mineral elements contained in vegetables during cooking. *Eiyogaku Zasshi*. 53(2): 103-110.
- Mizda, Y., Shinmoto, H., Kobori, M. y Tsushida, T. (2002).** Separation and quantification of carotenoids and chlorophylls in vegetables by high-performance liquid chromatography. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*. 49(7): 500-506.
- Mondragón-Portocarrero, A., Pena-Martínez, B., Fernández-Fernández, E., Romero-Rodríguez, A. y Vázquez-Odériz, L. (2006).** Effects of different pre-freezing blanching procedures on the physicochemical properties of *Brassica rapa* leaves (Turnip Greens, *Grelos*). *International Journal of Food Science and Technology*. 41: 1-6.
- Morita, K., Ogata, M. y Hasegawa, T. (2001).** Chlorophyll derived from *Chlorella* inhibits dioxin excretion in rats. *Environmental Health Perspectives*. 109: 289-294.
- Morton, I.D. y McLeod, A.J. (1982).** Introduction. In *Food Flavors part A*. Ed. Elsevier. New York, USA.
- Mosha, T.C., Pace, R.D., Adeyeye, S., Mtebe, K. y Laswai, H. (1995).** Proximate composition and mineral content of selected Tanzanian vegetables and the effect of traditional processing on the retention of ascorbic acid, riboflavin and thiamine. *Plant*

- Foods for Human Nutrition*. 48(3): 235-245.
- Mou, B. (2005).** Genetic variation of beta-carotene and lutein contents in lettuce. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 130(6): 870-876.
- Nagy-Gasztonyi, M., Kardos-Neumann, A. y Biacs, P.A. (2000).** Potencial indicator enzymes for broccoli blanching technology. *Acta Alimentaria*. 29(2): 181-186.
- Nam, S.H., Choi, S.P., Kang, M.Y., Koh, H.J., Kozukue, N. y Friedman, M. (2006).** Antioxidative activities of bran extracts from twenty one pigmented rice cultivars. *Food Chemistry*. 94: 613-620.
- National Research Council. (1991).** *Recommended Dietary Allowances*. Ed. Consulta, S.A. Barcelona, España.
- Negishi, T., Rai, H. y Hayatsu, H. (1997).** Antigenotoxic activity of natural chlorophylls. *Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 376: 97–100.
- Niizu, P.Y. y Rodríguez-Amaya, D.B. (2005).** New data on the carotenoid composition of raw salad vegetables. *Journal of Food Composition and Analysis*. 18: 739-749.
- Nilsson, J., Stegmark, R. y Akesson, B. (2004).** Total antioxidant capacity in different pea (*Pisum sativum*) varieties after blanching and freezing. *Food Chemistry*. 86: 501-507.
- Ninfali, P. y Bacchiocca, M. (2003).** Polyphenols and antioxidant capacity of vegetables under fresh and frozen conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*,. 51: 2222-2226.
- Nisha, P., Singhal, R.S. y Pandit, A.B. (2004).** A study on the degradation kinetics of visual green colour in spinach (*Spinacea oleracea*, L.) and the effect of salt there in. *Journal of Food Engineering*. 64: 135–142.
- Noguera García, V. (1996).** *Plantas hortícolas*. Ed. Floraprint. Valencia, España.
- Norma ISO 7402:1993.** Microbiology. General guidance for the detection of *Enterobacteriaceae* without resuscitation. MPN technique and colony count technique. International Organization for Standardization. Geneva, Switzerland.
- Norma ISO 11290-1:1998.** Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes*. Part 1: Detection method. International Organization for Standardization. Geneva, Switzerland.

- Norma ISO 11290-2:1998.** Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes*. Part 2: Enumeration method. International Organization for Standardization. Geneva, Switzerland.
- Norma ISO 16649-2:2001.** Microbiology. Horizontal method for the enumeration of β -glucuronidase-positive *Escherichia coli*. Part 2: Colony-count technique at 44°C using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-glucuronide. International Organization for Standardization. Geneva, Switzerland.
- Norma ISO 4833:2003.** Microbiology. Horizontal method for the enumeration of microorganisms. Colony-count technique at 30 °C. International Organization for Standardization. Geneva, Switzerland.
- Norma ISO 6579:2003.** Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp. International Organization for Standardization. Geneva, Switzerland.
- Norma ISO 22000:2005.** Sistema de Gestión de la Inocuidad de los Alimentos. International Organization for Standardization. Geneva, Switzerland.
- Norma UNE-EN ISO 6888-1:1999.** Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other species). Part. 1: Techique using Baird-Parker agar medium.
- Norma UNE-EN 13401:2000.** Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. Método horizontal para el recuento de *Clostridium perfringens*. Técnica de recuento de colonias. (basada en la ISO 7937; 1997 y modificada).
- Oboh, G. (2005).** Effect of blanching on the antioxidant properties of some tropical green leafy vegetables. *Lebensmittel-Wissenschaft und –Technologie*. 38:513-517.
- Oguchi, Y., Weerakkody, W.A.P., Tanaka, A., Nakazaka, S y Ando, T. (1996).** Varietal differences of quality-related compounds in leaves and petinols of spinachs grown at two locations. *Bulletin of the Hiroshima Prefectural Agricultural research Center*. 64: 1-9.
- Ordás, A. (2001).** Nabo. En *La horticultura española*. Sociedad Española de Ciencias Hortícolas (Eds.). Ediciones de Horticultura, S.L. Tarragona, España.

- Ordóñez Pereda, J. A., Cambero Rodríguez, M. J., Fernández Álvarez, L., García Sanz, M. L., García de Fernando Minguión, G. D., De la Hoz Perales, L. y Selgas Cortecero, M.D. (1998).** *Tecnología de los alimentos. Volumen I: componentes de los alimentos y procesos*. Ed. Síntesis, S. A. Madrid, España.
- Oyaizu, M. (1986).** Studies on products of browning reactions: Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Japanese Journal of Nutrition*. 44: 307-315.
- Parraud, X., Kermasha, S. y Bisakowski, B. (1999).** Characterization of a lipoxygenase extract from *Geotrichum andidum*. *Process Biochemistry*. 34: 819-827.
- Parrilla, J.A. (1991).** *El Grelo*. Ed. Concello de As Pontes. A Coruña, España.
- Petran, R.L., Zottola, E.A. y Gravani, R.B. (1988).** Incidente of *Listeria monocytogenes* in market samples of fresh and frozen vegetables. *Journal of Food Science*. 53: 1238.
- Ponne, C.T., Baysan, T. y Yuksel, D. (1994).** Blanching leafy vegetables with electromagnetic energy. *Journal of Food Science*. 59 (4):1037-1059.
- Powers, J.R., Costello, M.J. y Leung, H.K. (1984).** Peroxidase fractions from asparagus of varying heat stabilities. *Journal of Food Science*. 49: 1618-1619.
- Pulido, R., Bravo, L. y Saura-Calixto, F. (2000).** Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. *Journal of Agriculture Food and Chemistry*. 48: 3396-3402.
- Puupponen-Pimiä, R., Häkkinen, S. T., Aarni, M., Suortti, T., Lampi, A. M., Eurola, M., Piironen, V., Nuutila, A. M. y Oksman-Caldentey, K. M. (2003).** Blanching and long-term freezing affect various bioactive compounds of vegetables in different ways. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 83: 1389-1402.
- 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 con tratamiento térmico. BOE viernes 12 de Enero de 2001. No. 11, pág. 1435-1441.
- Real Decreto 140/2003**, de 7 de Febrero, por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano. BOE viernes 21 de Febrero 2003. No. 45, pág. 7228-7245.

- Reglamento (CE) N°. 852/2004**, del Parlamento Europeo y del Consejo, de 29 de Abril, relativo a la higiene de los productos alimenticios. DOUE 25 de Junio de 2004. No. 226, pág. 3-22.
- Rehman, Z.U., Islam, M. y Shah, W.H. (2003).** Effect of microwave and conventional cooking on insoluble dietary fibre components of vegetables. *Food Chemistry*. 80: 237-240.
- Reid, D. (1992).** Congelación. En *Procesado de hortalizas*. Arthey, D. y Dennis, C. (Eds). Ed. Acribia, S.A. Zaragoza, España.
- Rocha, A.M.C.N. y Morais, A.M.M.B. (2003).** Shelf life of minimally processed apples (cv. Jonagored) determined by colour changes. *Food Control*. 14: 13-20.
- Rocha, T., Lebert, A. y Marty-Audouin, C. (1993).** Effect of pre-treatments and drying conditions on drying rate and colour retention of basil. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*. 26: 456-463.
- Rodrigo, C., Rodrigo, M., Alvarruiz, A. y Frigola, A. (1997).** Inactivation and regeneration kinetics of horseradish peroxidase heated at high temperaturas. *Journal of Food Protection*. 60: 961-966.
- Rodríguez-Amaya, D.B. (1999).** A guide to carotenoid análisis in foods. ILSI, Washington, D.C.
- Rodríguez Iglesias, F. (1997).** *Galicia Antropología. Tomo XXIV: Tecnología agraria*. Ed. Hércules Ediciones, S.A., A Coruña, España.
- Rodríguez-Saona, L.E., Barreto, D.M. y Selivonchick, D.P. (1995).** Peroxidase and lipoxygenase influence on stability of polyunsaturated fatty acids in sweet corn (*Zea mays L.*) during frozen storage. *Journal of Food Science*. 60(5): 1041-1044.
- Rosa, E.A.S., Heancy, R.K., Fenwick, G.R. y Portas, C.A.M. (1997).** Glucosinolates in crop plants. *Horticultural Reviews* 19: 99-215.
- Rumm-Kreuter, D. y Demmel, I. (1990).** Comparison of vitamin losses in vegetables due to various cooking methods. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*. 36: S7-S15.
- Russell, L.F. (2000).** Quantitative determination of water-soluble vitamins. In *Food analysis by HPLC*. Nollet, L.M. (Ed.). Marcel Dekker, Inc., New York, USA.

- Rutledge, P. (1992).** Métodos de preparación. En *Procesado de hortalizas*. Arthey, D. y Dennis, C. (Eds). Ed. Acribia, S.A. Zaragoza, España.
- Sahlin, E., Savage, G.P. y Lister, C.E. (2004).** Investigation of the antioxidant properties of tomatoes after processing. *Journal of Food Composition and Analysis*. 17: 635-647.
- Sánchez-Machado, D.I., López-Cervantes, J., López-Hernández, J. y Paseiro-Losada, P. (2004).** Simultaneous determination of thiamine and riboflavin in edible marine seaweeds by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatographic Science*. 42(3): 117-120.
- Sánchez Pineda de las Infantas, T. (2004a).** Frutas y hortalizas procesadas en fresco. En *Procesos de conservación poscosecha de productos vegetales*. Ed. AMV ediciones. Madrid, España.
- Sánchez Pineda de las Infantas, T. (2004b).** El envasado de productos vegetales. En *Procesos de conservación poscosecha de productos vegetales*. Ed. AMV ediciones. Madrid, España.
- Sánchez Pineda de las Infantas, T. (2004c).** La congelación de frutas y hortalizas. En *Procesos de conservación poscosecha de productos vegetales*. Ed. AMV ediciones. Madrid, España.
- Saura-Calixto, F. y Goñi, I. (2006).** Antioxidant capacity of the spanish mediterranean diet. *Food Chemistry*. 94: 442-447.
- Schoefs, B. (2002).** Chlorophyll and carotenoid analysis in food products. Properties of the pigments and methods of analysis. *Trends in Food Science and Technology*. 13: 361-371.
- Schwartz, S.J. y Elbe V, J.H. (1983).** Kinetics of chlorophyll degradation to pyropheophytin in vegetables. *Journal of Food Science*. 48: 1303-1306.
- Schwartz, S.J. y Lorenzo, T.V. (1991).** Chlorophyll stability during continuous aseptic processing and storage. *Journal of Food Science*. 56 (4): 1059-1062.
- Selman, J.D. (1994).** Vitamin retention during blanching of vegetables. *Food chemistry*. 49: 137-147.
- Serrano Nicolás, A. (1997).** *Neumática*. 2ª. edición. Ed. Paraninfo. Madrid, España.

- Sheu, S.C. y Chen, A.O. (1991).** Lipoxygenase as blanching index for frozen vegetable soybeans. *Journal of Food Science*. 56(2): 448-451.
- Simal, J. Creus, J.M., Lage, M.A., López, J., Paseiro, P. y Huidrobo, J.F. 1983.** *Prácticas de bromatología*. Imprenta universitaria, Universidad Santiago de Compostela. Santiago de Compostela, España.
- Simonetti, P., Porrini, M. y Testolin, G. (1991).** Effect of environmental factors and storage on vitamin content of *Pisum sativum* and *Spinacia oleracea*. *Italian Journal of Food Science*. 3: 187-196.
- Simpson, K.L. y Tsou, S.C.S. (1986).** Vitamin A deficiency and its control- vitamin A and pro-vitamin A composition of foods. Academic Press, New York, pp. 461-478
- Sims, A. y Shoemaker, D. (1993).** Simultaneous liquid chromatographic determination of thiamine and riboflavin in selected food. *Journal of AOAC International*. 76(5): 1156-1160.
- Singleton, V.L. y Rossi, J.A. (1965).** Colorimetry of total phenolics and phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*. 16:144-158.
- Singleton, V.L., Orthofer, R. y Lamuela-Raventós, R.M. (1999).** Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*. 299: 152-178.
- Slinkard, K. y Singleton, V.L. (1977).** Total phenol analyses; automation and comparison with manual methods. *American Journal of Enology and Viticulture*. 28: 49-55.
- Smout, C., Banadda, N.E., Van Loey, A.M.L. y Hendriks, M.E.G. (2003).** Nonuniformity in lethality and quality in thermal process optimization: a case study on color degradation of green peas. *Journal of Food Science*. 68(2): 545-550.
- Suurmeijer, C.N.S.P., Perez-Gilabert, M., van der Hieden, H.T.W.M., Veldink, G.A. y Wliegenthart, J.F.G. (1998).** Purification, product characterization and kinetic properties of soluble tomato lipoxygenase. *Plant Physiology and Biochemistry*. 36: 657-673.
- Tamaro, D. (1968).** *Manual de horticultura*. Ed. Gustavo Gili, S.A. Barcelona, España.

- Tan, Y., Jiang, J., Wu, H., Cui, H. y Yu, R. (2000).** Resolution of kinetic system of simultaneous degradations of chlorophyll a and b by parafac. *Analytica Chimica Acta*. 412: 195–202.
- Teng, S.S. y Chen, B.H. (1999).** Formation of pyrochlorophylls and their derivatives in spinach leaves during heating. *Food Chemistry*. 65 (3): 367-373.
- Tenorio, M.D., Villanueva, M.J. y Sagardory, M. (2004).** Changes in carotenoids and chlorophylls in fresh green asparagus (*Asparagus officinalis*, L.) stored under modified atmosphere packaging. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 84: 357-365.
- Tian, M.S., Davies, L., Downs, C.G., Liu, X.F. y Lill, R.E. (1995).** Effect of floret maturity, cytokinin and ethylene on broccoli yellowing after harvest. *Postharvest Biology and Technology*. 6:29-40.
- Tian, M.S., Woolf, A.B., Bowen, J.H. y Ferguson, I.B. (1996).** Changes in color and chlorophyll fluorescence of broccoli florets following hot water treatment. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 121: 310-313.
- Tijsskens, L.M.M., Schijvens, E.P.H.M. y Biekman, E.S.A. (2001).** Modelling the change in colour of broccoli and green beans during blanching. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 2: 303–313.
- Toledo, M.E.A., Ueda, Y., Imahori, Y. y Ayaki, M. (2003).** L-ascorbic acid metabolism in spinach (*Spinacia oleracea* L.) during postharvest storage in light and dark. *Postharvest Biology and Technology*. 28: 47-57.
- Tucker, G.S. (2004).** Deterioro de los alimentos por el ataque de microorganismos. Métodos de conservación. En: *Manual del envasado de alimentos y bebidas*. Coles, R., McDowell, D. y Kirwan, M.J (Eds.). 1ª edición. Eds. AMV Ediciones y Mundi-Prensa. Madrid, España.
- Turkmen, N., Poyrazoglu, E.S., Sari, F. y Velioglu, Y.S. (2006).** Effects of cooking methods on chlorophylls, pheophytins and colour of selected green vegetables. *International Journal of Food Science and Technology*. 41: 281-288.
- Turkmen, N., Sari, F. y Velioglu, Y.S. (2005).** The effect of cooking methods on total phenolics and antioxidant activity of selected green vegetables. *Food Chemistry*. 93: 713-718.

- Valls, F., Checa, M.A., Fernández-Muiño, M.A. y Sancho, M.T. (1999a).** Determination of thiamin in cooked sausages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 47: 170-173.
- Valls, F., Sancho, M.T., Fernández-Muiño, M.A. y Checa, M.A. (1999b).** Determination of total riboflavin in cooked sausages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 47: 1067-1070.
- Varela M. G. y Moreiras T. O. (2004).** *Consumo de alimentos en Galicia: La dieta atlántica*. Ed. Fundación Española de la Nutrición. Madrid, España.
- Vidal-Valverde, C., Frias, J., Estrella, I., Gorospe, M.J., Ruiz, R. y Bacon, J. (1994).** Effect of processing on some antinutritive factors of lentils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 42: 2291-2295.
- Viña Baleato, J. (2004).** Diseño, construcción, aplicación e comparación de equipos para o escorrido de hortalizas de folia tras o escaldado e previo a conxelación. Proyecto Fin de Carrera en Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Universidad de Santiago de Compostela.
- Viña, S.Z. y Chaves, A.R. (2006).** Antioxidant responses in minimally processed celery during refrigerated storage. *Food Chemistry*. 94: 68-74.
- Wekesa, N.M.N., Chhabra, S.C. y Thairu, H.M. (2001).** L-ascorbic acid losses in Kenyan vegetables during cooking as determined by high performance liquid chromatography. *Bulletin of the Chemical Society of Ethiopia*. 15(1): 65-70.
- Williams, D.C., Lim, M.H., Chem, A.O., Pangborn, R.M. y Whitaker, J.R. (1986).** Blanching of vegetables for freezing –Which indicator enzyme to choose. *Food Technology*. 40(6): 130-140.
- Willikquette, B. (1985).** *Enciclopedia de la huerta familiar*. Ed. Ediciones-Distribuciones, S.A. Madrid, España.
- Wright, S.W., Jeffrey, S.W. y Mantoura, R.F.C. (1997).** Evaluation of methods and solvents for pigment extraction. In *Phytoplankton pigments in oceanography.- Monographs on oceanographic methodology 10*. Ed. UNESCO, Paris, Francia.
- Wu, Y., Perry, A.K. y Klein, B.P. (1992).** Vitamin C and β -carotene in fresh and frozen green beans and broccoli in a simulated system. *Journal of Food Quality*. 15: 87-96.

- Yadav, S.K. y Sehgal, S. (2003).** Effect of domestic processing and cooking on selected antinutrient contents of some green leafy vegetables. *Plant Foods for Human Nutrition*. 58(3): 1-11.
- Yamada, C., Iwasaki, Y. y Yoshida, K. (2003).** Effect of growth stage on contents of reducing sugar, ascorbic acid, oxalate and nitrate in spinach. *Journal of the Japanese Society for Nutrition Food Science*. 56: 167-173.
- Yang, J.H., Lin, H.C. y Mau, J.L. (2002).** Antioxidant properties of several commercial mushrooms. *Food Chemistry*. 77: 229-235.
- Yoshikawa, K., Inagaki, K., Terashita, T., Shishiyama, Kuo, S. y Shankel, D.M. (1996).** Antimutagenic activity of extracts from Japanese eggplant. *Mutation Research*. 371: 65-71.
- Yuste Pérez, P. (1997).** *Biblioteca de la agricultura*. Ed. Idea Books S.A. Barcelona, España.
- Zhang, D. y Hamauzu, Y. (2004).** Phenolics, ascorbic acid, carotenoids and antioxidant activity of brócoli and their changes during convencional and microwave cooking. *Food Chemistry*. 88(4): 503-509.
- Ziegler, R.G. (1989).** A review of epidemiologic evidence that carotenoids reduce the risk of cancer. *Journal of Nutrition*. 119: 116-122.
- Ziegler, R.G. (1991).** Vegetables, fruits, and carotenoids and the risk of cancer. *American Journal of Clinical Nutrition*. 53:251S-259S.
- Zyren, J., Elkins, E.R. Dudek, J.A. y Hagen, R.E. (1983).** Fiber contents of selected raw and processed vegetables, fruits and fruit juices as served. *Journal of Food Science* 48: 600-603.