UNIVERSIDAD DE MURCIA

FACULTAD DE VETERINARIA

Influencia de los Factores Pre y Postcosecha

en la Calidad de la Lechuga IV Gama

Dª. María Consuelo Luna Riquelme

2012

La autora de la presente Memoria ha disfrutado de una beca de “Formación de Personal Investigador (FPI)” del Ministerio de Educación y Ciencia.

La presente Tesis Doctoral ha sido realizada gracias a la financiación del proyecto CICYT (AGL2007-65056). “Identificación de factores pre y postcosecha implicados en el pardeamiento enzimático y escarola en IV Gama”.

Expreso mi más sincero agradecimiento a las empresas Primaflor S.A.T., Syngenta, Ruralcaja, Zseeds S.L., por el manejo del cultivo.

Las siguientes publicaciones recogen, en parte, los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral.

Publicaciones:

Gil, M.I., Tudela, J.A., Martínez-Sánchez, A., **Luna, M.C**., 2012. Harvest maturity indicators of leafy vegetables. Stewart Postharvest Review, 1:2, 1-9.

Martínez-Sánchez, A., **Luna, M.C.**, Selma, M.V., Tudela, J.A., Abad, J., Gil, M.I., 2012. Baby-leaf and multi-leaf of green and red lettuces are suitable raw materials for the fresh-cut industry. *Postharvest Biol. Technol.*, 63, 1-10.

Luna, M.C., Martínez-Sánchez, A., Selma, M.V., Tudela, J.A., Beltrán, D., Baixauli, C., Gil, M.I., 2012. Influence of nutrient solutions in open field soilless system on the quality characteristics and shelf life of the fresh-cut red and green lettuces (*Lactuca sativa* L.) in different seasons". *J. Sci. Food Agric*., en prensa.

Selma, M.V., **Luna, M.C**., Martínez-Sánchez, A., Tudela, J.A., Beltrán, D., Baixauli, C., Gil, M.I., 2012. Sensory quality, bioactive constituents and microbiological quality of green and red fresh-cut lettuces (*Lactuca sati*va L.) are influenced by soil and soilless agricultural production systems. *Postharvest Biol. Technol.*, 63, 16-24.

Luna, M.C., Tudela, J.A., Martínez-Sánchez, A., Allende, A., Marín, A., Gil, M.I., 2012. Long term deficit and excess of irrigation influences quality and browning related enzymes and phenolic metabolism of fresh-cut iceberg lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Postharvest Biol. Technol.*, 73, 37-45.

Luna, M.C., Tudela, J.A., Martínez-Sánchez, A., Allende, A., Gil, M.I., 2012. Deficit irrigation preserves microbiological quality and shelf life of fresh-cut romaine lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Postharvest Biol. Technol.*, 2012, en prensa.

Martínez-Sánchez, A., Tudela, J.A., **Luna, M.C.**, Allende, A., Gil, M.I., 2011. Low oxygen levels and light exposure affect quality of fresh-cut Romaine lettuce. *Postharvest Biol. Technol.*, 59, 34-42.

Luna, M.C., Martínez-Sánchez, Tudela, J.A., A., Allende, A., Marhuenda, A., Gabarrón C., Gil, M.I., 2011. La calidad de lechuga iceberg y romana en IV gama mejora con el déficit de riego. Horticultura. Julio.

Participaciones en congresos:

Tudela, J.A., Martínez-Sánchez, A., **Luna, M.C**., Gil, M.I., 2009. V "Ensaladas en cuarta gama: factores a considerar en su envasado". V Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Comunicación oral. Madrid.

Martínez Sánchez, A., **Luna, M.C**., Tudela, J.A., Vogelaere, L., Tiebergijn, L., Allende, A., Gil, M.I., 2010. "Deficit irrigation lettuce improves shelf-cut product". 28th International Horticultural Congress. Comunicación oral. Lisboa.

Luna, M.C., Martínez-Sánchez, A., Allende, A., Tudela, J.A., Gil M.I.,2010. "Quality of fresh-Cut iceberg and romaine lettuce is not affected by irrigation doses". Gordon Research Conference on Postharvest Physiology. Póster. Universidad de California. Davis.

Martínez-Sánchez, A., **Luna M.**C., Allende, A., Tudela, J.A., Gil, M.I., 2010. "Light exposure affects quality of fresh-cut lettuce during shelf life". Gordon Research Conference on Postharvest Physiology. Póster. Universidad de California. Davis.

Martínez-Sánchez, A., Allende, A., **Luna M. C**., Selma, M.V., Tudela, J.A., Gil, M.I., 2011. II International Conference on quality management of fresh-cut produce. "Impact of climate change and global trends on the microbial quality of leafy greens". Torino. Italia.

Luna, M.C., Tudela, J.A., Martínez-Sánchez, A., Allende, A., Gil, M.I., 2012. "El riego deficitario mejora el rendimiento y la calidad de la lechuga en IV Gama". XIII Congreso Nacional de las Ciencias Hortícolas Almería. Comunicación oral.

Luna, M.C., Tudela, J.A., Martínez-Sánchez, A., Allende, A., Gil, M.I., 2012."Influencia del riego antes de la recolección en la calidad de la lechuga para IV Gama". X Simposio Nacional y VII Ibérico Sobre Maduración y Postcosecha de Frutas y Hortalizas. Comunicación oral. Universidad de Lérida.

INFLUENCIA DE LOS FACTORES PRE Y POSTCOSECHA EN LA CALIDAD DE LA LECHUGA IV GAMA

Trabajo realizado para optar al Título de Doctor por la Universidad de Murcia

Dª. María Consuelo Luna Riquelme

2012

Abreviaturas

AA	Ácido L-ascórbico
Abs	Absorbancia
AC	Atmósfera controlada
ADHA	Ácido L-dehidroascórbico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADR	Aporte dietético recomendado
ANOVA	Análisis de la varianza
AT	Ácidez titulable
BORM	Boletín oficial de la Región de Murcia
Ca^{2+}	Ión calcio
CG	Cromatógrafo de gases
cm	Centímetro
CoA	Coenzima A
CO_2	Dióxido de carbono
DAD	Detector de diodo array
DFQ	3-(1,2-dihidroxietil)furol(3,4,-b)quinoxalina-1-ona
dS	Decisiemen
CE	Conductividad eléctrica
DD	Días-grados
EDD	efectividad de días-grados
EDTA	Acido etileno diamino tetracético
EI	Estándar interno
EM	Estado de madurez
ER	Equivalentes de retinol
FDA	Administración de drogas y alimentos (Food and Drugs Administration)
FR	Factor de respuesta
g	Gramo
h	Hora
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia
HPLC-DAD-MS	Cromatografía líquida de alta eficacia acoplada a un detector de red de diodos y a un detector de masas

HR	Humedad relativa
IFPA	Asociación Internacional de Productos Frescos Cortados
K^+	Ión potasio
Kg	Kilogramo
kPa	Kilopascal
kV	Kilovoltio
L	Litro
log ufc	Logaritmo de unidades formadoras de colonias
LSD	La menor diferencia significativa
m	Metro
MAP	Envasado en atmósfera modificada
MeOH	Metanol
min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MS	Detector de masas
mS	MiliSiemen
N	Nitrógeno
NA	No analizado
ND	No detectado
NH_4^+	Ión amonio
nm	nanómetro
NO_3^-	Ión nitrato
OMS	Organización Mundial de la Salud
OPDA	Dihidrocloruro de 1,2-fenilendiamina
P	Nivel de significancia
PEP	Fosfoenolpiruvato
PAL	Fenilalanina amonioliasa
PF	Peso fresco
pH	Potencial de hidrógeno
R	Radiación diaria total

RD	Real Decreto
ROS	Especies reactivas del oxígeno
s	Segundo
SST	Sólidos solubles totales
TLC	Cromatografía preparativa en capa fina
Tº	Temperatura
UI	Unidades internacionales
UV	Ultravioleta
var.	Variedad
m/z	Relación masa/carga
v/v	Relación volumen/volumen
p/v	Relación peso/volumen
µL	Micrólitro
µm	Micrómetro
%	porcentaje
% MS	Porcentaje materia seca
λ	Longitud de onda

Índice General

INDICE GENERAL

CAPITULO I: Introducción General **1**

1. La lechuga 2
   1.1 Origen
   1.2 Taxonomía
   1.3 Evolución
2. Cultivo 5
   2.1 Cultivo en suelo
   2.2 Cultivo sin suelo
3. Producción y consumo
4. Composición 13
   4.1 Compuestos fenólicos
   4.2 Vitamina C
   4.3 Cambios en los compuestos bioactivos
5. Enfermedades 26
   5.1 Enfermedades fisiopatológicas
6. Productos IV Gama 28
7. La lechuga en IV Gama 31
   7.1 Procesado en IV Gama
8. Fisiología y Tecnología de la lechuga en IV Gama 41
9. Principales causas de pérdida de calidad en lechuga IV Gama 46
   9.1 Pardeamiento enzimático
      9.1.1 Polifenoloxidasa
      9.1.2 Fenilalanina amoniolasa
      9.1.3 Peroxidasa
10. Métodos para inhibir el pardeamiento enzimático 57
   10.1 Métodos físicos
   10.2 Métodos químicos
11. Factores que afectan a la calidad de la lechuga IV Gama 59

11.1 Factores precosecha
11.1.1 Factores genéticos
11.1.2 Factores climáticos
11.1.3 Factores fisiológicos
11.1.4 Factores agronómicos
11.2 Factores postcosecha
11.2.1 Recolección, transporte y refrigeración
11.2.2 Cortado e higienización
11.2.3 Envasado y conservación
11.2.4 Ablandamiento
11.2.5 Podredumbres

CAPITULO II: OBJETIVOS 74

CAPÍTULO III: MATERIAL Y MÉTODOS 76

CAPÍTULO IV: INDICADORES DE MADUREZ EN HORTALIZAS DE HOJA 92

1. Resumen 93
2. Introducción 93
3. Indicadores de madurez en vegetales de hoja 94
4. Indicadores de madurez de hortalizas de hoja para la industria de IV Gama 104
5. Conclusión 109

CAPÍTULO V: LECHUGAS MINIHOJAS BABY Y MULTI VERDES Y ROJAS COMO MATERIA PRIMA PARA LA INDUSTRIA DE IV GAMA 110

1. Resumen 111
2. Introducción 112
3. Materiales y métodos 113

3.1 Plan material y condiciones de crecimiento
3.2 Procesado y conservación

3.3 Composición gaseosa en el espacio de cabeza
3.4 Evaluación sensorial
3.5 Extracción y análisis de vitamina C
3.6 Extracción y cuantificación de compuestos fenólicos
3.7 Análisis microbiológico
3.8 Análisis estadístico
4. Resultados 118
4.1 Características de calidad en minihojas, “baby” y “multi” y cabezas de lechugas de hojas verdes y rojas.
4.2 Cambios en la composición gaseosa del espacio de cabeza durante la conservación en producto mínimamente procesado en minihojas “baby”y “multi” y de caebzas de lechugas de hoja verde y roja
4.3 Cambios en la calidad sensorial durante la conservación en productos minimamente procesados en minihojas, “baby” y “multi” y cabezas de lechugas de hoja verde y roja.
4.4 Cambios en el contenido fitoquímico durante la conservación de producto mínimamente procesado de minihojas, “baby” y “multi” y cabezas de lechugas de hoja verde y roja.
4.5 Cambios en el recuento microbiológico durante la conservación de producto mínimamente procesado de minihojas, “baby” y “multi” y cabezas de lechugas de hoja verde y roja.
5. Discusión 130
6. Conclusión 133

CAPÍTULO VI: INFLUENCIA DE LAS SOLUCIONES NUTRITIVAS EN UN SISTEMA DE PRODUCCIÓN SIN SUELO EN CAMPO ABIERTO, EN LA CALIDAD Y VIDA ÚTIL DE LECHUGAS IV GAMA ROJAS Y VERDES EN DIFERENTES ESTACIONES 134

1. Resumen 135
2. Introducción 135
3. Material y métodos 136

3.1 Procesado, envasado y conservación
3.2 Composición gaseosa del espacio de cabeza
3.3 Evaluación sensorial
3.4 Extracción y cuantificación de vitamina C
3.5 Extracción y cuantificación de compuestos fenólicos
3.6 Análisis estadístico
4. Resultados 141
4.1 Características de calidad de la materia prima
4.2 Calidad y vida útil de lechuga IV Gama
5. Discusión 148
6. Conclusión 150

CAPÍTULO VII: INFLUENCIA DEL CULTIVO EN SUELO Y SIN SUELO EN LA CALIDAD SENSORIAL, CONSTITUYENTES BIOACTIVOS Y CALIDAD MICROBIOLOGICA DE LECHUGA VERDE 153

1. Resumen 153
2. Introducción 153
3. Material y métodos 155
3.1 Material vegetal
3.2 Condiciones de procesado, envasado, y conservación
4. Resultados 159
4.1 Características fisiológicas de los genotipos rojos y verdes de lechuga cultivados en sistemas de producción con suelo y sin suelo
4.2 Calidad y vida útil de lechugas rojas y verdes en IV Gama cultivadas en sistema en sistemas con suelo y sin suelo
4.2.1 Composición del espacio de cabeza
4.2.2 Análisis sensorial
4.2.3 Vitamina C
4.2.4 Cambios en el contenido fenólico
4.2.5 Cambios en la calidad microbiológica

5. Discusión 167
6. Conclusión 169

CAPÍTULO VIII: INFLUENCIA DEL EXCESO DE RIEGO DURANTE EL CULTIVO EN LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA RELACIONADA CON LA CALIDAD, PARDEAMIENTO Y METABOLISMO FENÓLICO DE LECHUGA ICEBERG IV GAMA 170

1. Resumen 171
2. Introducción 171
3. Material y Métodos 173
   3.1 Condiciones de cultivo
   3.2 Material vegetal
   3.3 Conductividad eléctrica, materia seca y textura
   3.4 Procesado y conservación
   3.5 Tasa respiratoria y composición gaseosa del espacio de cabeza
   3.6 Evaluación sensorial
   3.7 Actividad enzimática
   3.8 Extracción y cuantificación de compuestos fenólicos
   3.9 Análisis estadísticos
4. Resultados 178
   4.1 Características de calidad de la materia prima
   4.2 Calidad de la lechuga IV Gama
   4.3 Pardeamiento en el borde del corte
   4.4 Relación entre el pardeamiento y la actividad enzimática
   4.5 Compuestos fenólicos
5. Discusión 188
6. Conclusión 190

CAPÍTULO IX: OPTIMIZACIÓN DE LA GESTIÓN DEL AGUA PARA CONTROLAR LA TASA DE RESPIRACIÓN Y REDUCIR EL PARDEAMIENTO Y LA CARGA MICROBIANA DE LEC HUGA ROMANA EN IV GAMA 192

1. Resumen 193
2. Introducción 194
3. Materiales y métodos 195
3.1 Material vegetal
3.2 Conductividad eléctrica
3.3 Procesado y conservación
3.4 Tasa respiratoria y composición gaseosa del espacio de cabeza
3.5 Evaluación sensorial
3.6 Actividad respiratoria
3.7 Extracción y cuantificación de compuestos fenólicos
3.8 Análisis microbiológico
3.9 Anatomía del tejido de lechuga
3.10 Análisis estadístico
4. Resultados 203
4.1 Características de calidad de las cabezas de lechuga romana
4.2 Tasa respiratoria de lechuga romana IV Gama
4.3 Calidad sensorial de la lechuga IV Gama
4.4 Pardeamiento de la lechuga romana IV Gama
4.5 Calidad microbiológica de la lechuga romana IV Gama
5. Discusión 210
6. Conclusión 214

CAPÍTULO X: NIVELES BAJOS DE OXIGENO Y EXPOSICIÓN A LA LUZ AFECTAN A LA CALIDAD DE LA LECHUGA ROMANA EN IV GAMA 216

1. Resumen 217
2. Introducción 217
3. Material y métodos 219
3.1 Plan material
3.2 Condiciones de procesado, envasado y conservación
3.3 Análisis del espacio de cabeza
3.4 Medida de color

3.5 Pérdida de electrolitos
3.6 Microscopía electrónica de barrido
3.7 Extracción y cuantificación de vitamina C
3.8 Extracción y cuantificación de compuestos fenólicos
3.9 Análisis y estadístico
4. Resultados 223
4.1 Efecto de la baja concentración de O2 en la calidad sensorial
4.2 Efecto de las condiciones de luz en la tasa de respiración y la composición gaseosa del espacio de cabeza
4.3 Efecto de las condiciones lumínicas en la calidad sensorial
4.4 Efecto de las condiciones lumínicas en el color, salida de electrólitos a través de la membrana y textura
4.5 Efecto de las condiciones lumínicas en la pérdida de agua y apertura estomática
4.6 Efecto de las condiciones lumínicas en vitamina C y contenido fenólico
5. Discusión 233
6. Conclusiones 237

CAPÍTULO XI: CONCLUSIONES GENERALES 238

BIBLIOGRAFÍA 241

Índice de Figuras

y Tablas

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

CAPÍTULO I **1**

Figura 1.1. Principales países productores de lechuga

Figura 1.2. Evolución histórica de la superficie, producción y rendimiento en España

Figura 1.3. Principales ciudades españolas de producción de lechuga

Figura 1.4. Estructura del ácido cafeico

Figura 1.5. Derivados de ácido cinámico más comunes en la lechuga

Figura 1.6. Estructura de un ácido clorogénico, concretamente, ácido-5-cafeoil quínico

Figura 1.7. Estructura de flavonol (A), flavona (B) y antociano (C)

Figura 1.8. Estructura química de los flavonoles de lechuga

Figura 1.9. Elaboración porcentual en España de productos vegetales procesados en fresco

Figura 1.10. Volumen de mercado de la IV Gama

Figura 1.11. Esquema de la señal de daño en vegetales

Figura 1.12. Mecanismo de reacción de la actividad PPO

Figura 1.13. Reacciones de las quinonas con compuestos no fenólicos

Figura 1.14. Ruta del ácido Shikímico

Figura 1.15. Desaminación de L-fenilalanina catalizada por PAL

Figura 1.16. Actividad POD

Fotografía 1.1. Lechugas acogolladas. (A) Iceberg, (B) Batavia, (C) Trocadero

Fotografía 1.2. Lechuga tipo Romana

Fotografía 1.3. Lechuga Lollo rosso (D) y Hoja de roble (E)

Fotografía 1.4. Lechuga de tallo

Fotografía 1.5. Enfermedades comunes en lechuga

Tabla 1.1. Ciclos de cultivo en función del cultivo y la época

Tabla 1.2. Costes de cultivo por variedades

Tabla 1.3. Diferencias entre el cultivo en suelo y el hidropónico

Tabla 1.4. Evolución histórica de la superficie y producción española de lechuga romana y acogollada española

Tabla 1.5. Valor nutricional por tipos de lechuga (USDA)

Tabla 1.6. Clasificación de los compuestos fenólicos en plantas superiores

Tabla 1.7. Composición fenólica por variedades

Tabla 1.8. Especificaciones de la industria de IV Gama en lechuga

Tabla 1.9. Tasa respiratoria (ml CO_2 Kg^{-1} h^{-1}) de la lechuga mínimamente procesada

CAPÍTULO III

Fotografía 3.1. Cromatograma de compuestos fenólicos

Fotografía 3.2. Medida de actividad PPO

CAPÍTULO IV

Figura 4.1. Estados de madurez en lechuga tipo iceberg y tipo romana

Figura 4.2. En lechuga romana, relación entre la longitud del espigón y la longitud de la cabeza (A) y el peso de la cabeza (B)

Figura 4.3. Influencia del estado de madurez (EM) basado en la longitud del espigón ($[> 40\ y\ \leq 60\ mm\ EM\ 1], [> 60\ y\ \leq 80\ mm\ EM\ 2]$ y , $[> 80\ mm\ EM\ 3]$ sobre la calidad visual (A) pardeameinto del borde (B), malos olores (C) y textura (D) de lechuga

romana IV Gama conservada durante 3 días a 4ºC y el resto a 7ºC en atmósfera activa (MAP)

Figura 4.4. Grados de compacidad de lechuga iceberg

Tabla 4.1. Escala de firmeza en lechuga basada en la presión ejercida con los dedos

Tabla 4.2. Indicadores de madurez de hortalizas de hoja

Tabla 4.3. Índice de madurez de hortalizas de hoja para la industria de IV Gama

Tabla 4.4. Índice de madurez de hortalizas de hoja como materia prima para IV Gama

Tabla 4.5. Índice de madurez de “brotes” para IV Gama

CAPÍTULO V

Figura 5.1. Cambios en la composición gaseosa durante la conservación del producto procesado procedente de minihojas “baby” y “multi” y de cabezas de d variedades de lechuga verdes y rojas

Figura 5.2. Cambios en la calidad visual y en el pardeamiento del borde durante la conservación del producto procesado procedente de minihojas “baby” y “multi” y de cabezas de variedades de lechuga verdes y rojas

Figura 5.3. Cambios en el contenido de vitamina C durante la conservación del producto procesado procedente de minihojas “baby” y “multi” y de cabezas de variedades de lechuga verdes y rojas

Figura 5.4. Cambios en el contenido fenólico durante la conservación del producto procesado procedente de minihojas “baby” y “multi” y de cabezas de variedades de lechuga verdes y rojas

Figura 5.5. Cambios en el recuento de mesófilos, levaduras y hongos filamentosos durante la conservación del producto procesado procedente de minihojas “baby” y “multi” y de cabezas de variedades de lechuga verdes y rojas

Figura 5.6. Recuento de bacterias ácido lácticas y coliformes totales durante la conservación del producto procesado procedente de minihojas “baby” y “multi” y de cabezas de variedades de lechuga verdes y rojas

Tabla 5.1. Fechas de siembra, trasplante, recolección y ciclos de cultivo, horas de sol, radiación media y neta, temperatura media y lluvias durante el periodo de cultivo minihojas “baby” y “multi” y cabezas de variedades de lechuga verdes y rojas

Tabla 5.2. Longitud de hoja, contenido en materia seca y textura de lechugas minihojas “baby”, “multi” y cabezas de variedades de lechuga verdes y rojas

CAPÍTULO VI

Figura 6.1. Influencia de las soluciones nutritivas (baja, media y alta concentración iónica) sobre el peso fresco (A) y el índice de madurez (B) de lechugas lollo rosso, hoja de roble y trocadero cultivadas en verano e invierno

Figura 6.2. Influencia de las soluciones nutritivas (baja, media y alta concentración iónica) sobre el contenido en materia seca (A) y vitamina C (B) de lechugas lollo rosso, hoja de roble y trocadero cultivadas en verano e invierno

Figura 6.3. Influencia de las soluciones nutritivas (baja, media y alta concentración iónica) en los cambios en la presión parcial de O_2 y CO_2 (kPa) (A) y en los malos olores (B) de lechugas lollo rosso, hoja de roble y trocadero en IV Gama cultivadas en invierno y conservadas 3 días a 4 ºC y el resto a 7 ºC

Figura 6.4. Influencia de las soluciones nutritivas (baja, media y alta concentración iónica) en la calidad visual (A) y pardeamiento en el borde (B) de lechugas lollo rosso, hoja de roble y trocadero en IV Gama cultivadas en invierno y conservadas 3 días a 4 ºC y el resto a 7 ºC

Tabla 6.1. Características de las soluciones nutritivas

Tabla 6.2. Tabla ANOVA sobre la influencia de la solución nutritiva, del genotipo y de la estación de cultivo en el peso fresco, índice de madurez, contenido en materia seca y en vitamina C

Tabla 6.3. Influencia de las soluciones nutritivas (baja, media y alta concentración iónica) en el contenido fenólico individual y total de lechugas lollo rosso, hoja de roble y trocadero cultivadas en invierno

CAPÍTULO VII

Figura 7.1. Peso fresco (A), índice de madurez (B), textura (C) y contenido en materia seca (D) de lollo rosso, hoja de roble y trocadero cultivados en sistema sin suelo y con suelo. Las barras son la media de 25 cabezas en peso e índice de madurez, 25 réplicas para textura y 5 réplicas para el contenido en materia seca

Figura 7.2. Cambios en la presión parcial de O2 y CO2 (pO2 y pCO2) del espacio de cabeza en los envases de lechugas lollo rosso, hoja de roble y trocadero IV Gama cultivadas en distintos sistemas de producción, con suelo y sin suelo durante 4 días a 4 ºC y el resto a 7 ºC

Figura 7.3. Influencia de los sistemas de producción con suelo y sin suelo en la calidad visual y el pardeamiento de lechuga IV Gama lollo rosso, hoja de roble y trocadero conservada durante 4 días a 4 ºC y el resto a 7 ºC

Figura 7.4. Influencia de los sistemas de producción con suelo y sin suelo en el contenido en vitamina C medido como ácido ascórbico (AA) y ácido dehidroascórbico (ADHA) de lechuga IV Gama lollo rosso, hoja de roble y trocadero conservada durante 4 días a 4 ºC y el resto a 7 ºC

Figura 7.5. Influencia de los sistemas de producción con suelo y sin suelo sobre el contenido fenólico de lollo rosso, hoja de roble y trocadero tras el procesado en IV Gama

Figura 7.6. Influencia de los sistemas de producción con suelo y sin suelo en el recuento de mesófilos, levaduras y hongos filamentosos, bacterias ácido lácticas y coliformes totales de lechuga IV Gama lollo rosso, hoja de roble y trocadero conservada durante 4 días a 4 ºC y el resto a 7 ºC

Tabla 7.1. Composición del suelo y de la solución nutritiva del sistema sin suelo

CAPÍTULO VIII

Figura 8.1. Tratamientos de riego en 6 recolecciones, durante 3 años consecutivos. Basados en un tratamiento control según la capacidad de campo (CC), 2 dosis de exceso (+50% y +25%) y 2 dosis de déficit (-25% y -50%). Se establecieron 4 regímenes de riego al considerar la lluvia y la evapotranspiración del cultivo (ETc), como R1 (0-100), R2 (101-200), R3 (201-300) y R4 (301-400) mm

Figura 8.2. Influencia de los regímenes de agua R1 (0-100), R2 (101-200), R3 (201-300) y R4 (301-400) mm, sobre el peso de cabeza (A), la compacidad (B), la conductividad eléctrica del tejido (C) y el contenido en materia seca (D)

Figura 8.3. Influencia de los regímenes de agua R1 (0-100), R2 (101-200), R3 (201-300) y R4 (301-400) mm en la calidad visual (A) y los malos aromas (B) de la lechuga iceberg IV Gama conservada durante 13 días a 7 ºC

Figura 8.4. Influencia de los regímenes de agua R1 (0-100), R2 (101-200), R3 (201-300) y R4 (301-400) mm en la composición gaseosa, niveles de O2 (A) y de CO2 (B), en el espacio de cabeza del envase de lechuga iceberg IV Gama conservada durante 13 días a 7 ºC

Figura 8.5. Influencia de los regímenes de agua R1 (0-100), R2 (101-200), R3 (201-300) y R4 (301-400) mm sobre el pardeamiento del borde (A) y la actividad enzimática fenilalanina amonio-liasa PAL (B), en lechuga iceberg IV Gama conservada en aire a 7º C

Figura 8.6. Influencia de los regímenes de agua R1 (0-100), R2 (101-200), R3 (201-300) y R4 (301-400) mm en la actividad polifenol oxidasa (PPO) (A), % de PPO activa (B) y actividad peroxidasa (POD) (C) de tejido vascular de lechuga iceberg conservado en aire a 7º C

Figura 8.7. Influencia de los regímenes de agua R1 (0-100), R2 (101-200), R3 (201-300) y R4 (301-400) mm aportados sobre el contenido fenólico total en el tejido vascular de lechuga iceberg IV Gama conservado en aire a 7 º C

Tabla 8.1. Influencia de los regímenes de agua R1 (0-100), R2 (101-200), R3 (201-300) y R4 (301-400) mm en el contenido fenólico individual del tejido vascular de lechuga iceberg IV Gama a día 0 y tras 2 días conservado en aire a 7 ºC

CAPÍTULO IX

Figura 9.1. Los cinco tratamientos de riego, basados en la dosis de riego estándares, aplicados en 6 recolecciones durante 3 años consecutivos (A). Al considerar el riego y las lluvias, se establecieron 6 regímenes de riego (B)

Figura 9.2. Influencia de los regímenes de riego en el peso de cabeza (A), longitud del tallo (B), textura (C) y materia seca (D)

Figura 9.3. Influencia de los regímenes de riego en la tasa respiratoria de la lechuga romana IV Gama conservada a 7 ºC y con un 5 % de O_2

Figura 9.4. Influencia de los regímenes de riego en la calidad de la lechuga romana IV Gama conservada 3 días a 4 ºC y el resto a 7 ºC en atmósfera activa

Figura 9.5. Influencia de los regímenes de riego en el pardeamiento del borde (A), contenido fenólico (B), actividad fenilalanina amonio-liasa (PAL) (C) y polifenoloxidasa (POD) (D) del tejido vascular de lechuga romana en IV Gama conservado en aire a 7 ºC

Figura 9.6. Influencia de los regímenes de riego en la población de bacterias psicrotrofas (A), *Pseudomonas* spp. (B) y coliformes (C) de lechuga romana IV Gama después del procesado (día 0) y después de la conservación 3 días a 4 ºC y el resto a 7 ºC

Fotografía 9.1. Micrografías de hojas de lechuga romana sometidas a -35 % RC (A) y +75 % RC (B)

Tabla 9.1. Número de réplicas empleadas por parámetro y régimen de riego

Tabla 9.2. Influencia de los regímenes de riego (-35 % RC, -15 % RC, RC, +15 % RC, +35 % RC y +75 % RC) en la población de bacterias psicrotrofas, *Pseudomonas* spp. y coliformes totales de lechuga romana después de la recolección

CAPÍTULO X

Figura 10.1. Influencia de la pO_2 en malos olores, sabor y pardeamiento en lechuga conservada 10 d a 7 ºC

Figura 10.2. Cambios de la pO_2 y pCO_2 en el espacio de cabeza de lechuga romana mínimamente procesada conservada en luz (24 h), Oscuridad (24 h) y fotoperiodo (12 h de luz y 12 h de oscuridad) en la zona frontal de la estantería (fotoperiodo frontal) y trasera de la estantería (fotoperiodo trasero), 3 d a 4 ºC y el resto a 7 ºC

Figura 10.3. Efecto de las condiciones lumínicas en la calidad visual y pardeamiento del borde en lechuga mínimamente procesada conservada a 4 ºC 3d y el resto a 7 ºC. Bajo las condiciones lumínicas anteriores descritas

Figura 10.4. Efecto de las condiciones lumínicas en el color (ΔE^*) de lechuga romana en IV Gama, conservada a 4 ºC 3d y el resto a 7 ºC, bajo las condiciones lumínicas anteriormente descritas

Figura 10.5. Efecto de las condiciones lumínicas sobre la salida de electrolitos en romana mínimamente procesada, conservada 3 d a 4 ºC y el resto a 7 ºC, bajo las condiciones lumínicas anteriormente descritas

Figura 10.6. Efecto de las condiciones lumínicas en ácido ascórbico (AA +ADHA) electrolitos en romana mínimamente procesada, conservada 3 d a 4 ºC y el resto a 7 ºC, bajo las condiciones lumínicas anteriormente descritas

Figura 10.7. Efecto de las condiciones lumínicas en los compuestos fenólicos en romana mínimamente procesada, conservada 3 d a 4 ºC y el resto a 7 ºC, bajo las condiciones lumínicas anteriormente descritas

Tabla 10.1. Porcentaje de estomas abiertos y cerrados en lechuga romana en IV Gama conservada 3d a 4 ºC y el resto a 7 ºC bajo luz y oscuridad

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN GENERAL

1. LA LECHUGA

1.1. Origen

Las primeras indicaciones de la existencia de la lechuga datan aproximadamente del año 4.500 a.c. en grabados de tumbas egipcias, aunque se piensa que es originaria de la India (MARM, 2010). Son 3 las teorías sobre su origen (Ryder, 2007): 1) procede de una forma salvaje de *Lactuca sativa*, 2) procede de *Lactuca serriola* y 3) es el producto de una hibridación entre especies, la cual es la más apoyada por los botánicos.

La lechuga representaba la fecundidad de las cosechas de los egipcios. Los romanos ya conocían diferentes especies de lechuga e incluso desarrollaron una técnica de blanqueamiento. Ya entonces se le atribuyó propiedades contra el insomnio (Maroto, 2000). El principal uso de la lechuga era como forraje para el ganado y las semillas como fuente de aceite. En el siglo V d.C., China utilizaba lechugas de tallo para cocinar. Su cultivo se extendió por toda Europa y es probable que Colón la llevase a América (MARM, 2010).

1.2. Taxonomía

La lechuga es una planta anual y autógama, perteneciente a la familia Compositae, cuyo nombre botánico es *Lactuca sativa* L. Existe una gran variedad de tipos y cultivares. En general, las variedades de lechuga se pueden clasificar en grupos en función de cómo se organizan las hojas en estado maduro (si forman o no cogollo). Una clasificación adecuada según el MARM (2006) es la siguiente:

Lactuca sativa v. capitata

Cultivares acogollados. Durante su crecimiento se van ensanchando más que alargando, hasta formar cabezas compactas. A este tipo pertenecen las lechugas llamadas Iceberg cuyo primer cultivar se desarrolló en Estados Unidos en 1948, y las lechugas Batavia y Trocadero de origen europeo. La densidad y peso de estas últimas es menor que la de Iceberg (500 y 1000 g, respectivamente). A menudo, el nombre de Batavia va acompañado del color del cultivar rojo o verde, para su diferenciación.

(A) **(B)** **(C)**

Fotografía 1. Lechugas acogolladas. (A) Iceberg, (B) Batavia, (C) Trocadero.

Lactuca sativa v. longifolia

Son las conocidas como Romanas o Cos, las cuales proceden del este del Mediterráneo, cerca de Turkia. Son lechugas alargadas, acogollándose ligeramente en la fase final de la maduración. Presentan tonalidades variables de verde, desde verde oscuro en las hojas exteriores más maduras hasta amarillo en el interior. Su peso es en torno a 750 g.

Romana

Fotografía 2. Lechuga tipo Romana.

Lactuca sativa v. inybacea

Tienen forma de roseta, con hojas más cortas que las de Romana. Algunas lechugas de este tipo presentan hojas sueltas y dispersas como las conocidas Lollo o agrupadas, con el borde ondulado como la Hoja de Roble. Su textura es más dura que las anteriores, proceden de Europa aunque también hay cultivos en el Sur de América y algunas zonas de Estados Unidos.

(D) **(E)**

Fotografía 3. Lechuga Lollo rosso (D) y Hoja de roble (E).

Lactuca sativa v. augustana

Tiene hojas y tallos largos sin acogollarse. Son comunes en China y muy diferentes a las occidentales. Su sabor es amargo. Son cultivadas por sus hojas y su tallo sirve de alimento para el ganado.

Lechuga de tallo

Foto grafía 4. Lechuga de tallo.

1.3. Evolución

La primera publicación sobre lechuga se realizó en los años 20 del siglo pasado. En Estados Unidos, Jagger (1923) fue el primero que desarrolló cultivares resistentes adaptados a un clima estable y gracias al transporte se pudo llevar producto fresco por todo el país (Ryder, 2007). Esto supuso un cambio en las prácticas de cultivo, desapareciendo la producción de lechuga a pequeña escala, por el empleo de grandes superficies, con variedades más resistentes al transporte y a la conservación.

Fue en 1941 en Estados Unidos, cuando se realizó la primera gran producción de diferentes tipos de lechuga como la “Great Lake”, de tipo Iceberg . Sin embargo, en el zona del

Mediterráneo, el cultivo de Romana era el más común, comenzando en 1970 la plantación de Iceberg (Ryder, 2007).

2. CULTIVO

La lechuga es, en general, un cultivo de trasplante aunque en Estados Unidos también se realiza en siembra directa. Se comienza con la germinación, que transcurre en torno a 30 días en semillero hasta alcanzar 5 ó 6 hojas, para continuar con el trasplante en suelo. Los ciclos son de unos 100 días en función de la variedad y época del año (**Tabla 1**).

Tabla 1. Ciclos de cultivo en función del cultivo y la época.

	Iceberg	Trocadero	Romana	Batavia	Escarola	Hoja de roble	Lollo rosso y verde	Brote Batavia	Brotes de Lollo rosso
Ciclos de cultivo									
Verano	45-65	40-60	50-70	40-60	45-65	40-60	50-70	28-39	33-45
Invierno	56-105	55-88	60-110	55-105	55-110	55-88	65-115	28-67	30-69

Tabla 2. Costes de cultivo por variedades.

	Iceberg	Trocadero	Romana	Batavia	Escarola	Hoja de roble	Lollo rosso y verde	Brote Batavia	Brotes de Lollo rosso
Costes de cultivo (€/ha)	7000-11000	7000-7500	6000-11100	8100-8500	8400-12000	12000	8400-12000	10000-12000	6500-7000

La fecha de recolección se determina en función del destino, sobre todo por el estado de desarrollo de la parte aprovechable y por la compacidad del cogollo, en el caso de especies que lo formen. Además, la industria de IV Gama requiere lechugas de excelente calidad con gran tolerancia a las operaciones de procesado (Gil y col., 2012).

En España, el calendario de ciclo de cultivo cubre la producción todo el año. Las zonas de producción según la campaña son:

- Campaña de invierno: Almería, Córdoba y Murcia.
- Campaña de verano: Álava, Granada y Soria.
- Campaña de primavera/otoño: Albacete, Navarra y Zaragoza.

Para cada una de las variedades, las zonas de producción se seleccionan según los requerimientos edafoclimáticos necesarioa para el cultivo de lechuga.. El coste del cultivo de lechuga varía según el tipo, y se debe principalmente al uso de fertilizantes, fitosanitarios y agua (**Tabla 2**).

2.1. Cultivo en suelo

La adaptación de esta hortaliza a diferentes tipos de suelo es muy buena. Sin embargo, el mejor desarrollo se obtiene en suelos arenosos-limosos, con materia orgánica y buen drenaje, situando su pH óptimo de 6.7-7.4 (Infoagro, 2012). La lechuga está clasificada como una hortaliza medianamente tolerante a la salinidad. La humedad relativa (HR) más adecuada para el cultivo es del 60 al 80%. Sin embrago, según la estación del año, se recomienda distintos tipos de suelo, por ejemplo:

- En cultivos de primavera: suelos arenosos, pues se calientan más rápidamente y permiten cosechas más tempranas.
- En cultivos de otoño: suelos francos, ya que se enfrían más despacio que los suelos arenosos.
- En cultivos de verano: suelos ricos en materia orgánica, pues hay un mejor aprovechamiento de los recursos hídricos y el crecimiento de las plantas es más rápido.

2.2. Cultivo sin suelo

En el cultivo hidropónico (hidro=agua y ponos= trabajo), el suelo es sustituido por agua incorporando los nutrientes necesarios para el desarrollo del cultivo.

El uso de esta técnica para el cultivo de hortalizas dentro de invernadero ha aumentado considerablemente en los últimos 20 años. En lechuga, se recomiende el uso de cultivo hidropónico al aire libre porque en invernadero tanto la temperatura como la

HR pueden ser mayores que las deseadas (Infoagro, 2012). El uso de este sistema de producción permite asegurar un uso eficiente de agua y de nutrientes. En la **Tabla 3** se detallan las diferencias entre el cultivo en suelo y sin suelo.

Tabla 3. Diferencias entre el cultivo en suelo y el hidropónico.

Cultivo en Suelo	Cultivo sin suelo
Preparación del suelo	
Barbecho, rastreo, surcado. Gasto de herbicidas para el control de malas hierbas.	No existe preparación del suelo.
Esterilización del medio	
Vapor, fungicidas químicos, trabajo intensivo, proceso largo dos o tres semanas.	Vapor, fumigante químicos en menor proporción, más fácil la esterilización y tiempo más corto.
Enfermedades	
Gran número de enfermedades por contaminación del suelo (bacterias, nematodos e insectos), es necesaria la rotación de cultivos para evitar enfermedades.	Menor incidencia de enfermedades. No se precisa la rotación de cultivos, pero cuando hay una contaminación del medio de cultivo la afectación es mayor.
Agua	
Bajo rendimiento. Distribución no uniforme de la irrigación debido a la baja capacidad de retención del suelo, percolación y alta evapotranspiración.	No existe estrés hídrico, control total del agua de riego, reduce la pérdida de evapotranspiración y evita la percolación.
Nutrientes	
Mala absorción de nutrientes por una estructura o pH del terreno incorrecto. Hay pérdidas de fertilizantes por lavado. El efecto tóxico de un efecto de nutrientes puede durar meses.	Control total del aporte de nutrientes, uniforme en todas las plantas, facilidad para realizar ajustes.
Sustratos	
Suelo.	Agua, arena, serrín, lana de roca, perlita, NFT (Nutrient Film Technique) o flujo laminar.
Costes de Producción	
Preparación del suelo, mayor empleo de fertilizantes e higienizantes	Inversión inicial. Mayor rendimiento de fertilizantes, higienizantes y agua.

3. PRODUCCIÓN Y CONSUMO

Los principales países productores de lechuga en el mundo son China, Estados Unidos, Italia y España con una producción en toneladas de 13 005 000, 4 105 580, 843 344 y 809 200, respectivamente (FAO, 2010), aunque las últimas estimaciones de 2012 en MARM sugieren datos de 847 000 toneladas en España. La **Figura 1** muestra los principales países productores de la Unión Europea.

En cuanto a las exportaciones de lechuga, España ocupa el primer puesto a nivel mundial con 589 913 toneladas (MARM), ya que presenta unas condiciones agronómicas y climatológicas óptimas para su cultivo durante todo el año. Estas condiciones convierten al cultivo de lechuga en uno de los más importantes junto con el de tomate. Además, las mejoras en el manejo del cultivo y la selección de variedades de mayor producción ha incrementado el rendimiento de éste, ya que a pesar de que la superficie ha disminuido durante los últimos años, la producción se ha mantenido (**Figura 2**).

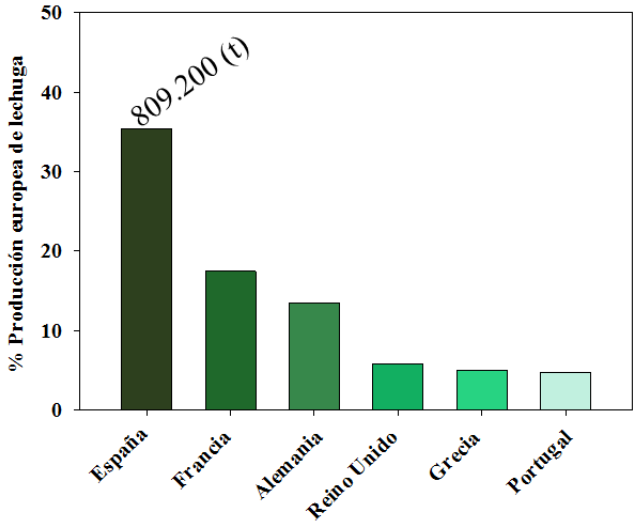


Figura 1. Principales países productores de lechuga en la Unión Europea (MARM, 2010).

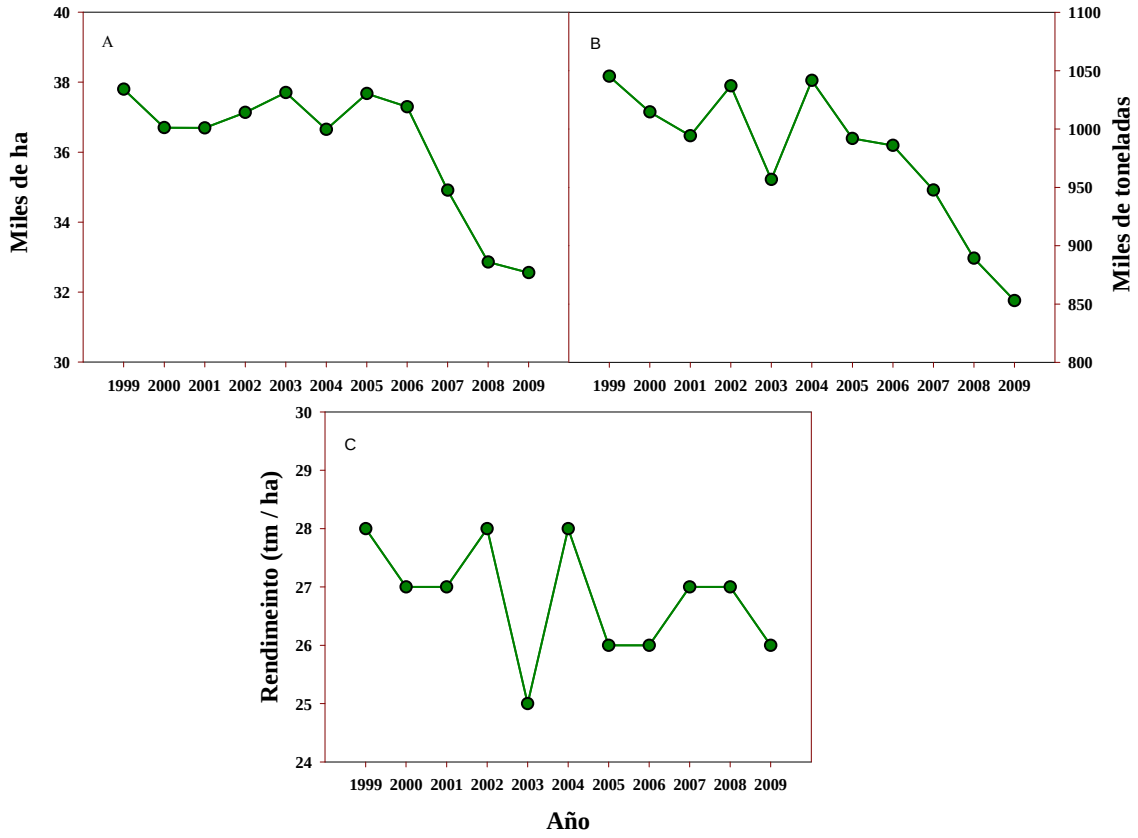


Figura 2. Evolución histórica de la superficie (A), producción (B) y rendimiento (C) de la lechuga cultivada en España.

El rendimiento ha sufrido altibajos como el observado en 2003, ocasionado probablemente por incidencias climatológicas que causaron pérdidas ese año.

La importancia del cultivo de lechuga en España ha ido aumentando progresivamente, debido tanto a la diversificación de los tipos varietales como al aumento de la IV Gama. Sin embargo, en los últimos años se observa un ligero estancamiento, debido al aumento que han experimentado otras hortalizas de hoja conocidas como minihojas. A pesar de ello, la mayor superficie de cultivo y producción corresponde a las lechugas acogolladas tipo Iceberg, aunque el rendimiento es ligeramente mayor en lechuga tipo Romana, posiblemente, por el mayor conocimiento del cultivo (**Tabla 4**).

Tabla 4. Evolución histórica de la superficie y producción española de lechuga romana y acogollada española (MARM, 2010).

Años	Lechuga romana		Lechuga iceberg	
	Superficie (miles ha)	Producción (miles t)	Superficie (miles ha)	Producción (miles t)
1999	12.4	347.7	25.4	697.5
2000	11.2	327.3	25.5	687.3
2001	11.2	332.0	25.5	662.1
2002	10.5	321.8	26.6	715.3
2003	10.7	313.7	27.0	731.0
2004	10.3	309.0	26.4	732.7
2005	11.3	318.8	26.4	673.1
2006	11.8	341.3	25.5	644.6
2007	9.9	306.0	25.0	641.6
2008	8.8	270.6	24.1	618.7
2009	9.0	267.6	23.5	585.4

Por comunidades Andalucía y Murcia presentan la mayor producción de lechuga, seguidas de la Comunidad Valenciana (**Figura 3**).

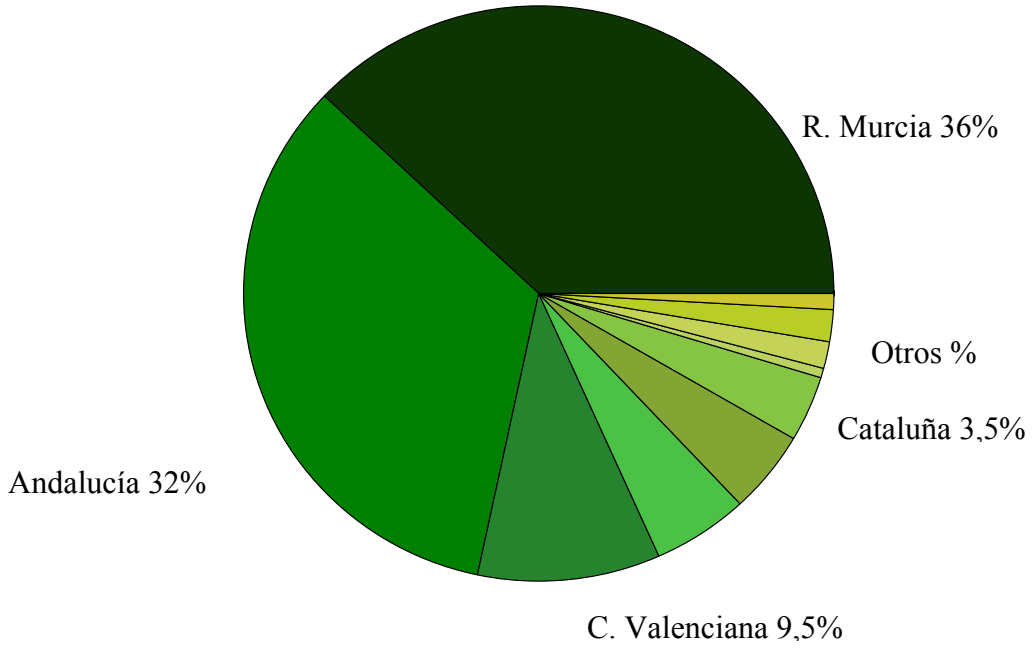


Figura 3. Principales ciudades españolas de producción de lechuga.

En la Región de Murcia, los municipios de Lorca, Águilas, Torre Pacheco y Campo de Cartagena son los que presentan una mayor superficie dedicada al cultivo de la lechuga.

Por otra parte, el consumo nacional de hortalizas ha aumentado un 4.3 % (222 000 t) en 2012 (MARM). El consumo más notable se asocia a los tomates (14.1 kilos por persona y año), lo que representa un 23.3 % del consumo total de hortalizas frescas, seguido de las cebollas (7.5 kg per cápita y 12.3 % del consumo total) y de las lechugas, escarolas y endivias (4.8 kg per cápita y 8 % de consumo total) (MARM, 2010). La venta de hortalizas en IV Gama en España alcanzó los 154 000 t en el 2010 (MARM), siendo el sector servicios el principal cliente.

El consumo medio per cápita de hortalizas en IV Gama es de 3.35 kg. Dentro del núcleo familiar, son las unipersonales las mayores consumidoras de este tipo de producto (9.62 kg). Por el contrario, en familias de más de 5 miembros no llegan a un consumo de 2 kg anuales (MARM).

4. COMPOSICIÓN

La contribución de la lechuga a la dieta humana es principalmente por el aporte de minerales, compuestos antioxidantes (fenoles, vitaminas, carotenos y clorofilas), fibra y agua. El contenido nutricional varía con el grado de color y la posición de la hoja en las cabezas (hojas externas e internas), siendo las hojas externas más ricas en nutrientes que las internas (Hohl et al., 2001). En la **Tabla 5** se muestran los valores nutricionales generales de los tipos de lechuga iceberg, trocadero, romana y hoja de roble. La lechuga se ha convertido en una fuente importante de compuestos antioxidantes, a pesar de su bajo contenido en ellos, debido a su alto consumo, sobre todo en lechugas pigmentadas "baby", conocidas también como "minihojas" (Tomás-Barberán et al., 1997).

En este sentido, las variedades de lechuga de hoja roja presentan mayor contenido fenólico y carotenos (DuPont et al., 2000; Ryder, 2007; Llorach y col., 2008).

Otros factores que afectan al contenido nutricional en lechuga son factores genéticos, prácticas de cultivo, procesado y condiciones de conservación, (DuPont et al., 2000; Lee y Kader, 2000).

Tabla 5. Valor nutricional por tipos de lechuga (USDA).

Nutrientes	Iceberg	Trocadero	Romana	Hoja de roble
Agua (%)	95.64	95.63	94.61	94.98
Energía (kcal)	14.00	13.00	17.00	15.00
Proteína (g)	0.90	1.35	1.23	1.36
Lípidos totales (g)	0.14	0.22	0.30	0.15
Carbohidratos (g)	2.97	2.23	3.29	2.87
Fibra (g)	1.20	1.10	2.10	1.30
Azúcar (g)	1.97	0.94	1.19	0.78
Calcio (mg)	18.00	35.00	33.00	36.00
Hierro (mg)	0.41	1.24	0.97	0.86
Magnesio (mg)	7.00	13.00	14.00	13.00
Fósforo (mg)	20.00	33.00	30.00	29.00
Potasio (mg)	141.00	238.00	247.00	194.00
Sodio (mg)	10.00	5.00	8.00	28.00
Zinc (mg)	0.15	0.20	0.23	0.18
Vitamina C (mg)	2.80	3.70	4.00	9.20
Tiamina (mg)	0.04	0.06	0.07	0.07
Riboflavina (mg)	0.02	0.06	0.07	0.08
Niacina (mg)	0.12	0.36	0.31	0.37
Folato (µg)	29.00	73.00	136.00	38.00
Vitamina A (UI)	502.00	3312.00	4094.00	7405.00
Vitamina E (mg)	0.18	0.18	0.13	0.22
Vitamina B-6 (UI)	0.04	0.08	0.07	0.09
Vitamina K (µg)	24.10	102.30	102.50	126.30
Ác. grasos saturados (g)	0.02	0.03	0.04	0.02
Ác. grasos monosaturados (g)	0.01	0.01	0.01	0.01
Ác. grasos polinsaturados (g)	0.07	0.12	0.16	0.08

4.1. Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos poseen la propiedad de captar radicales libres gracias a la interacción con los grupos hidroxilos. Por lo tanto, el grado de hidroxilación es importante para determinar la capacidad antioxidante (Rice-Evans et al., 1997, Parr y Bolwell, 2000).También tienen capacidad de formar puentes de hidrógeno, generando complejos extraordinariamente estables llegando incluso a precipitar como ocurre con los taninos.

Existen unas 8 000 estructuras fenólicas diferentes (Harbone, 1993), las cuales desempeñan un papel muy importante en la protección de la planta frente a patógenos y también como señal química en la floración. Se ha comprobado que actúan sobre el crecimiento de la planta modificando los niveles del ácido 3-indolacético (IAI) (Havsteen, 2000; Azcón-Bieto y Talón, 2008). La síntesis de los compuestos fenólicos tiene lugar en el citoplasma y se almacenan en la vacuola. Son biosintetizados enzimáticamente a través de la ruta del ácido shikímico (**Figura 14**). El principal precursor de la mayoría de los compuestos fenólicos es el aminoácido fenilalanina, sobre la que actúa la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL), dando lugar a los ácidos cinámicos que a su vez son hidroxilados por la enzima cinamato 4-hidroxilasa (C_4H). El ácido hidroxicinámico más sencillo es el ácido *p*-cumárico, el cual sufre hidroxilaciones, etilaciones etc. y da lugar a diferentes ácidos benzoicos, flavonoides, estilbenos y taninos. En la **Tabla 6** se muestran los principales compuestos fenólicos de las plantas superiores.

Tabla 6. Clasificación de los compuestos fenólicos en plantas superiores.

Flavonoides	No flavonoides
Antocianos	Ácidos hidroxicinámicos
Flavonoides	Taninos hidrolizables
Flavan-3-oles	Ácidos hidroxibenzoicos
Proantocianidinas (taninos no hidrolizables)	Estilbenos
Flavona	
Flavanonas	

Los polifenoles tienen también importancia desde un punto de vista económico, porque contribuyen al color, sabor y aroma de las frutas y hortalizas. En lechuga, los compuestos fenólicos juegan un papel importante en su apariencia visual. Los más importantes son ácidos fenólicos, flavonoles, flavonas y antocianos (**Tabla 7**), siendo estos últimos los pigmentos responsables de la coloración roja en las variedades pigmentadas. Estos compuestos juegan un papel muy importante en los procesos industriales, ya que son sustratos de las oxidaciones enzimáticas responsables del pardeamiento (Tomás-Barberán y Espín, 2001), disminuyendo la calidad visual de productos frescos.

Tabla 7a. Composición fenólica por tipo de lechuga (iceberg, trocadero, romana, batavia verde).

Variedades	Ácidos Fenólicos	Flavonoles	Flavonas	Antocianos
Iceberg	Ác.Cafeoyltartárico Ác. Clorogénico Ác. Cafeoylmálico Ác. Chicórico Ác. Meso-di-*O*-Cadeoiltartárico Ác. Isoclorogénico	Quercetín-3-*O*-glucurónido Quercetín-3-*O*-glucósido Quercetín-3-*O*-rutinósido Quercetín-3-*O*-(6”-*O*-malonyl)-glucosido	Luteolín-7-glucurónido	-
Trocadero	Ác. Cafeoyltartárico Ác. Clorogénico Ác. Cafeoylmálico Ác. Chicórico Ác. Meso-di-*O*-Cadeoiltartárico Ác. Isoclorogénico	Quercetín-3-*O*-glucurónido Quercetín-3-*O*-glucósido Quercetín-3-*O*-rutinósido Quercetín-3-*O*-(6”-*O*-malonyl)-glucosido	Luteolín-7-glucurónido	-
Romana	Ác. Cafeoyltartárico Ác. Clorogénico Ác. Cafeoylmálico Ác. Chicórico Ác. Meso-di-*O*-Cadeoiltartárico Ác. Isoclorogénico	Quercetín-3-*O*-glucurónido Quercetín-3-*O*-glucósido Quercetín-3-*O*-rutinósido Quercetín-3-*O*-(6”-*O*-malonyl)-glucosido	Luteolín-7-glucurónido	-
Batavia Verde	Ác. Cafeoyltartárico Ác. Clorogénico Ác. Cafeoylmálico Ác. Chicórico Ác. Meso-di-*O*-Cadeoiltartárico Ác. Isoclorogénico	Quercetín-3-*O*-glucurónido Quercetín-3-*O*-glucósido Quercetín-3-*O*-rutinósido Quercetín-3-*O*-(6”-*O*-malonyl)-glucosido	Luteolín-7-glucurónido	-

Fuente: DuPont et al., 2000, Tomás Barberán et al., 1997, Llorach et al., 2008.

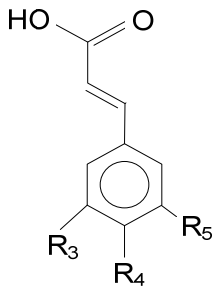
Tabla 7b. Composición fenólica por tipo de lechuga (escarola, hoja de roble roja, lollo roso).

Variedades	Ácidos Fenólicos	Flavonoles	Flavonas	Antocianos
Escarola	Ác. Cafeoyltartárico Ác. Clorogénico Ác. Cafeoylmálico Ác. Chicórico Ác. Meso-di-*O*-Cadeoiltartárico Ác. Isoclorogénico	Kaemferol-3-*O*-glucurónido Kaemferol-3-*O*-(6”-*O*-malonyl)-glucosido Kaemferol-3-*O*-glucósido Kaemferol-3-Ramnósido	-	-
Hoja de roble roja	Ác. Cafeoyltartárico Ác. Clorogénico Ác. Cafeoylmálico Ác. Chicórico Ác. Meso-di-*O*-Cadeoiltartárico Ác. Isoclorogénico	Quercetín-3-*O*-glucurónido Quercetín-3-*O*-glucósido Quercetín-3-*O*-rutinósido Quercetín-3-*O*-(6”-*O*-malonyl)-glucósido Quercetín-7-*O*-glucurónido-3-*O*-(6”-*O*-malonyl)-glucósido Quercetín-3-*O*-ramnósido	Luteolín-7-glucurónido	Cianidina-3-*O*-(6”-*O*-malonyl)-glucósido Cianidina-3-*O*-glucósido
Lollo rosso	Ác. Cafeoyltartárico Ác. Clorogénico Ác. Cafeoylmálico Ác. Chicórico Ác.Meso-di-*O*-Cadeoiltartárico Ác. Isoclorogénico	Quercetín-3-*O*-glucurónido Quercetín-3-*O*-glucósido Quercetín-3-*O*-rutinósido Quercetín-3-*O*-(6”-*O*-malonyl)-glucósido Quercetín-7-*O*-glucurónido-3-*O*-(6”-*O*-malonyl)-glucósido Quercetín-3-*O*-ramnósido Quercetín-3-galactósido	Luteolín-7-glucurónido	Cianidina-3-*O*-(6”-*O*-malonyl)-glucósido Cianidina-3-*O*-glucósido

Fuente: DuPont et al., 2000, Tomás Barberán et al., 1997, Llorach et al., 2008.

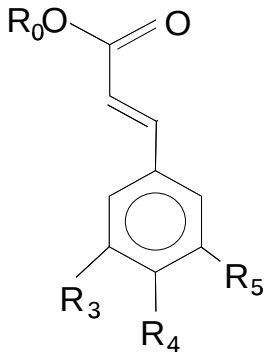
Ácidos fenólicos

Los ácidos cinámicos forman parte de los compuestos C_6-C_3, denominados fenilpropanoides, los cuales se diferencian en la sustitución de su anillo fenólico (Clifford, 2000). El más común en la lechuga es el ácido cafeico (**Figura 5**), que presenta un esqueleto carbonado básico tipo fenilpropanoide. En la lechuga los ácidos hidroxicinámicos se encuentran conjugados con otros ácidos principalmente con el ácido quínico (ácidos clorogénico y isoclorogénico), con el tartárico (ácido chicórico) y málico (**Figura 6**). El ácido clorogénico es el más abundante en la lechuga (**Figura 7**) (Llorach et al., 2008; Clifford, 2000; Tomás-Barberán et al., 1997).



	R_3	R_4	R_5
Ácido Cafeico	OH	OH	H

Figura 5. Estructura del ácido cafeico.



	R_0	R_3	R_4	R_5
Ácido clorogénico	quínico	OH	OH	H
Ácido cafeoiltartárico	tartárico	OH	OH	H
Ácido cafeoilmálico	málico	OH	OH	H

Figura 6. Derivados de ácido cinámico más comunes en la lechuga.

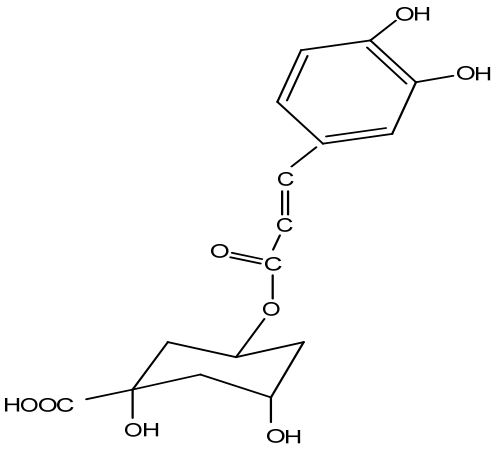


Figura 7. Estructura de un ácido clorogénico, concretamente, ácido-5-cafeoil quínico.

Flavonoides

Los flavonoides derivan estructuralmente del grupo básico flavona. Se clasifican en función del grado de oxidación del anillo central pirano. Al igual que los ácidos fenólicos, se encuentran conjugados con azúcares principalmente. Estudios actuales sugieren que el grado de hidroxilaciones es importante para determinar la actividad antioxidante (Dupont et al., 2000). Los flavonoides constituyen un grupo muy amplio incluyendo a los flavonoles, flavan 3-oles, flavonas, flavanonas y las antocianinas. Los alimentos están constituidos por 5 agliconas (mirecitina, quercetina, Kaempferol, luteína y cianidina. Sin embargo, en la lechuga encontramos principalmente flavonoles, flavonas y antocianos (**Figura 8**) conjugados con glucosa, ramnosa y ácido glucorónico. Los flavonoles más comunes son quercetina y kaempferol, sin embargo, sólo se conoce en lechuga las flavonas derivados de luteína y los antocianos derivados de la cianidina (Gil et al., 1998; Hohl et al., 2001; Llorach et al., 2008).

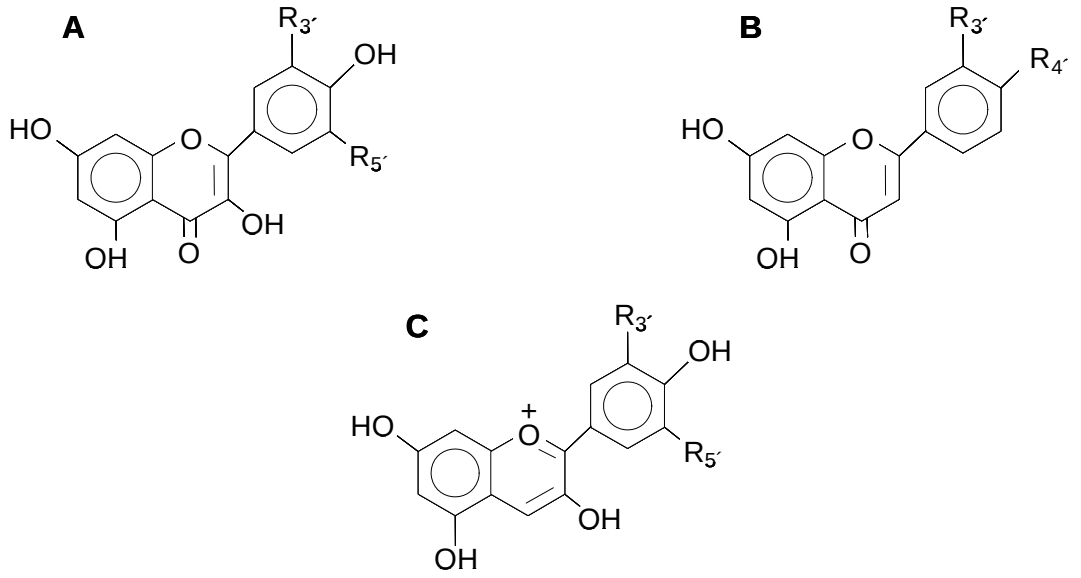
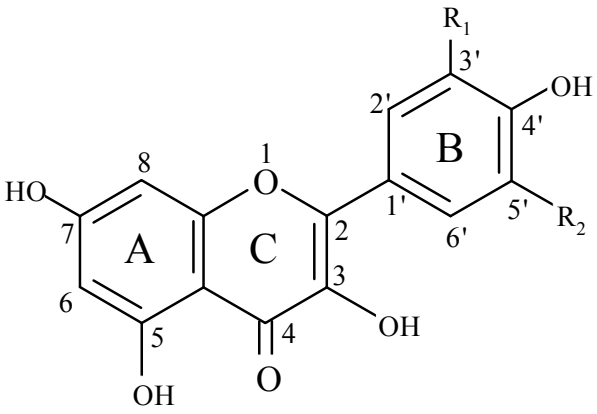


Figura 8. Estructura de flavonol (A), flavona (B) y antociano (C).



	R1	R2
Kaempferol	H	H
Quercetina	OH	H

Figura 9. Estructura química de los flavonoles de lechuga.

La quercetina es el flavonol mayoritario en la lechuga. Aunque se encuentra en las variedades verdes en pequeña proporción, es más abuntante en las variedades rojas (quercetina-3-O-glucósido, quercetina-rutinósido, quercetina- glucurónido). Sin embargo, el kaempferol se encuentra sólo en la escarola (kaempferol-3-O-glucuronido, kaempferol-3-O-(6-O-malonil) glucósido) (**Figura 9**).

La luteolina es una flavona que se encuentra en pequeña proporción en la lechuga. En romana e iceberg es prácticamente inexistente, pero en lechugas pigmentadas tipo lollo rosso es más frecuente encontrarla. Los conjugados principales

de luteolina en la lechuga son: luteolina-7-glucurónido, luteolina-7-glucósido, luteolina-7-rutinósido.

Por otra parte, el color de los antocianos está determinado por el número de grupos hidroxilo, el grado de metilación de estos grupos, la naturaleza y el número de azúcares unidos a la molécula, además del número y la naturaleza de los ácidos alifáticos unidos al azúcar (Clifford, 2000). El pH también influye en el color y da estabilidad a la molécula. A menor pH el color rojo es más intenso y el antociano es más estable (Brouillad, 1982). En la lechuga, los antocianos más comunes son: cianidin-3-*O*-(6-malonilglucósido) y cianidin-3-*O*-glucósido (Gil et al., 1998).

4.2. Vitamina C

En 1932 se conoció la estructura del ácido ascórbico (AA), denominado así por su acción antiescorbútica (Davey et al., 2000). El poder antioxidante de la vitamina C lo presenta tanto el AA como su producto de oxidación, denominado ácido dehidroascórbico (ADHA), cuya oxidación se encuentra catalizada por las enzimas ascorbato peroxidasa y ascorbato oxidasa. El AA puede ser fácilmente oxidado en presencia de oxígeno, metales pesados, pH alcalinos y altas temperaturas. El primer producto de oxidación del AA es el ácido monodehidroascorbato (MDHA), el cual puede producir de nuevo AA mediante agentes reductores o bien seguir oxidándose para formar ADHA, y éste a su vez degradarse en ácido 2,3-diceto-1-gulónico, el cual carece de actividad antioxidante (Davey et al., 2000; Lee y Kader, 2000).

Las principales funciones de la vitamina C son: actuar como cofactor enzimático, captador de radicales libres y donador o aceptor de electrones. El contenido en vitamina C en lechuga depende de las variedades analizadas, además de los factores precosecha y poscosecha (Lee y Kader, 2000). Muchos son los estudios que han observado, que las lechugas y espinacas conservadas bajo elevadas condiciones lumínicas presentan menor degradación de vitamina C que las conservadas en oscuridad (Toledo et al., 2003; Nicolle et al., 2004b; Zhan et al., 2012). Sin embargo, Martínez-Sanchez et al. (2011) no observaron diferencias entre el contenido en vitamina C en lechuga conservada en tres condiciones lumínicas diferentes (24 h/día en luz, 24 h/día en oscuridad y 12 h/día luz).

4.3 Cambios en los compuestos bioactivos

Estreses medioambientales como elevados déficit hídricos y nutricionales, daños mecánicos, salinidad extrema, alta exposición a la luz, pueden causar estrés oxidativo con la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS), tales como radicales superóxido ($O_2^{\cdot-}$), oxígeno singlete ($^1O_2$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radicales hidroxilo ($OH^{\cdot}$). Frente a estos estreses oxidativos, las plantas presentan antioxidantes como mecanismo de protección (Mittler, 2002). La vitamina C y los compuestos fenólicos son algunos de estos agentes no enzimáticos capaces de estabilizar los radicales libres debido a su función reductora. Cuando estos agentes reductores se saturan se produce la acumulación de ROS, ocasionando daños en las proteínas, peroxidación lipídica y muerte celular (Smirnoff y Wheeler, 2000). En el aumento de la concentración de estos compuestos antioxidantes están involucradas las enzima L-galactano-1,4-lactona (L-GalDH) y fenilalanina amonio-liasa (PAL) (Bergmüller et a., 2003). Oh et al., 2010 observaron mayor activación génica en L-GalDH y PAL, en muestras de lechuga sometidas a estrés hídrico, ocasionando mayor contenido en compuestos antioxidantes (fenólicos y ácido ascórbico) con respecto a las cultivadas en condiciones normales. Por el contrario, Oh et al., 2009 también observaron menor concentración de compuestos bioactivos en lechugas cultivadas bajo condiciones protegidas, debido a su peor adaptación a estreses ambientales frente a las lechugas cultivadas en condiciones normales. Otros autores han asociado la acumulación de estos compuestos con estreses más concretos como los hídricos, la alta radiación UV y las bajas temperaturas (Chappell y Hahlbrock, 1984, Sofo et al., 2005). Estos estudios señalan la importancia del metabolismo secundario de lechugas, en su adaptación a las condiciones atmosféricas.

Existen diferencias importantes en el contenido de compuestos bioactivos dependiendo de la variedad, como se ha explicado anteriormente. En estudios realizados en espinaca con 11 cultivares comerciales y 15 líneas avanzadas se observó que el genotipo tiene una gran influencia sobre el contenido en compuestos fenólicos y la actividad antioxidante (Howard et al., 2002). Las líneas más avanzadas, las cuales tenían mayor resistencia a plagas, presentaron mayor contenido en polifenoles, en flavonoides individuales y totales, así como mayor capacidad antioxidante comparadas con las líneas comerciales. En un estudio de diferentes especies de crucíferas de hoja para IV gama se observó que la rocket salvaje presentó un elevado contenido en

flavonoles derivados de quercetina, mientras que en rocket cultivada se detectó principalmente flavonoles derivados de kaempferol. Una proporción similar entre ambos flavonoles, tanto derivados de quercetina como derivados de kaempferol, se pudo observar en berro, mientras que en mizuna presentó una proporción similar tanto de ácido sinápico (en su forma libre), como de los diferentes derivados de flavonoles (quercetina, kamepferol e isorhamnetina). En términos cuantitativos, el berro mostró un mayor contenido en compuestos polifenólicos totales, respecto al resto de las especies de crucíferas estudiadas **(**Martínez-Sánchez et al., 2008**)**. Asimismo, el análisis del contenido en vitamina C en estas especies de crucíferas mostró que los mayores valores se presentaron en berro y rocket salvaje.

Por otra parte, la temperatura e intensidad de la luz tienen una gran influencia en el contenido en compuestos bioactivos. Howard et al., (2002) observaron un mayor contenido en polifenoles y mayor actividad antioxidante en espinacas cultivadas en primavera comparadas con otras cultivadas en otoño, debido a las diferencias en las condiciones medioambientales durante el cultivo.

La fecha de siembra y recolección parecen influir en la composición nutricional de las hortalizas de hoja. Diferentes recolecciones en meses consecutivos de estas especies han mostrado variaciones en el contenido en vitamina C. Las hojas recolectadas en los meses de invierno mostraron un mayor contenido en vitamina C**,** respecto a las recolectadas en primavera. Además, el contenido en compuestos bioactivos, glucosinolatos y polifenoles, presentes en hojas de rocket salvaje también mostró una posible relación con el mes de recolección. El contenido en glucosinolatos y sobre todo en polifenoles fue mayor en los meses de invierno. Estas diferencias, de hasta 7 veces, en el contenido en polifenoles dependiendo de la época de recolección han sido previamente descrita por Di Venere et al. (2000) en XXX. Además, Podsedeck (2007) también citó la influencia de las condiciones climáticas como un factor a tener en cuenta al repercutir en el contenido en polifenoles, así como en los niveles de otros compuestos bioactivos, en hortalizas *Brassica* como brócoli, coliflor blanca y china.

El riego y el abonado tienen un papel muy importante en la biosíntesis y acumulación de compuestos bioactivos, ya que han sido descritos como factores que afectan, sobre todo, al contenido en vitaminas y minerales. Chisari et al., (2010) observaron en lechuga baby una disminución de los compuestos fenólicos cuando crecieron en condiciones de baja salinidad. Igualmente, Kim et al., 2008 y Coria-

Cayupán et al., 2009 observaron en lechuga una disminución de los derivados del ácido cafeico al aplicar un riego salino a corto plazo, aunque no detectaron diferencias cuando aplicaron una concentración de sal más baja en el riego durante el cultivo. Otros estudios sugieren que la aplicación de estreses hídricos moderados podría aumentar la concentración de compuestos fenólicos y vitamina C en lechuga (Oh et al., 2010), además de otros compuestos antioxidantes como el β-caroteno y el α-tocoferol (Keles y Öncel, 2002).

Otro factor que puede influir en el contenido en compuestos antioxidantes es el estado de madurez. Se ha observado que las lechugas jóvenes presentan un mayor contenido fenólico que las adultas (Oh et al., 2010). Sin embargo, en espinaca, un estado de desarrollo intermedio presenta un mayor contenido en compuestos bioactivos frente a estados inmaduros o sobremaduros.

La influencia de las operaciones de procesado, cortado, lavado, envasado y conservación sobre el contenido en constituyentes bioactivos ha sido un tema de gran interés. Sin embargo, contrariamente a lo esperado, el procesado en IV gama tiene un mínimo impacto en la reducción del contenido en antioxidantes y en otros compuestos bioactivos tanto en frutas como en hortalizas. En general, el deterioro en la calidad visual tiene lugar con anterioridad a que se produzcan pérdidas significativas en el contenido nutricional. Así por ejemplo, uno de los puntos críticos del procesado de frutas y hortalizas es el lavado, y en concreto la selección de higienizantes efectivos que permiten controlar la carga microbiana, sin presentar efectos adversos en los constituyentes bioactivos del producto. Estos resultados quedaron de manifiesto en el lavado de lechuga en IV gama con agua ozonizada y/o en combinación con luz UV-C (Beltrán et al., 2005a). En lechuga y patata en IV gama se observó que el agua ozonizada, además de controlar la carga microbiana con la misma efectividad que el cloro, no afectó negativamente al contenido en constituyentes antioxidantes (polifenoles y vitamina C). Resultados similares se observaron cuando se evaluó la efectividad de agua ozonizada, clorito de sodio acidificado y ácido peroxiacético en hojas de rocket (Martínez-Sánchez et al., 2006).

Existen pocos estudios donde se haya examinado el efecto de la conservación bajo envasado en atmósfera modificada (MAP) sobre el contenido en compuestos

bioactivos de productos de IV gama. Sin embargo, una óptima atmósfera de conservación es una de las claves para mantener la calidad sensorial y nutricional, así como la seguridad microbiológica de los productos de IV gama. En estudios anteriores, Gil et al. (1999) observaron que el contenido en vitamina C de espinaca se preserva mejor en condiciones óptimas de conservación en MAP. Una atmósfera con un bajo nivel de O_2 y alto de CO_2, puede ayudar a mantener la seguridad microbiológica del producto vegetal, pero a veces este tipo de atmósfera puede llevar al deterioro del producto cuando las condiciones de conservación no son las óptimas. Martínez-Sánchez et al., 2007 observaron que niveles muy reducidos de O_2 (≤ 1 %) y muy elevados de CO_2 (≥ 15 %) favorecen el deterioro de la calidad sensorial y la pérdida de compuestos bioactivos de 'baby leaf rocket' (vitamina C, polifenoles y glucosinolatos).

5. ENFERMEDADES

Los síntomas de las enfermedades parasitarias más comunes en lechugas son:

- Crecimiento anormal debido a que las plantas sufren alteraciones radiculares: Provocado por contaminación por hongos, nematodos y virus (*Pythium tracheiphilum, Botrytyas cinérea* y *Pratylenchus sp*p., respectivamente). Ejemplo:

  - *Cuscuta* spp. (Dodder), es una planta parasitaria que impide el crecimiento de las hojas.

- Hojas agujereadas y recortadas: Provocado por bacterias como *Pseudomonas cichorii, Xanthomonas campestris* pv. *Vitians* y hongos. Ejemplo:

  - *Microdochium panattonianum* que provoca daños en las hojas externas (Shot hole ó Antracnosis).

- Manchas cloróticas, alteraciones necróticas y deformadas: Producido por el virus del mosaico de la lechuga y otros virus del mosaico transmitidos por insectos como el del pepino, del haba y del diente de león. También, pueden ser originadas por hongos y bacterias, presentando en los tejidos tiernos manchas que al principio son translúcidas y que posteriormente adquieren un tono marrón y necrosado, originado principalmente por Pseudomonas.

- Manchas blancas: Encontramos en este tipo varias afecciones. Ejemplo:

- Mildiu velloso (Bremia lactucae), se observa una pelusa blanca, originan manchas de color pardo y aparecen en situaciones de humedad extrema.
- Botritis (Botrytis cinerea, Sclerotinia sclerotiorum, Erwinia carotovora subsp.), producen un moho gris y un micelio blanco, se originan en situaciones de humedad continuada y por la existencia de heridas diversas.

- Nerviaciones gruesas (Bigvein): Originada por el virus *Mirafiori lettuce virus*. En esta patología se observan bandas anchas alrededor de las nerviaciones.

5.1. Enfermedades fisiopatológicas

También llamadas fisiopatías, siendo las más comunes las siguientes:

- *Tip burn*: Es una necrosis marginal que aparece sobre las hojas externas o sobre el cogollo debido a un aporte de agua y calcio deficitario, excesivo calor, salinidad y nitrógeno. Es una zona susceptible a podredumbres.

- *Brown stain*: Son lesiones marrones durante la conservación a bajas temperaturas causada por atmósferas altas en CO_2.
- *Pink rib*: Es la coloración rosada que toman los tejidos nerviarios. Ocurre con más frecuencia en lechugas de madurez avanzada.
- *Russet spotting*: Son manchas pardas que aparece durante la conservación como consecuencia de la exposición a etileno.
- *Espigado o subida de la flor*: Desarrollo excesivo del espigado, originado principalmente por anomalías genéticas, fotoperiodos largos, exceso de nitrógeno, elevadas temperaturas y sequía.
- *Daños por granizo*: Agujeros y necrosis en la zona de impacto ocasionado por pedrisco.
- *Daños por congelación*: A bajas temperaturas los tejidos tiernos se dañan con los cristales de hielo que se forman bajo la epidermis, provocando el despegue de la misma originando una coloración anaranjada.

Foto 5. Enfermedades comunes en lechuga. (Fuente: Dominique et al., 2005**).**

6. PRODUCTOS DE IV GAMA

Los productos de IV gama son frutas y/o hortalizas frescas, lavadas y envasadas que han podido ser objeto de troceado. El producto mantiene sus propiedades naturales y frescas en el envase, sin la incorporación de ningún aditivo ni conservante pero siempre conservado en refrigeración.

Los productos de IV gama aparecieron por primera vez a mediados de los años 70 en el mercado estadounidense. El objetivo era satisfacer las necesidades que requerían los restaurantes y establecimientos de comida rápida. El producto básico fue la lechuga, que en aquella época se le exigía al menos una vida comercial de entre 3 y 4 días. Las lechugas inmaduras o sobremaduras que rechazaban y quedaban en el campo tras la recolección de las mejores cabezas destinadas para I gama, eran recolectadas como materia prima para la industria de IV gama. Rápidamente, se observó la necesidad de partir de una materia prima de mejor calidad, con un estado adecuado de madurez para alargar la vida útil del producto procesado.

Hacia 1980 se inició el consumo de este tipo de productos en Europa. Suiza y Alemania fueron las pioneras, seguidas de Inglaterra, Francia, Países Bajos e Italia. Estos productos finalmente llegaron a España hacia finales de los años 80. Las primeras

industrias procesadoras comenzaron en Navarra y se extieron a otras zonas típicas de producción hortofrutícola como Murcia, Comunidad Valenciana, Andalucía y Cataluña. Estos productos son muy demandados por empresas de catering y restaurantes, tanto de comidas rápidas preparadas, como comedores de empresas, centros de enseñanza, hospitales y cuarteles.

El mercado de productos de IV gama resulta muy dinámico y poco a poco se ha ido introduciendo en todo el mercado español. Actualmente los productos de IV gama alcanzan más del 60 % de los hogares españoles con un consumo de 2,8 kg por persona y año. Sin embargo, en otros países europeos el consumo por habitante es de 4 a 10 veces superior. En el Reino Unido se consumen per cápita 12 kg y en Francia e Italia 6 y 4 kg, respectivamente. El incremento en la compra de productos de IV gama en España se debe al aumento del número de parejas adultas sin hijos y de adultos y jóvenes independientes, siendo este tipo de hogares los que muestran una mayor preocupación por su salud y por la dieta. Además, unos hábitos de vida donde prima la rapidez en la preparación de la comida, a causa de la falta de tiempo de los consumidores, contribuye a que el gasto en el consumo de frutas y hortalizas suponga un 13% del gasto total en alimentación. España, incrementándose año a año el porcentaje destinado a productos de IV gama, presentando un consumo actual en los hogares españoles del 18% (Alimarket, junio 2012): CONSEGUIR

La IV gama se perfila como uno de los negocios con más futuro en la industria alimentaria. El pasado año 2011, se registró un incremento de ventas de un 3 % a pesar de la crisis económica. En el primer semestre del año 2010 el incrementó fue del 6 % respecto al mismo período de 2009. Del total comercializado, 46 375 t correspondieron a hortalizas y 911 t a frutas, que aumentaron un 10 % respecto al período anterior (http://www.afhorla.com/noticias_ver.php?noticia=17). Según los datos del Comité de Frutas y Hortalizas Preparadas de Fepex, el sector creció un 5,1% en 2011, al superar las 74.000 toneladas comercializadas. De esta cifra, el 95% corresponde a la venta de hortalizas y el 5% a frutas.

De toda la información que se genera en este sector, se calcula que la producción actual española está orientada en un 60-65% a las lechugas de ensalada, un 10-15% a mezclas de lechugas y otras hortalizas para ensaladas (lombarda, zanahoria, etc.) y un 8-10% a espinaca (**Figura 10**). Le siguen, ya en porcentajes menores, la acelga, cebolla,

pimiento y puerro. Conviene destacar el gran aumento en el interés del consumidor por algunas hortalizas de pequeño tamaño y sabor intenso, que se suelen denominar “baby”, “brotes tiernos” o “minihojas”.

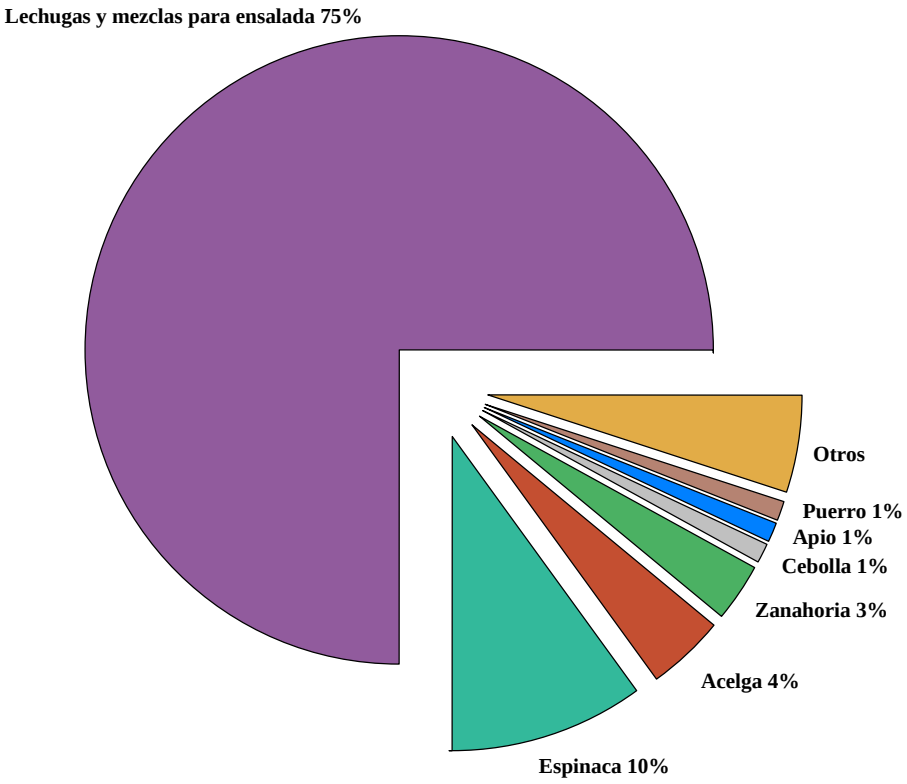


Figura 10: Elaboración porcentual en España de productos vegetales procesados en fresco. (Fuente: Productos Hortofrutícolas Mínimamente procesados. Autores: Artés, F. y Artés – Hernández, F).

Atendiendo a las cifras del sector IV gama y en lo que a principales fabricantes y comercializadoras de ensaladas y hortalizas nacionales se refiere, VEGA MAYOR, S.L. es el líder con un volumen de ventas superior a 31.603 t y una cuota de mercado del 31% bajo la marca FLORETTE. En segunda posición se encuentra el Grupo VERDIFRESH que comercializa alrededor de 26.812 t, con una cuota de mercado del 26%, bajo las marcas VERDIFRESH y MESTURADOS CANARIOS, que es interproveedor para Mercadona. En tercera posición se encuentra KERNEL con 10.300 t con las marcas KERNEL, LUMINOSA y RICA RICA seguido por PRIMAFLOR S.A.

que comercializa algo más de 9.800 t bajo la marca PRIMAFLOR y SOGESOL con 8.300 t (marcas FREDECA, GIGANTE VERDE).

El **gráfico 11** adjunto muestra los porcentajes de cuota de mercado según el volumen de producción de las principales empresas de IV gama:

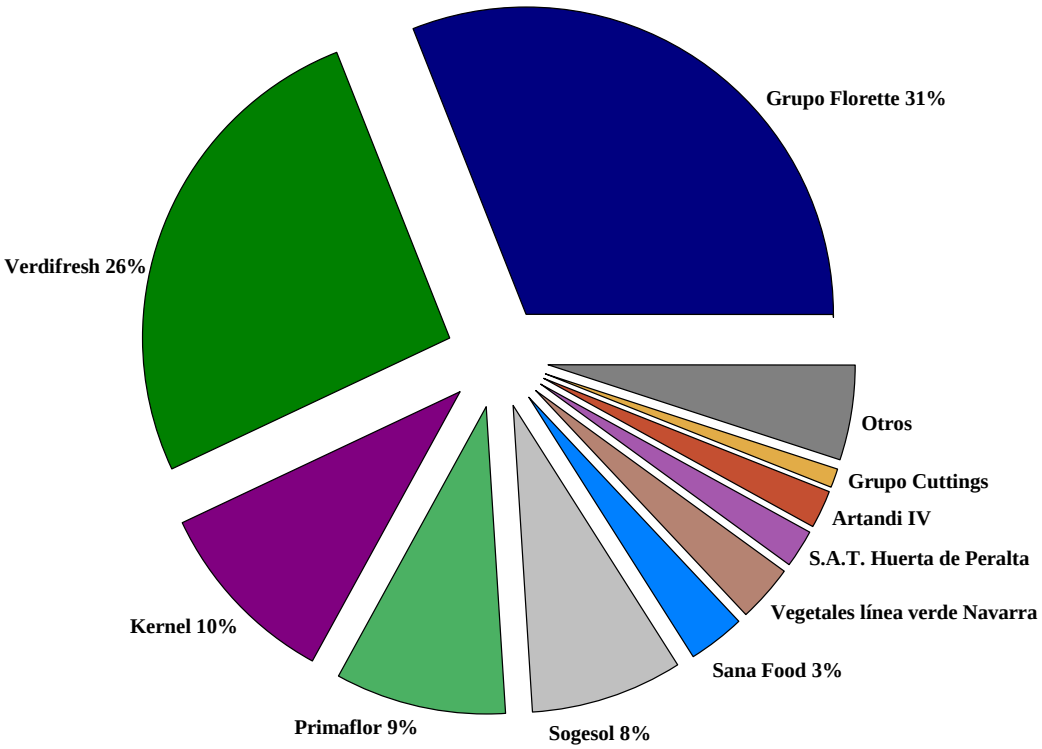


Figura 11. Volumen de mercado de la IV Gama (Fuente: ALIMARKET, 2012).

7. LA LECHUGA EN IV GAMA

Los datos de producción de lechuga en España señalan a la Región de Murcia y Andalucía, como las Comunidades de mayor producción, seguidas de la Comunidad Valenciana (**Figura 3**). Sin embargo, por cultivos Andalucía y Valencia son las mayores productoras de lechuga Romana, frente al 80% que representa el cultivo de Iceberg en la Región de Murcia y Anadalucía con respecto al total nacional. Además,

Murcia se ha especializado en el cultivo de lechugas tipo “baby” debido al aumento en el consumo de estos nuevos ingredientes, los cuales proporcionan a las ensaladas de una mayor gama de colores y sabores. Los principales tipos de lechuga empleados en IV gama son: Iceberg, Romana, Batavia, Trocadero, Lollo Rosso, Lollo Biondo y Hoja de Roble.

7.1. PROCESADO DE IV GAMA

El procesado mínimo comprende distintas operaciones unitarias que, de forma general, se pueden resumir en las siguientes operaciones: selección del cultivar y del estado de madurez óptimo, deshojado, cortado, lavado y secado. Posteriormente, envasado en bolsas con atmósfera modificada para, posteriormente, ser transportados y conservados bajo refrigeración (Wiley, 1994; Gorris y Peppelenbos, 1999). Cada una de las operaciones necesarias para la preparación de estos productos en IV gama debe realizarse correctamente para conseguir un producto final satisfactorio desde el punto de vista de calidad y seguridad durante la vida útil.

A continuación se detallan cada una de las etapas que se siguen en las líneas de procesado de lechuga en IV gama.

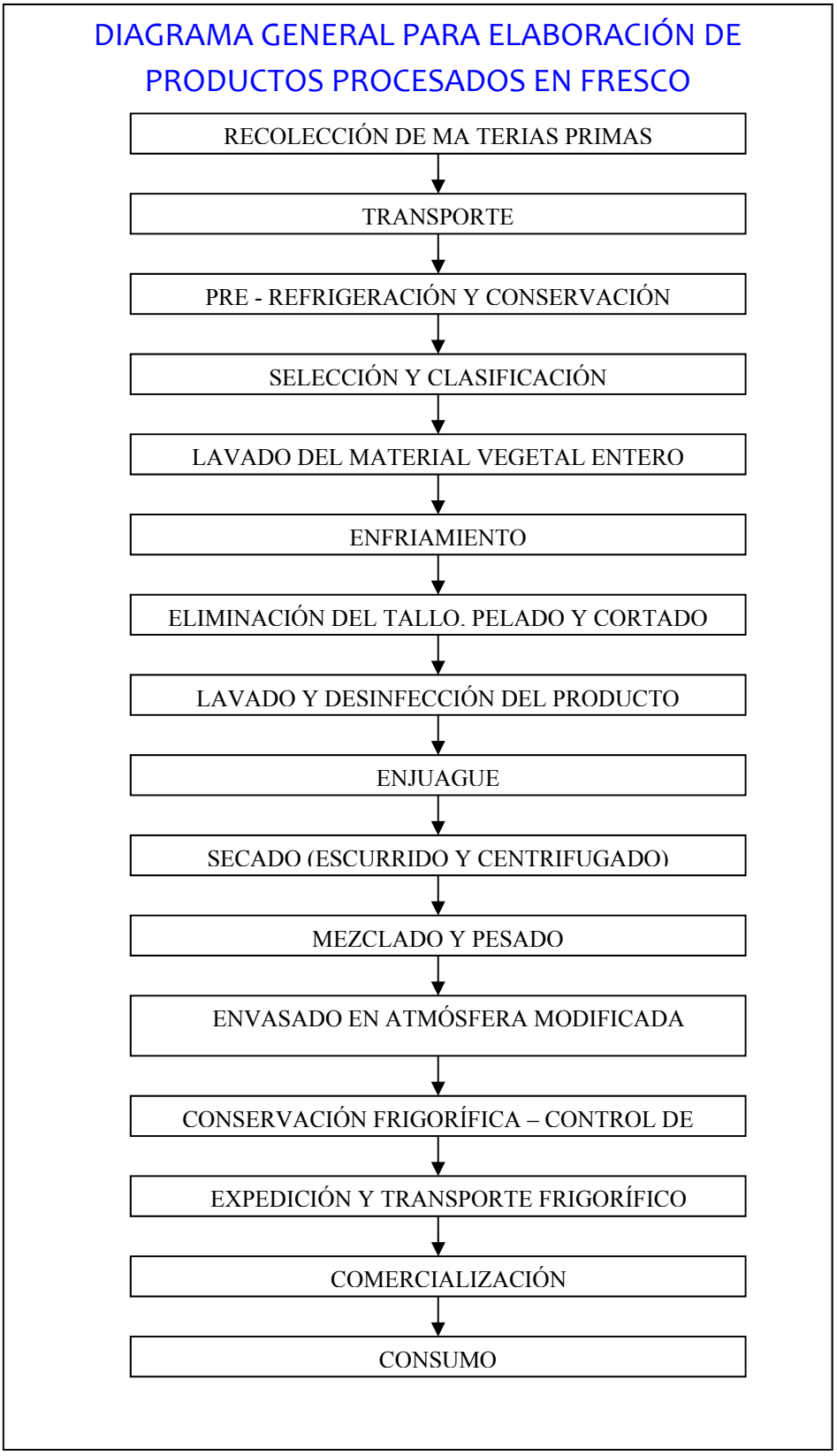


DIAGRAMA GENERAL PARA ELABORACIÓN DE PRODUCTOS PROCESADOS EN FRESCO
RECOLECCIÓN DE MA TERIAS PRIMAS
TRANSPORTE
PRE - REFRIGERACIÓN Y CONSERVACIÓN
SELECCIÓN Y CLASIFICACIÓN
LAVADO DEL MATERIAL VEGETAL ENTERO
ENFRIAMIENTO
ELIMINACIÓN DEL TALLO. PELADO Y CORTADO
LAVADO Y DESINFECCIÓN DEL PRODUCTO
ENJUAGUE
SECADO (ESCURRIDO Y CENTRIFUGADO)
MEZCLADO Y PESADO
ENVASADO EN ATMÓSFERA MODIFICADA
CONSERVACIÓN FRIGORÍFICA – CONTROL DE
EXPEDICIÓN Y TRANSPORTE FRIGORÍFICO
COMERCIALIZACIÓN
CONSUMO

Recolección de materias primas

La recolección puede hacerse de forma manual aunque también han sido desarrollados distintos equipos para realizarse de forma mecanizada. Como tractores provistos de remolques que acompañan en su desplazamiento a la cuadrilla, permitiendo cargar directamente el producto recolectado o bien cintas transportadoras. Es recomendable que para IV gama se emplee siempre el sistema que menos daño cause al producto como es la recolección a mano. El empacado de las lechugas en el campo permite obtener mayores rendimientos debido a que se reduce el daño mecánico.

La lechuga recolectada para IV Gama debe de cumplir las especificaciones recogidas en la **Tabla 8**. Por lo tanto, los productos que llegan a la industria para ser procesados, deben ser inspeccionados para asegurar que estén libres de daños (rozamientos, daños por frío, etc) y que cumplen las especificaciones acordadas con el proveedor. Una vez aceptado el material, deberá almacenarse cuanto antes, a una temperatura apropiada.

Tabla 8a. Especificaciones de la industria de IV Gama en lechuga (iceberg, trocadero, romana, batavia).

PRODUCTO					
		Iceberg	**Trocadero**	**Romana**	**Batavia**
Descripción	General	Cabezas bien formadas, hojas lisas, no rizadas. Sin daños físicos, plagas, enfermedades o fisiopatías. Ausencia de contaminantes, microbiológicos, químicos y físicos. En escarola las piezas serán cónicas, no achatadas.			
	Textura	Crujiente y firme, pero no duras, hojas frescas e hidratadas y suficientemente robustas para soportar el lavado industrial.			
	Sabor y aroma	Típico, ligeramente dulce, no amargo y sin olores extraños.			
	Color	Interno desde un amarillo suave a un verde claro.		El corazón debe se amarillo pálido, las hojas exteriores blancas/verdes claras en la base, con una gradación progresiva hasta verde oscuro en los extremos.	
Parámetros críticos		Exceso de humedad y barro. Producto demasiado viejo, contaminación química o física por cuerpos extraños. Restos de substratos del cultivo			
Defectos de calidad	D. Mayores	- Gusanos, limacos, tijeretas, babosas, etc. (Independientemente del número por cabeza). - Pulgón, araña roja, insectos (> de 5 por cabeza) - Tip-burn (3 ó más zonas dañadas). - Oxidación interior y exterior. - Agua en el interior.			
	D. Menores	- Pulgón, araña roja, insectos (< de 5 por cabeza). - Daños por parásitos o defecaciones en hojas exteriores). - Tallo mayor de 50 mm. - Daños por frío/heladas en 3 hojas exteriores. - Oxidación exterior. - Calibres/pesos inferiores al estándar. - Hojas interiores rizadas.			

Tabla 8b. Especificaciones de la industria de IV Gama en lechuga (hoja de roble, lollo rosso y verde, brote batavia y brote lollo rosso).

PRODUCTO					
		Hoja de roble	**Lollo rosso y verde**	**Brote Batavia**	**Brote Lollo rosso**
Descripción	General	Cabezas típicas. Ausencia de contaminantes microbiológicos, químicos y físicos.			
	Textura	Crujiente y firme, pero no duras, hojas frescas e hidratadas y suficientemente robustas para soportar el lavado industrial		Fresca, tersa, sin hidratación o marchitamiento. Suficientemente robustas para soportar el lavado industrial	
	Sabor y aroma	Típico sin olores extraños.			
	Color	La base de las hojas tendrá un color verde claro y rojo el otro extremo	La base de las hojas tendrá un color verde claro y rojo oscuro el otro extremo	Al menos ¾ partes de la parte superior de la hoja de color rojo de distinta intensidad según variedades y épocas del año en la Batavia roja y el resto verde vivo.	
Parámetros críticos		Exceso de humedad y barro. Producto demasiado viejo, contaminación química o física por cuerpos extraños. Restos de substratos del cultivo. Daños por frío/heladas. Textura no suficientemente robusta como para soportar el lavado industrial.			
Defectos de calidad	D. Mayores	- Gusanos, limacos, tijeretas, babosas, etc. (Independientemente del número por cabeza). - Pulgón, araña roja, insectos (> de 5 por cabeza) - Tip-burn interior. - Necrosis interiores. - Podredumbres interiores. - Daños por frío.			
	D. Menores	- Parásitos exteriores. - Podredumbres, necrosis marginales y daños por parásitos. Tamaño fuera del estándar.			

Transporte

Inmediatamente tras la recolección, se ha de realizar el transporte hacia la industria para evitar que el producto pueda contaminarse y que las temperaturas no adecuadas lo deterioren. Es muy importante sean transportados en vehículos acondicionados para esta labor, en condiciones higiénicas que impidan posibles contaminaciones microbiológicas y evitando además, movimientos bruscos y golpes. Nunca se debe transportar con frutas en proceso de maduración. Si la distancia a la industria es larga se ha de emplear un transporte refrigerado que mantenga la humedad relativa al 98% (Ryder, 2007). Las buenas prácticas de producción (ALFHORLA, 2006) recomiendan para un tiempo de transporte superior a 6 horas, una temperatura inferior igual o inferior a 10ºC.

Pre-refrigeración y Conservación frigorífica

La primera operación tecnológica que se realiza una vez que llegan los productos a la planta de procesado o bien en el mismo campo de cultivo es la pre - refrigeración o pre-enfriamiento, que debe realizarse inmediatamente tras la recolección para eliminar el calor de campo. El objetivo, es la obtención de un producto final de calidad, ya que permite ralentizar los procesos metabólicos como la tasa respiratoria y el desarrollo y multiplicación de microorganismos alterantes. El pre-enfriamiento se puede hacer con agua, aire forzado o mediante vacío, para reducir en muy poco tiempo la temperatura de llegada hasta los 5ºC. La hidrorefrigeración es el uso de agua fría con agua de buena calidad, para el uso de este tipo de enfriamiento los envases deben estar abiertos por la parte superior e inferior, de lo contrario el enfriamiento no es uniforme y se necesitan periodos muy largos de enfriamiento. El empleo de aire forzado, se basa en el movimiento de aire frío a través de los orificios de las cajas. Finalmente el enfriamiento con vacío promueve la evaporación del agua agregada a la superficie de los productos, para evitar la pérdida de agua se humedece el producto antes de entrar al enfriamiento. El ciclo de enfriamiento en vacío es uno de los más cortos, para obtener una temperatura de 2ºC en lechuga el tiempo requerido es de 20 minutos.

Durante el tiempo de conservación frigorífica, es muy importante, no almacenar juntos, productos que por su naturaleza son incompatibles, tal es el caso de los plátanos con las lechugas.

Deshojado y Cortado

Se efectúa normalmente a mano en la zona sucia designada especialmente para esa labor, eliminando la parte no comestible de las hojas externas. Se recomienda usar siempre cuchillos muy afilados que deben higienizarse con frecuencia mediante la inmersión en una solución desinfectante. Una de las ventajas del deshojado manual, es la posibilidad de descartar cualquier cabeza que presente alguna alteración.

El producto ya seleccionado se conduce por una línea trasportadora hacia las cortadoras mecánicas, dotadas de unas aspas afiladas de acero inoxidable, que girando a gran velocidad cortan las cabezas en distintos cortes, según lo deseado. Es muy importante que el corte sea rápido, cuidadoso y limpio ya que la pérdida de los fluidos celulares, podría causar una pérdida de vitaminas y favorecer el ataque microbiano.

Lavado y Desinfección

Uno de los factores clave en la preparación de vegetales en IV gama es el lavado y enfriado inmediato después del corte. El lavado es una de las etapas más críticas en el procesado ya que está íntimamente relacionado con la seguridad y vida útil del producto. El principal objetivo del lavado es eliminar los restos de suciedad y reducir la carga microbiana presente en la superficie del tejido. Asimismo, esta etapa sirve para enfriar el material vegetal y eliminar los exudados que se producen tras el corte y que pueden favorecer el crecimiento microbiano. Estos alimentos de IV gama no sufren ningún tratamiento térmico que destruya los agentes patógenos a pesar de ser susceptibles de contaminación por bacterias y virus principalmente, durante su cultivo y etapas de elaboración.

Además de la seguridad, el lavado tiene importantes implicaciones económicas y medioambientales, principalmente por el gran volumen de agua que es necesario emplear para asegurar que la calidad sea la adecuada para el uso a la que se destina. Sin embargo, la recirculación del agua incrementa el riesgo potencial de contaminación por microorganismos patógenos como consecuencia de la contaminación del agua de lavado a partir de un producto contaminado. Una de las formas de reducir el consumo de agua sin comprometer la seguridad de estos productos es mediante la desinfección de la misma con el empleo de un agente higienizante adecuado.

Durante los últimos 30 años, numerosos estudios han constatado la gran eficacia del cloro para la desinfección del agua de lavado. El empleo de agua clorada en la etapa

de lavado es ampliamente conocido en toda la industria de IV gama ya que desinfecta el agua de proceso eliminando y previniendo la proliferación de microorganismos. Sin cloro, probablemente no existirían los productos de IV gama. Casi un 80% de la industria de IV gama usa cloro en forma de cloro gas, hipoclorito sódico o dióxido de cloro en el agua de lavado por ser uno de los desinfectantes más efectivos. Sin embargo, en la mayoría de los casos, no se conocen los aspectos más importantes relacionados con la química del cloro como son el control del pH, el cloro libre y el potencial redox. Por ello, muchas industrias hacen un uso incorrecto del cloro, utilizando dosis muy elevadas, sin conseguir la máxima efectividad. La actividad antimicrobiana del cloro depende de la cantidad de cloro libre, del pH, de la cantidad de materia orgánica y en menor medida de la temperatura. La materia orgánica procedente de suciedad, de restos vegetales y de exudados, así como también la materia inorgánica presente en el agua, van a requerir una demanda de cloro que se debe satisfacer para que quede cloro libre disponible para eliminar microrganismos. El cloro no producirá ningún efecto beneficioso si el agua de lavado no se mantiene relativamente libre de materia orgánica ya que a mayor contenido en materia orgánica, es necesaria una mayor concentración de cloro. El cloro en presencia de materia orgánica la oxida dando lugar a los llamados "productos de reacción o subproductos". Para mantener la acción del desinfectante resulta imprescindible una renovación periódica del agua además del filtrado. Para el control del proceso de desinfección es necesario ajustar la dosis al tipo de proceso y producto manteniendo 1-3 mg L^{-1} de cloro libre y el pH entre 6,5-7,0.

Secado

La eliminación de agua se hace fundamentalmente mediante centrifugación. El tiempo y la velocidad son muy importantes y deben ajustarse para cada tipo de lechuga. Una centrifugación excesiva en tipos de lechuga muy frágiles como la Trocadero o Mantecosa puede producir daños en el tejido con pérdida de exudado y ablandamiento después del envasado. En estos tipos más delicados, una alternativa a la centrifugación es la eliminación de agua mediante un túnel de aire forzado, que remueve el agua para que la superficie de la lechuga esté seca.

Mezclado y Pesado

Si procede, se realiza seguidamente la mezcla de los distintos ingredientes que componen el producto, como ocurre en el caso de algunas ensaladas. Existe maquinaria de llenado y pesado para productos delicados que facilita y agiliza estas labores con excelente precisión. La forma más segura y rápida son las pesadas controladas por ordenador. Esta tecnología es muy cara pero de gran utilidad en producciones de gran volumen. Con ella se controla que cada envase contenga la cantidad de producto fijada.

Envasado en atmósfera modificada activa o pasiva

Dentro de todo el conjunto de procesos que abarca la elaboración de lechuga en IV gama, el envasado es la piedra angular. El principal objetivo del envasado en atmósfera modificada (MAP) es prolongar la vida útil mediante la reducción en la tasa de respiración y actividades metabólicas del producto que alberga en su interior. El equilibrio de gases en el MAP se alcanza cuando la tasa de respiración del producto se iguala a la permeabilidad de la película plástica. En el caso de la lechuga Iceberg y Romana, un diseño óptimo del envasado requiere una película con un excelente termosellado, una adecuada tasa de transmisión al O_2 (OTR) y una elevada relación entre las tasas de transmisión al CO_2 (CO_2TR) y al O_2.

Este tipo de envasado, a temperaturas de refrigeración, genera una atmósfera con baja concentración de O_2 y alta de CO_2, como consecuencia de la respiración, que intercambia a través del polímero plástico con la atmósfera fuera del envase hasta alcanzar el equilibrio cuando no hay intercambio de gases. Estos niveles reducidos de O_2 disminuyen progresivamente la velocidad de respiración sin llegar a producir anaerobiosis (Baldwin, 1995) además de evitar la pérdida de humedad por la transpiración y prolongar la fase de latencia de los microorganismos.

El envasado en atmósfera modificada en un envase permeable a los gases puede ser de dos tipos:

- *Envasado en atmósfera pasiva*: En el que por la propia respiración producto se origina una reducción de la concentración de O_2 y un aumento en el CO_2 en el interior del envase hasta que se alcance un adecuado estado de equilibrio.
- *Envasado en atmósfera activa*: En el que se sustituye el aire del envase por una mezcla preseleccionada de gases CO_2, O_2 y N_2, seguido de un rápido sellado.

Puede incluir además el uso de absorbedores para eliminar CO_2, O_2 y etileno e incluso agentes antimicrobianos como el hexanal.

La combinación correcta de la película plástica, el peso del producto y la composición de la atmósfera en el interior de la bolsa son esenciales y deben de conocerse para cada producto si se quiere mantener la calidad y alargar la vida útil.

Para determinar la composición de la atmósfera modificada más adecuada hay que tener en cuenta básicamente dos factores:

1. Tasa de respiración del producto (RR): este valor va a depender de diversos factores como la variedad, las condiciones de pre- y post-cosecha (prácticas agrícolas, condiciones climáticas, manejo de post-cosecha, procesamiento, etc.), estado de madurez y la temperatura de conservación.
2. Características del film: tasa de transmisión al O_2, al CO_2 y al vapor de H_2O, y la relación entre de transferencia CO_2TR/OTR.

8. FISIOLOGÍA Y TECNOLOGÍA DE LA LECHUGA EN IV GAMA

La lechuga en IV gama, como todos los productos frescos cortados son más perecederos que los productos intactos de los que proceden siendo, en general, su vida útil entre 7 y 10 días. Las modificaciones de calidad más importantes que sufren se deben a la presencia de superficies cortadas y tejidos vegetales dañados, a que dicho proceso no puede asegurar la esterilización o la estabilidad microbiológica del producto y a que, su metabolismo sigue estando activo (Orsat et al., 2001??). Así, las reacciones de degradación que se producen afectan a las características organolépticas tales como el color, firmeza, aroma y sabor, aumentando la susceptibilidad de perder la calidad higiénico-sanitaria.

Una actividad respiratoria alta, significa un metabolismo rápido y una velocidad de deterioro elevada. También supone una pérdida más rápida de azúcares y otros constituyentes que determinan la calidad organoléptica y nutricional (Rolle y Chism, 1987). Los productos mínimamente procesados tienen generalmente una actividad respiratoria mayor que los productos intactos (**Tabla 9**); por ello es necesario modificar la atmósfera del envase donde se encuentran, generalmente reduciendo los niveles de O_2 para frenar la actividad respiratoria y alargar la vida útil. Este sistema es conocido como

envasado en atmósferas modificada (Modified Atmosphere Packaging MAP). El empleo de estas atmósferas en un suplemento a la refrigeración. Además, el empaquetado reduce la pérdida de agua de las superficies cortadas en lechuga, evitando la deshidratación.

El cortado en lechuga estimula a las enzimas involucradas en el metabolismo fenólico, las cuales conducen al desarrollo indeseable de pardeamiento. Las atmósferas comercial O_2 (<0,5%) y CO_2 (>7%) evitan el desarrollo de compuestos pardos, pero originan un cambio en la respiración aeróbia a respiración anaeróbia, incrementando las concentraciones de acetaldehído y etanol y está correlacionado con el desarrollo de malos olores.

2.5 °C	**5 °C**	**7.5 °C**	**10 °C**
Aire	Aire	Aire	Aire
6-7.5	**8-14**	**12-17**	**16-21**

Tabla 9. Tasa respiratoria (ml CO_2 Kg^{-1} h^{-1}) de la lechuga mínimamente procesada. (Fuente, Gorny)

El procesado en fresco de frutas y hortalizas debe llevarse a cabo de acuerdo con los códigos de buenas prácticas de fabricación (BPF). El diseño de las instalaciones y de los procesos de elaboración debe basarse en rigurosos conocimientos técnicos y en la legislación específica, asegurando además la calidad de la industria mediante la implantación de sistemas de Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (APPCC) y opcionalmente alguna de las normas del grupo ISO 9000. En España, los fabricantes de productos de IV gama que pertenecen a AFHORLA (Asociación Española de Frutas y Hortalizas lavadas, listas para su empleo), aprobaron en 2006 un protocolo de calidad para sus productos “Buenas Practicas de Fabricación” que es de obligado cumplimiento para todos los socios y para las empresas que en el futuro se incorporen a esta asociación. Dicho protocolo incluye requisitos que afectan tanto a las materias primas, como a los procesos productivos y a las instalaciones.

Conservación frigorífica – Control de calidad

El mantenimiento de la cadena del frío una vez elaborados los productos es esencial para garantizar la máxima vida útil, mantener la calidad, prevenir o reducir el crecimiento microbiano y permitir una adecuada actuación del envasado bajo atmósferas modificadas.

Tanto en cámaras de conservación como durante su transporte y venta, las temperaturas deben mantenerse entre 1 y 5 º C.

Control de Calidad

Antes de comercializar los productos ya elaborados, es básico realizar un control final de calidad teniendo en cuenta las principales causas de deterioro:

- Ataque de microorganismos,
- Ablandamiento excesivo,
- Pardeamiento de la superficie del corte.

Estos procesos junto con otros relacionados con un mal manejo de la tecnología postcosecha, hacen que las frutas y hortalizas frescas cortadas muestren señales de alteración y deterioro como por ejemplo:

- Rozamiento o rotura de piezas como consecuencia del empaquetado muy apretado o mala manipulación.
- Arrugamiento, flacidez y excesivo secado, debido a pérdidas de agua.
- Aplastamiento, como consecuencia del ablandamiento de los tejidos.
- Desarrollo de coloraciones extrañas (amarillas, rojizas, marrones o incluso negruzcas) perdidas de clorofilas (color verde), pardeamiento enzimático y/o desordenes fisiológicos.

- Presencia de líquidos en el envase. (Esto puede ser asociado con microorganismos alterantes).
- Olores desagradables, tales como aromas ha fermentado debido a la acumulación de etanol, acetaldehído y/o acetato de etilo.

Detector de metales. Los productos mínimamente procesados una vez envasados deben pasar por un detector de metales para ser inspeccionados de posibles trozos metálicos. Grapas de las cajas, tornillos, así como fragmentos de cuchillos o de maquinaria, son las fuentes más frecuentes de contaminación por metales, que en el caso de que aparecieran, podrían provocar graves pérdidas económicas a la empresa, además de sanciones administrativas por poner en peligro la salud pública. Los detectores de metales deben estar bien calibrados para cada formato de bolsa y gramaje ya que a mayor peso o volumen de producto menor sensibilidad del detector.

- *Paletizado*. El paletizado de las bolsas es lo último que se hace antes de la expedición. Las cajas deben de estar pre-enfriadas para evitar que el producto se caliente. Además deben llevar siempre la fecha de elaboración o de consumición.

Expedición y Transporte refrigerado

El transporte es a menudo el factor que mayor costo supone en la cadena de distribución. Se busca siempre rentabilizar el tiempo y el espacio, consiguiendo que los alimentos lleguen al lugar en el que son requeridos en el menor tiempo, a un coste razonable y manteniendo las características organolépticas, nutricionales e higiénico – sanitarias del producto.

Para lograr el mantenimiento de la calidad, independientemente del medio de transporte que se utilice, se han de seguir siempre una serie de principios:

- Seguir durante la distribución y el transporte un control continuo de la temperatura, % humedad relativa y condiciones atmosféricas.
- No apilar las cajas individuales en alturas superiores a 5 cajas para proteger al producto de posibles daños físicos.
- La carga y la descarga han de ser tan cuidadosas como sea posible.
- La duración del viaje debe ser lo más corta posible.
- Evitar el sobrecalentamiento y reducir al mínimo movimientos y sacudidas.

La temperatura de transporte de los productos de 4ª gama ha de mantenerse por encima de su punto de congelación (entre 0 y 1ºC) siendo posteriormente almacenados entre 1 y 4ºC en los expositores de venta al público, en los frigoríficos domésticos hasta el momento de ser consumidos.

Comercialización

Una vez que los productos llegan a los centros de venta y consumo, han de colocarse en lineales adecuados que aseguren el mantenimiento de la calidad durante la vida útil. Se aconseja que la temperatura de éstos lineales no supere los 4ºC, pero lo más frecuente es encontrar temperaturas entre 4º y 7ºC.

Hay otros aspectos en relación a las vitrinas refrigeradas que deben tenerse en cuenta:

- Evitar áreas húmedas
- Mantener las bandejas de exhibición limpias y las zonas de flujo de aire libres de obstrucciones.
- Rotar los productos cada vez que se rellenen las vitrinas
- No apilar nunca por encima de la línea de carga para evitar comprometer las temperaturas de refrigeración
- Eliminar productos que pudieran aparecer deteriorados y retirar aquellos cuya fecha de caducidad vaya a vencer el día siguiente.

Consumo

Hoy en día, se comercializan una gran número de hortalizas de IV Gama entre las que se encuentran una gran variedad de lechugas y escarolas, verdes y pigmentadas, en brotes o en hojas más desarrolladas, así como espinacas, acelgas, zanahoria rallada, cebolla y hasta perejil. El más importante de todos es la lechuga cortada. En esta última etapa del producto en IV Gama, es importante dar unas directrices al consumidor para mantener la calidad sensorial y microbiológica hasta la fecha de vida útil, entre las que se encuentra no romper la cadena de frío.

9. PRINCIPALES CAUSAS DE PÉRDIDA DE CALIDAD EN LECHUGA EN IV GAMA

9.1 Pardeamiento enzimático

Uno de los principales problemas que reduce la vida útil de las hortalizas en IV Gama es el pardeamiento enzimático de la superficie del corte. Este deterioro tiene gran importancia porque perjudica la aceptación organoléptica y la calidad comercial ocasionando grandes pérdidas económicas. Hasta ahora las aproximaciones a este problema han tratado de impedir la aparición del pardeamiento enzimático en el producto procesado mediante el empleo de tratamientos postcosecha incluyendo las bajas temperaturas, lavados con antioxidantes, envasado en atmósferas modificadas y recubrimientos comestibles.

La oxidación o pardeamiento enzimático es el principal responsable de la pérdida de la calidad de los productos vegetales procesados, en particular en lechugas. Tras el cortado tiene lugar la descompartimentalización celular, permitiendo la entrada en contacto de enzimas de localización citoplasmática con substratos fenólicos de localización vacuolar. El pardeamiento enzimático consiste básicamente en la oxidación de sustratos fenólicos a o-quinonas, moléculas muy reactivas que condensan rápidamente, combinándose con grupos amino o sulfhídrico de las proteínas y con azúcares reductores, dando lugar a polímeros heterogéneos pardos, rojizos o negros de alto peso molecular llamados melaninas **Figura 12**, los cuales son responsables de la pérdida de calidad visual y nutricional del producto (Tomás-Barberán y Espín, 2001).

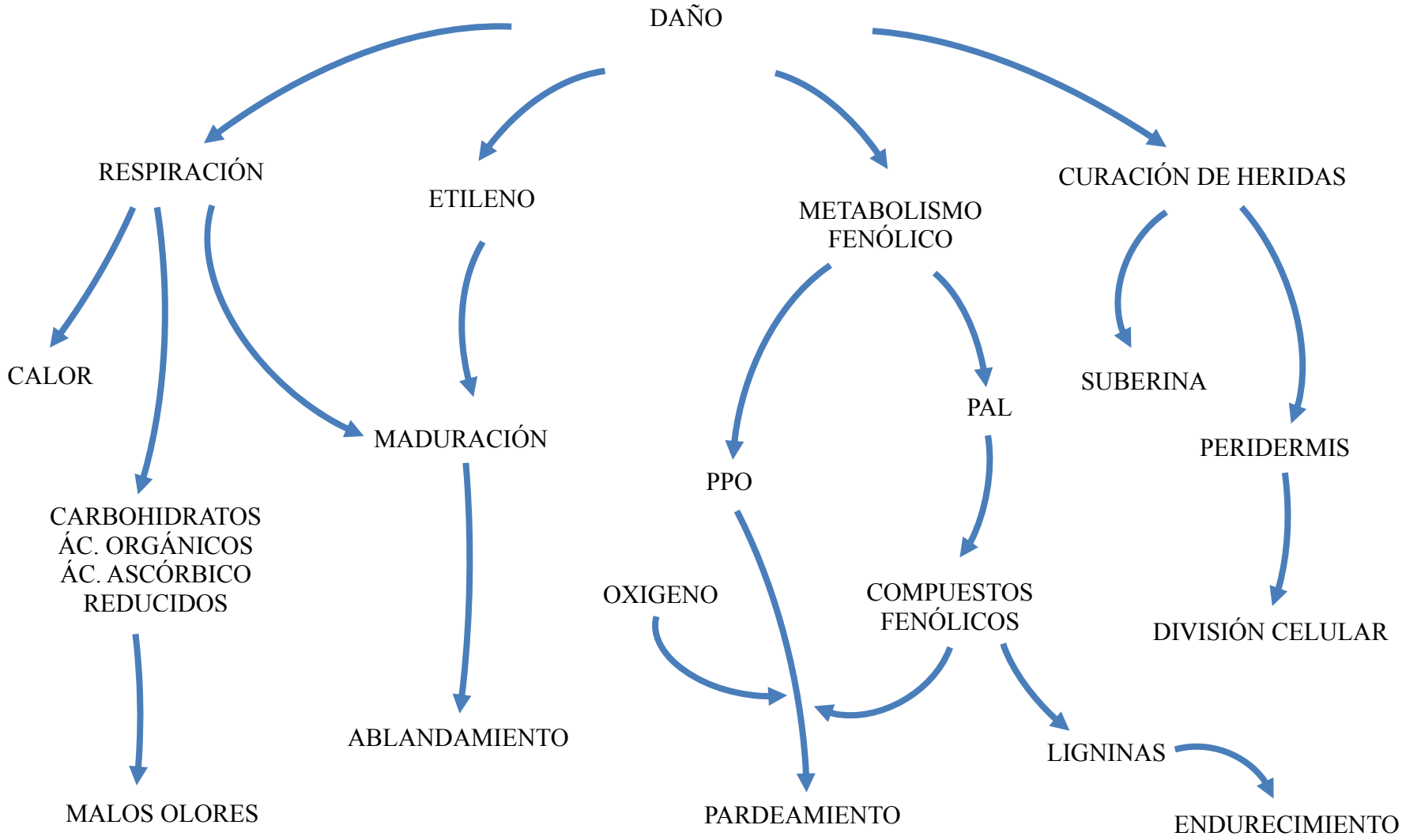


Figura 12. Esquema de la señal de daño en vegetales. (Fuente: Salveit. 2003)

La generación enzimática de las quinonas la lleva a cabo un grupo de cupro-enzimas denominadas genéricamente polifenol oxidasa (PPO). Actualmente se acepta la clasificación de éstas en dos grupos principales en función del substrato cuya oxidación catalizan: polifenol oxidasa (que da nombre genérico al grupo) y lacasa. La enzima polifenol oxidasa, o más específicamente llamada tirosinasa (E.C. 1.14.18.1), cataliza dos tipos de reacciones acopladas; la hidroxilación de monofenoles a o-difenoles (actividad hidroxilasa o monofenolasa) y la oxidación de o-difenoles a o-quinonas (actividad oxidasa o difenolasa) (Espín et al., 1998; Gil et al., 2005). Las peroxidasas (POD) son enzimas que también pueden contribuir al pardeamiento enzimático, catalizando la oxidación de polifenoles a expensas de peróxido de hidrógeno (H2O2) y produciendo quinonas similares a las obtenidas con polifenol oxidasa (Forsyth et al., 1999). Se ha propuesto que PPO podría actuar como promotora de la actividad POD, por generar H2O2 durante la oxidación de algunos compuestos fenólicos (Richard-Forget y Gaulliard, 1997). Otra enzima que interviene en el proceso de pardeamiento es fenilalanina amonio liasa (PAL) la cual cataliza la desaminación no oxidativa de fenilalanina a ácido cinámico. A partir de este ácido fenólico, a través de la ruta de los fenilpropanoides, se forman otros derivados fenólicos que pueden ser oxidados por PPO, provocando la aparición de pardeamiento (Saltveit, 1997).

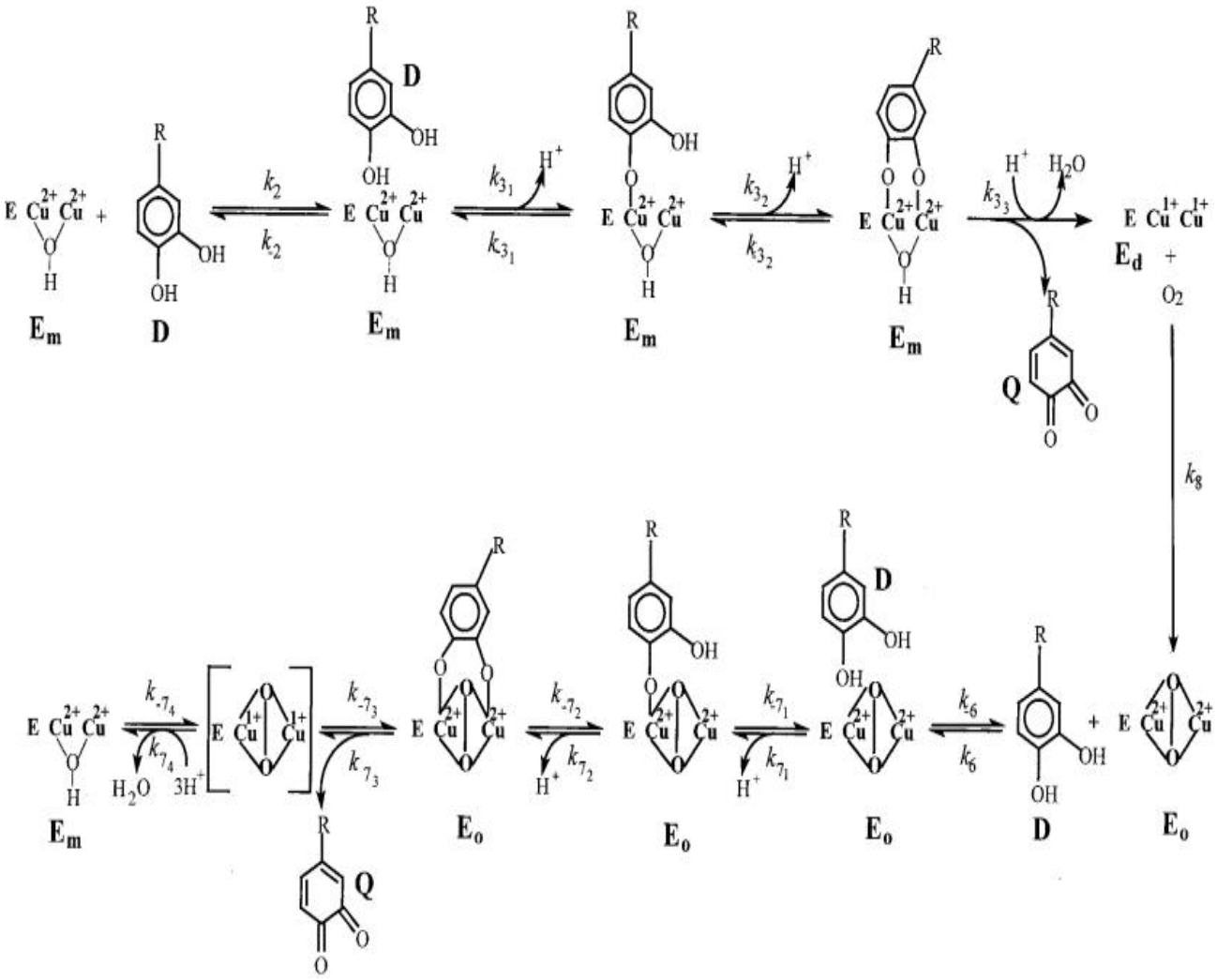
Cabe destacar que la intensidad y desarrollo de los fenómenos de oxidación depende de la concentración de enzimas y de sustratos, que a su vez depende de la variedad. Existen estudios que han intentado relacionar las características bioquímicas o fisiológicas con el pardeamiento enzimático de hortalizas, en particular con el contenido en compuestos fenólicos y en antioxidantes como el ácido ascórbico y las actividades PPO, POD y PAL (Degl'Innocenti et al., 2005). En este sentido, se ha observado la respuesta de diferentes cultivares de lechuga frente a determinados desórdenes fisiológicos cuya manifestación es en el pardeamiento de la costilla (Jenni, 2009).

En este proceso enzimático intervienen principalmente tres enzimas importantes, PPO y POD, en términos de calidad, debido a su producción de polímeros pardos (melaninas) (Tomás-Barberán, 2001) y paralelamente a estas actúa PAL sintetizando compuestos fenólicos.

9.1.1 Polifenoloxidasa

La polifenoloxidasa (EC 1.14.18.1) o tirosinasa es una cuproproteína conocida como creolasa (monofenolasa) y catecolasa (difenolasa) (Altunkaya y Gökmen, 2011).

En plantas, se han descrito PPO solubles e intermembranosas, están localizadas principalmente, en los cloroplastos (Chazarra et al., 2001), membranas internas de plástido (Brody et al., 2011), mitocondrias, microsomas, peroxisomas y el citoplasma (Tomás-Barbera y Espín, 2001). Sin embargo, sus sustratos se encuentran principalmente en vacuolas (97%) y pequeña proporción en paredes celulares (Hutler, 1998). La solubilidad enzimática de la lechuga ha sido estudiada por numerosos autores (Fujita et al., Heimdal et al., Chazarra et al., 2001) han descrito masas moleculares en un rango de 45 kDa hasta 65 kDa, debido a los diferentes cultivares y condiciones medioambiental. Esta enzima presenta en su centro activo dos átomos de cobre (**Figura 13**), describiendo tres estructuras químicamente diferentes durante el mecanismo de reacción (Figura Espín 1998): met (E*m*), deoxy (E*d*) y oxy (E*o*) (Espín et al., 1998). En el cual, se hidroxila un monofenol, eliminándose en la reacción una molécula de agua y sintetizándose un complejo entre la enzima E*m* y el difenol, liberando *o*-quinonas libres, reduciendo los átomos de cobre (E*d*). E*o* se vuelve a oxidar en presencia de oxígeno, continuando con la producción de quinonas que posteriormente polimerizaran y reaccionando con otros compuestos con grupos amino de aminoácidos y péptidos (**Figura 14**), por ejemplo con serina, prolina y cisteína (libres o ligadas a largas proteínas), resultando compuestos no tan oscuros como las melaninas (Nicolas et al., 1994). Además, los fenoles que no intervienen en este proceso pueden contribuir al pardeamiento, a través de reacciones de oxidación acopladas, generando un color pardo muy intenso (Philippon, y Maestre, 1993). Los daños mecánicos rompen la integridad de la membrana exponiendo el contenido celular a O_2, aumentando la síntesis de compuestos fenólicos, que al contactar con las enzimas, desarrollan del pardeamiento. Muchos estudios, relacionan el incremento de actividad PPO con la producción de pardeamiento en frutas y hortalizas (Lee, 1990; Nguyen et al., 2003).



E_m, ($ECu^{2+}Cu^{2+}$, $_{met}$PPO); E_d, ($ECu^{+}Cu^{+}$, $_{deoxy}$PPO); E_o, (ECu^{2+}-O_2 $^{-2}$-Cu^{2+}, $_{oxy}$PPO); D, o-diphenol; Q, o-quinone.

Figura 13. Mecanismo de reacción de la actividad PPO.

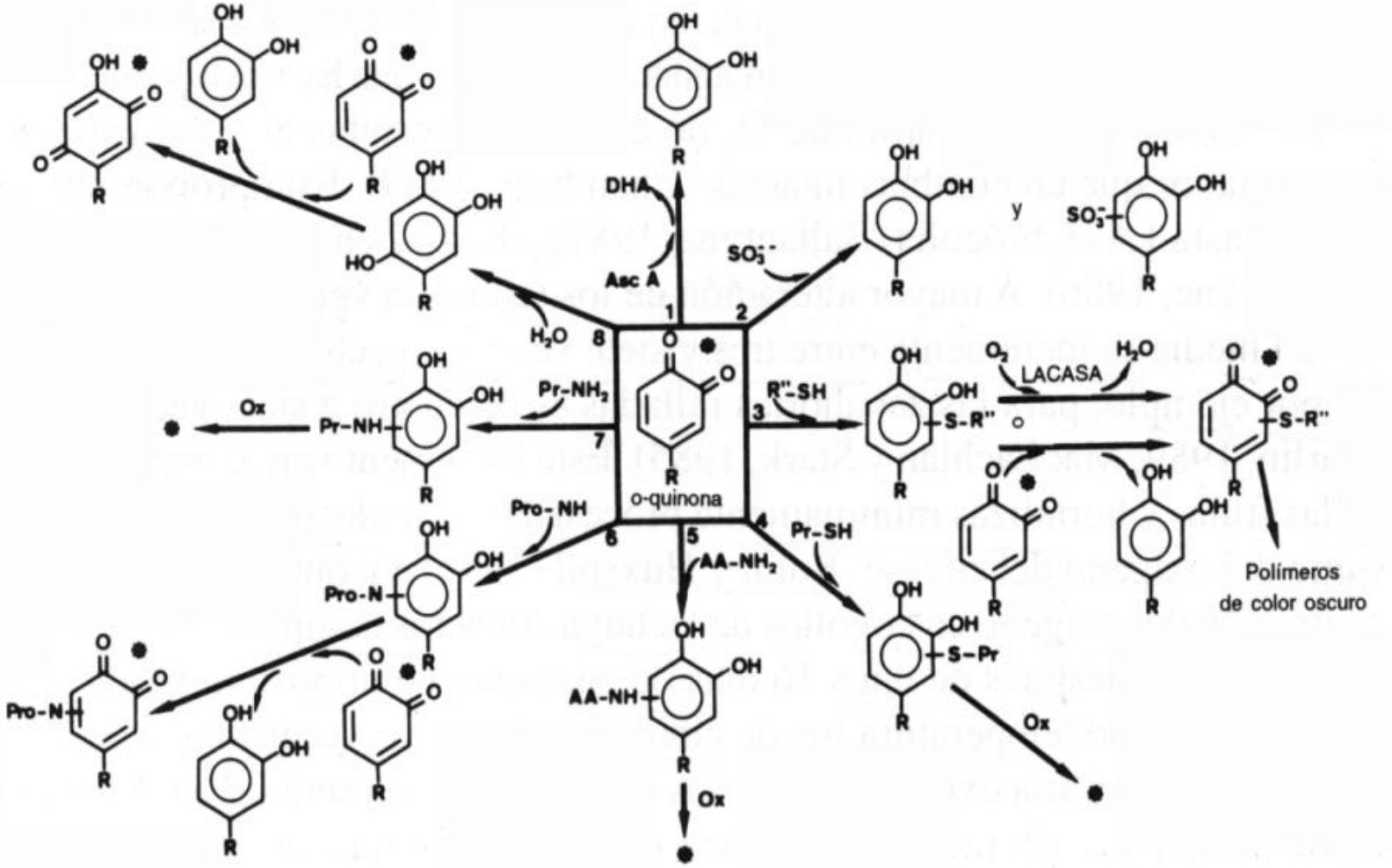


Figura 14. Reacciones de las quinonas con compuestos no fenólicos

9.1.2. Fenilalanina amonio-liasa

La enzima PAL (EC 4.3.1.5) es la llave en la ruta del ácido shikímico (**Figura 15**), produciendo la desaminación de L-fenilalanina a trans-cinámico (Tanaka et al., 2011) (**Figura 16**), produciendo la síntesis de los compuestos fenólicos como flavonoides, isoflavonoides, cumarinas y ligninas, para la defensa de la planta (Tomás-Barberán y Espín, 2001). Se encuentra principalmente en el citoplasma, mitocondria y plásmidos (Smith et al., 1994).

Los genes PAL no son conocidos en el genoma de la lechuga (Campos et al., 2004), pero si en tomate, *Arabidopsis*, arroz, etc., donde las isoformas presentan diferente cinética y propiedades físicas, localizadas en distintos compartimentos celulares (Sarma et al., 1998). La expresión del gen esta regula por factores bióticos y abióticos como la alta irradiación (Christie et al., 1994), infección fúngica o bacteriana induciendo la síntesis de lignina, suberina y otros polifenoles barrera (Vance et al., 1980; Ride, 1983), desarrollo del estado de la planta donde López-Gálvez et al. (1996) no observaron diferencias significativas entre la actividad PAL de dos cultivares de iceberg en tres estados de madurez pero si apreció una ligera tendencia, aumentando la actividad con la madurez. Estos resultados están relacionados con el trabajo de Couture et al. (1993), donde no hubo diferencia de concentración de compuestos fenólicos entre los distintos estados madurez de iceberg y el empleo de herbicidas que aumentan la actividad de PAL, como el uso de "metolachlor" en soja (Scarponi et al., 1992). La longitud del corte de lechuga es otro factor a tener en cuenta, López-Gálvez et al (1996) observó en midribs de 0.5x1 cm una elevada actividad Pal frente al corte de 2.5x15 cm durante las primeras 84 horas de conservación.

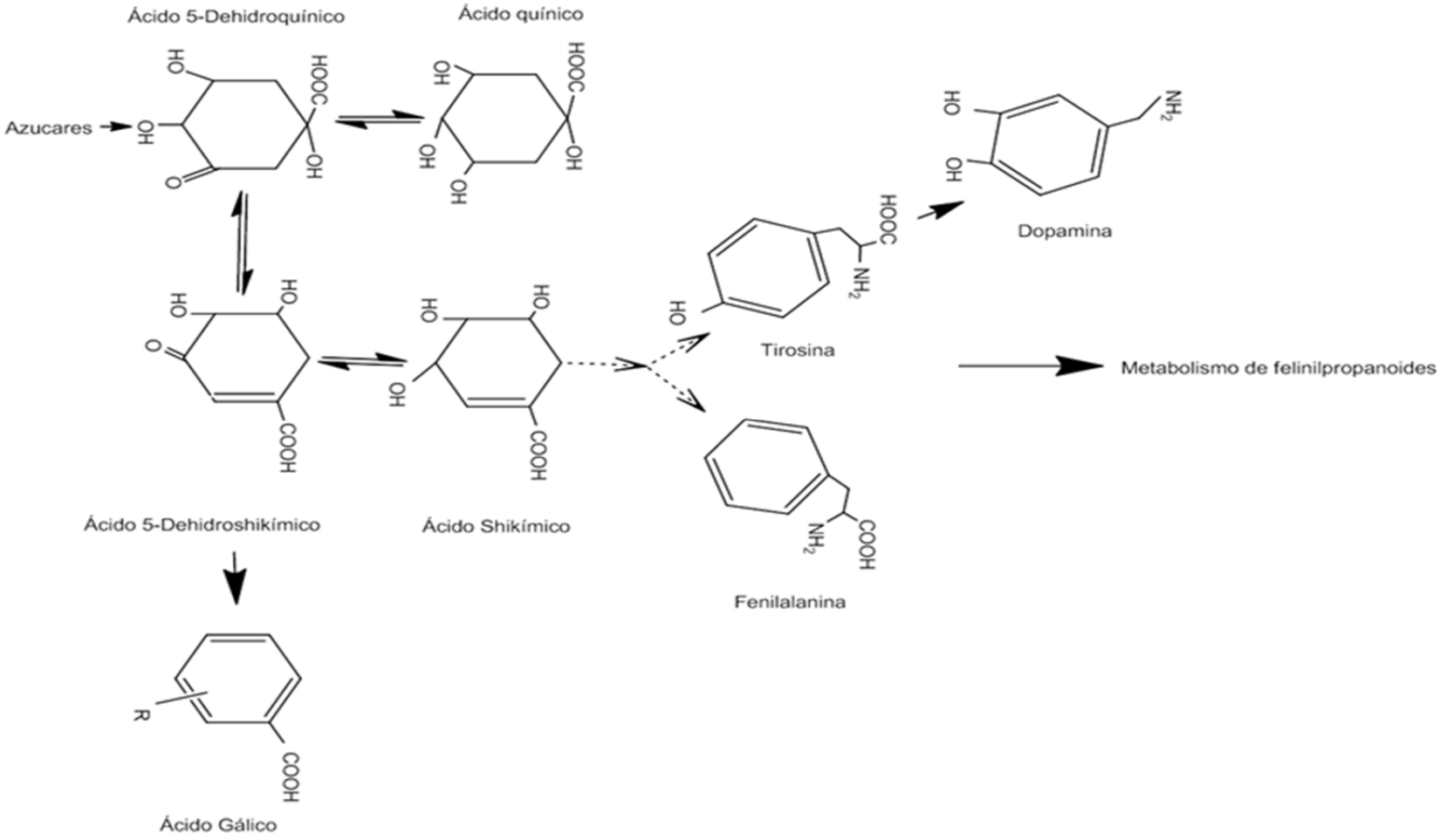


Figura 15. Ruta del ácido Shikímico.

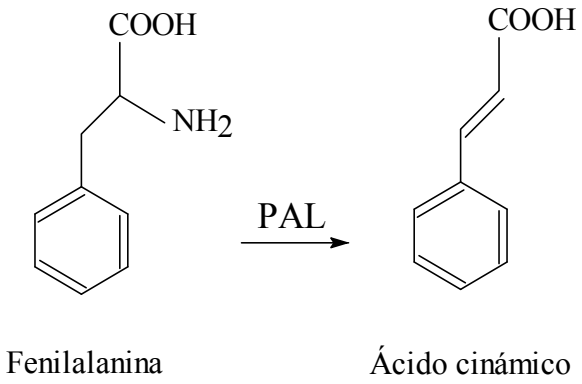


Figura 16.Desaminación de L-fenilalanina catalizada por PAL.

Por otro lado, las plantas expuestas a un determinado estrés puede aumentar la tolerancia a otros estreses, disminuyendo así la activación enzimática. Campos -Vargas et al. (2005) demostraron que al aplicar un tratamiento térmico de 45ºC en lechuga cortada indujo la tolerancia a daños por temperatura y condiciones de alta salinidad, debido a la síntesis de unas proteínas conocidas como proteínas de shock térmico (hsps), que modifican la ruta del ácido shikímico, por lo tanto, su producción está correlacionada con la disminución de la síntesis de compuestos fenólicos y actividad PAL.

En las plantas hay dos señales provocadas por una herida: (1) una señal química y (2) una señal bio-eléctrica (Peña-Cortes et al., 1995). El metiljasmónico, ácido jasmónico, ácido abcísico (ABA), ácido salicílico y etileno son señales químicas (León et al., 2001). Actualmente estos compuestos generan controversia, por ejemplo, el etileno produce un aumento de los compuestos fenólicos cuando la lechuga se encuentra expuesta a él (Tomás-Barberan et al., 1997), y el pardeamiento produce un aumento del etileno, sin embargo, el etileno no es una señal primaria pues aparece durante la conservación (Ke y Saltveit, 1989). Igualmente, Cottle y Kolattukudy (1982) observó un aumento de ABA durante la suberización de células de patata, señalándolo como

posible señal de pardeamiento, sin embargo, Revilla y Gonzalez-San Jose (1997) y Kondo et al. (1998) indujeron el aumento del PAL con ABA exógeno pero el ascenso ocurrió varios días después.

En hojas de lechuga maduras expuestas a ABA, JA, MeJA, SA, retrasaron la actividad PAL, impidiendo la síntesis de concentración fenólica, por lo tanto, evitando el desarrollo de pardeamiento, en comparación con los niveles inducidos por daño, sin embargo, en hojas jóvenes provocaron un aumento en PAL, fenoles y pardeamiento (Campos-Vargas y Saltveit, 2002), dependiendo de la inducción de señales del estado fisiológico de la hoja.

9.1.3. Peroxidasa

Las peroxidasas (EC 1.11.1.7) son glicoproteínas que contienen hierro en su grupo prostético y cuya primera función es oxidar los donantes de hidrógeno a expensas de los peróxidos (**Figura 17**). Con peróxido polimeriza los alcoholes hidroxicinámicos durante el estado final de la síntesis de lignina (Bestwick et al., 1998). Cuando la planta sufre estrés se producen enlaces entre proteínas de las paredes celulares como hidroxyprolina, que se hacen insolubles y liberan H_2O_2 (Liyama et al., 1994) aumentando la actividad peroxidasa. Este endurecimiento de la pared celular genera una barrera ante agentes fúngicos hacia el protoplasma (Aist y Gold, 1987; Brisson et al., 1994; Ke y Saltveit, 1989).

Figura 17. Actividad POD. (AH_2, donador de hidrógeno).

$$POD + H_2O_2 \rightarrow \text{Compuesto I} + H_2O$$
$$\text{Compuesto I} + AH_2 \rightarrow \text{Compuesto II} + AH$$
$$\text{Compuesto II} + AH \rightarrow POD + P(\text{ligninas, melaninas...})$$

Se encuentra extensamente distribuida en la planta siendo la responsable de la aparición de sabores y olores desagradables (Altunkaya y Gökmen, 2011), además pueden desempeñar cierta función en el pardeamiento, puesto que utilizan las formas

quinónicas como substratos peróxidos, siendo capaces de aceptar una amplia gama de donantes de hidrógeno, como los mono y difenoles (Richard-Forget y Gauillard, 1997), pero su implicación está limitada debido a la baja disponibilidad de H_2O_2 en el interior de las células vegetales (Robison, 1991). En este sentido, la POD no es una enzima oxidativa, en presencia de PPO favorece la degradación fenoles, en primer lugar PPO genera H_2O_2 dependiendo de la estructura del fenol y finalmente las quinonas generadas serán sustratos peróxido de POD (Robards et al., 1999; Subramanian et al., 1999), por lo tanto, se produce un efecto sinérgico entre ambas enzimas en la aparición de pardeamiento (Tomás-Barberán y Espín, 2001).

La peroxidación enzimática de los ácidos grasos insaturados es el ejemplo más grave de las modificaciones bioquímicas del aroma de este tipo productos. Esta peroxidación está catalizada por lipoxidasas y da origen a la formación de numerosos aldehídos como el n-hexanal. Debido a su gran termoestabilidad, el control de su actividad suele utilizarse como indicador de la eficacia del escaldado en frutas y hortalizas.

10. MÉTODOS PARA INHIBIR EL PARDEAMIENTO ENZIMÁTICO

El pardeamiento difiere entre especies, variedades y estados de desarrollo, depende del sustrato fenólico y cantidad de oxígeno disponible. El uso de antioxidantes antipardeamiento está muy extendido en la industria alimentaria, en frutas, hortalizas y bebidas comerciales. La inhibición del pardeamiento puede ser tanto química, física o combinación de ambas.

10.1. Métodos físicos

En combinación con el uso de antioxidantes, se emplean propiedades físico-químicas para inactivar la actividad enzimática como: pH, temperatura y atmósfera de conservación. El pH es determinante en el pardeamiento enzimático, trabajar con pH no adecuados provoca una disminución de la actividad enzimática, la optimización del pH depende del fenol precursor, por lo tanto, habrá que tener en cuenta el producto con que se trabaja y las condiciones química ambientales, que influirán en el grado de oscurecimiento (Nicolas et al., 1994), no sólo para una buena conservación, sino también para la realización de los análisis enzimáticos. En lechuga, PPO varía entre 5 y

8 (Heimdal et al., 1994), POD de 6 a 8 (Altunkaya y Gökmen, 2011) y PAL de 8 a 8,7 (Ke y Salveit, 1986).

Por otra parte, la influencia de la temperatura en la conducta enzimática, es uno de los factores más estudiados. Boo et al., 2011, observó que lechugas cultivadas a bajas temperatura durante el día y noche (13ºC/10ºC) sufrieron un mayor aumento de la actividad PAL y PPO mostrando una correlación con el aumento de antocianos, sin embargo, POD fue mayor a temperaturas superiores (30ºC/25ºC) sin apreciarse prácticamente correlación con el aumento de antocianos. Durante la conservación de lechuga mínimamente procesada a baja temperatura, retrasa la activación enzimática PPO Y PAL (Castañer et al., 1999), además de disminuir el tiempo en alcanzar la máxima actividad como obtuvieron Campos-Vargas y Saltveit (2002) en midribs de lechuga romana. El lavado de la lechuga cortada a 47ºC, es capaz de disminuir las actividades enzimáticas nombradas, en tejido fotosintético y midribs, sin embargo, no se observaron diferencias en la acumulación de compuestos fenólicos durante la conservación en tejido fotosintético, pero se originó una disminución en tejido vascular (Fukumoto et al., 2002). Heimdal et al. (1997) observaron una disminución del 40% en la actividad PPO de lechuga iceberg conservadas a 5º C en comparación a 30ºC.

Actualmente el método físico más empleado, para el retraso de la activación enzimática y por consiguiente del pardeamiento, es el empleo de bajas concentraciones de O_2 en el interior de los envases, reduciendo la disponibilidad de O_2 a las enzimas, con el uso de atmósferas modificadas, evitando la anoxia porque fomentaría el crecimiento de microorganismos anaeróbios sobre el producto, alterando las propiedades organolépticas. La unión de bajas concentraciones de O_2, altas de CO_2 y pH es capaz de retrasar o inhibe la reacción enzimática. Siriphanich y Kader (1985) encontraron en lechuga conservada en aire y 15% de CO_2 un efecto inhibidor de este gas debido probablemente a su similitud estructural entre O=O y O=C=O que lo hace idóneo para competir con el centro activo de la enzima, además de atacar electrófilamente a las quinonas impidiendo su polimerización (Heimdal et al., 1997).

10.2 Métodos químicos

Los inhibidores enzimáticos compiten con los compuestos fenólicos por el centro activo enzimático. Se han realizado patentes como el resorcinol (McEvily et al., 1993) el cual a bajas concentraciones tuvo un efecto inhibidor selectivo de tirosina pero no para lacasa (E.C. 1.10.3.2) (Dawley y Flurkey, 1993) permitiendo discernir entre ambas actividades en diferentes alimentos. El ácido oxálico y cítrico, actúan de forma similar, además son capaces de producir una bajada de pH en el medio de reacción que inactivan la acción enzimática y retrasa el crecimiento microbiano. Por otra parte, ácido ascórbico reduce las *o*-quinonas a fenoles compitiendo con la actividad oxidativa de las enzimas (Dincer et al., 2002) retrasando la reacción de oxidación hasta su agotamiento, bien en el medio de extracción o en la planta, sin embargo, la cisteína se cree que actúa a través de dos modos, uno formando aductos incoloros con las quinonas y otro compitiendo por los centros activos enzimáticos, siendo para muchos autores uno de los mejores antioxidantes (Richard-Forget et al., 1992). Tomás-Barberán et al. (1997) observó que $CaCl_2$, ácido 2,4-diclorophenoxiacetico y ácido acético disminuyeron la actividad PAL, pero sólo el $CaCl_2$ mantuvo el contenido fenólico en lechuga, además de preservar la estructura de la membrana ya que mantiene la forma latente de la enzima PPO.

Se han descrito una gran lista de compuestos antioxidantes como polisacáridos, carragenanos, sulfato amónico, ciclodextrinas, péptidos de *Dactylium dendroides* sobre todo en peras y zumos (Amiot et al., 1992), además de los ácidos 2-aminoinden-2-fosfórico, aminooxiacético y amino-β-fenilpropiónico (Peiser et al., 1998) que actúa directamente sobre la actividad PAL.

En lechuga actualmente, se ha comprobado el uso de 1-MCP como inhibidor de la producción de etileno, disminuyendo por lo tanto, la actividad PAL y la síntesis de compuestos enzimáticos (Salveit, 2004), sólo afectó a lechugas conservadas en etileno, no observándose diferencias en conservadas aire. En frutas, Zhang et al. (2008) observó un aumento de las actividades enzimáticas PAL y PPO, sugiriendo que el aumento de la síntesis fenólica debida a la actividad PAL y posterior lignificación celular, ayudó a proteger a los productos de invasores microbiológicos. Ke y salveit (1989) mostraron que la producción de etileno en los tejidos dañados es baja y transitoria para aumentar la actividad PAL.

Chen et al. (2010) observó que el uso de ClO_2 no sólo es beneficioso como desinfectante (Mahmound et al., 2008; Karabulut et al., 2009) sino también, es capaz de disminuir la actividad PPO y POD durante la conservación de lechuga cortada.

11. FACTORES QUE AFECTAN A LA CALIDAD DE LA LECHUGA EN IV GAMA

La lechuga en IV gama debe presentar un aspecto fresco, calidad homogénea y estar libre de insectos, tierra, metales y baja carga microbiana libre de patógenos (Nicola et al., 2009). El punto de partida para mantener calidad de la lechuga en IV gama es una excelente materia prima capaz de soportar el mínimo procesado, con altos rendimientos para la industria. Los factores que afectan a la calidad de la materia prima y consecuentemente al producto final son los factores precosecha como:

- Genéticos
- Condiciones edafoclimáticas
- Prácticas agrícolas
- Recolección

Como se ha mostrado anteriormente, la preparación de la lechuga mínimamente procesada requiere acciones que incrementan su perecibilidad (Cantwell). A pesar de ello, la conservación de lechuga en IV gama ha de preservar la calidad nutricional, organolética y microbiológica de la lechuga hasta el final de su vida comercial. Las etapas cruciales para mantener de la calidad de la lechuga en IV Gama son:

- Recolección, transporte y refrigeración
- Higienización
- Envasado y conservación
- Ablandamiento
- Podredumbres

El empleo de medios tecnológicos en estos factores, es crucial para conseguir los objetivos marcados en la lechuga IV gama.

11.1 Factores precosecha

Las buenas prácticas en precosecha son fundamentales para preservar y aumentar la calidad de la lechuga como materia prima. En ellas están involucradas todas las etapas del cultivo de lechuga desde la elección del cultivar hasta la recolección. Estreses provocados durante su crecimiento acortarían la vida del producto, empeorando las características organolépticas y visuales del producto en IV Gama, haciéndolas menos atractivas para el consumidor (Weston and Bath, 1997; Galvis-Sanchez et al., 2004; Calderón Lopez et al., 2005) además del desarrollo de enfermedades en el cultivo de lechuga, que provocaría grandes pérdidas económicas en productores y distribuidores.

11.1.1. Factores Genéticos

En este sentido, el comportamiento frente a estreses bióticos y abióticos es diferente incluso entre distintas variedades de un mismo tipo de lechuga (Oh et al., 2010). La influencia genética, lleva incluso a diferenciar la absorción de nutrientes durante el crecimiento de la lechuga (Mahmoudi, et al., 2012 y Burns et al., 2012). Esta absorción de los nutrientes influye tanto en el rendimiento del cultivo como en el valor nutricional de la lechuga.

Antes de decidir si una variedad es o no adecuada, se deben realizar multitud de ensayos recogiendo observaciones y analizando e interpretando los datos en las distintas campañas para abarcar el año completo, con producciones en distintas zonas. En el caso de la IV Gama, para tomar la decisión de qué variedades son las más adecuadas, se debe conocer el potencial de vida útil mediante la evaluación de la calidad de la materia prima y la del producto procesado (Gil, 2009). Hasta ahora, para aceptar una nueva variedad sólo se tenía en cuenta el rendimiento, desatendiendo aspectos relacionados con la calidad como son el potencial de pardeamiento, el contenido en constituyentes fitoquímicos y las actividades enzimáticas. Jenni, (2009) observo respuestas de diferentes cultivares de lechuga frente a determinados desórdenes fisiológicos cuya manifestación es el pardeamiento de la costilla. Las características fisiológicas de cada lechuga a de tenerse en cuenta en la postcosecha, como la tasa respiratoria, que acelera todos los procesos metabólicos acelerando el deterioro de la lechuga en IV gama.

Castañer et al. (1999) no observaron diferencias en la suceptibilidad al pardeamiento en Baby y Romana tras el procesado, y las actividades enzimáticas

seguían la misma tendencia. A su vez, Cantos et al. (2001) encontraron un mayor desarrollo de pardeamiento en lechugas tipo Iceberg frente a Romana, ambas variedades presentan también un mismo comportamiento enzimático pero diferentes valores de su actividad incluso dentro del mismo tipo. En este sentido, otros estudios observaron también valores distintos de actividad enzimáticos entre variedades de lechuga sometidas a los mismos tratamientos (Ponce et al., 2004; Degl´Innocenti et al., 2005).

Por otra parte, existen diferencias en el contenido fenólico no solo a nivel de cultivar sino también de variedad. Así, el tipo iceberg y mantecosa son muy pobres en flavonoides, y derivados del ácido cafeico, mientras que las pigmentadas lollo rosso y hoja de roble contienen grandes cantidades de flavonoles y derivados del ácido cafeico (Gil et al., 1998; Tomás-Barberán y Espín, 2001). En general, el contenido cualitativo y cuantitativo de los constituyentes están presentes en la información genética del vegetal, influyendo incluso, en la proporción oxidada y reducida de los compuestos como ocurre en vitamina C (Martínez- Sánchez A., 2008; Hodges and Toivonen, 2008).

11.1.2. Factores Climáticos

Los factores climáticos más influyentes en la calidad de la materia prima de la lechuga en IV gama, son la luz y la temperatura. La temperatura óptima para el cultivo de lechugas desde el transplante hasta la recolección es de 10-23ºC (Ryder, 2007). A su vez, la diferencia de temperatura entre el día y la noche puede influir en la composición y valor nutritivo en el momento de la recolección (Kader et al., 1974). En este sentido, son muchos los estudios que relacionan la temperatura durante el crecimiento del cultivo y la aparición de pardeamiento de la lechuga. Sharples et al. (1963) observaron una correlación entre el desarrollo de pardeamiento y la media de la temperatura mínima, 7 días antes de la recolección. Aunque otros autores relacionan el pardeamiento con altas temperaturas durante el día (Jenni S., 2005; Jenkins J.M.J., 1959), el estrés por calor influye menos en el desarrollo del pardeamiento que el estado de madurez, el momento más sensible del vegetal es dos semanas después de la formación de la cabeza. Hay una gran controversia en la síntesis de nutrientes a altas y bajas temperaturas Lee y Kader (2000) describieron mayor contenido en vitamina C en cítricos cultivados a temperaturas entre 20-13ºC que los cultivados entre 35-20ºC. Se sabe que el aumento de AA detectado durante el crecimiento de los vegetales a bajas temperaturas puede deberse a que estén sometidos a un estrés por frío, reduciéndose el metabolismo de los

carbohidratos, ya que el AA se relaciona con el contenido en materia seca (Schonhof et al., 2006). Además, el AA tiene un efecto fotoprotector (Smirnoff y Wheeler, 2000) cuanto menor es la intensidad de la luz menor es el contenido en AA en los tejidos vegetales (Lee y Kader, 2000). Por otra parte, Boo et al. (2011) describieron mayores actividades enzimáticas (PPO Y PAL) en lechugas cultivadas a 13ºC que las cultivadas a temperaturas superiores, en correlación con el aumento de los polifenoles y antocianos, sin embargo, la actividad peroxidasa actuó al contrario. En este sentido

La luz es una de las variables que afectan al contenido fenólico en plantas (Kopsell y Kopsell, 2008; Perez-Balibrea et al., 2008), los efectos de la luz son más complejos de lo que a menudo se describe (Li y Kubota, 2009). Por ejemplo, la luz UV-A (350-400 nm) indujo la síntesis de antocianos en la uva (Kataoka et al., 2003) y lechuga (Tsormpatsidis et al., 2008), sin embargo, se necesitó mayor longitud de onda (400-500 nm) para incrementar los compuestos fitoquímicos en tomate (Giliberto et al., 2005). Parr y Bolwell, (2000) registraron un mayor contenido en fenoles con mayor radiación UV, mientras que a temperaturas bajas observaron mayor acumulación en antocianos, quizás por un aumento de transcripción de genes que producen fenilalanina amonio liasa (PAL), enzima responsable de la biosíntesis de antocianos (Dela et al., 2003), en este sentido, Tsormpatsidis (2009) observó un aumento de compuestos fenólicos en lechugas cultivadas con alta radiación UV y una inhibición del crecimiento en aquellas sometidas a menor exposición lumínica, debido, probablemente al efecto negativo de los flavonoides sobre algunos reguladores del crecimiento como el ácido indolacético. El estudio realizado por Chon et al., 2012, concluye que la exposición del cultivo de lechuga a baja temperatura (20ºC/13ºC día/noche) originó una mayor síntesis de antocianos en correlación positiva con las actividades PAL y PPO, que las cultivadas a temperaturas mayores (30ºC/25ºC día/noche), en 6 cultivares de lechuga. Las plantas pueden producir altos niveles de antioxidantes en respuesta a altas condiciones lumínicas y temperaturas estresantes (Zhou, et al., 2004), pero la exposición constante a estrés puede reducir el rendimiento de la producción de los cultivos. Siendo aconsejable, la exposición a corto plazo de estrés para mejorar el valor nutritivo debido a que la respuesta del metabolismo antioxidante es más rápida que el encargado de la producción de biomasa (Zhou, et al., 2009). Algunos estudios relacionan el contenido de compuestos fenólicos con determinadas longitudes de onda aplicadas al cultivo en hidropónico, en este sentido, Li y Kubota (2009) no observaron en lechuga diferencias

entre distintas condiciones lumínicas en el contenido fenólico pero los antocianos mostraron una disminución al incidir luz roja elevada (700-800 nm). Además, la fisiología de la hoja se ve influenciada, por la incidencia de luz, la alta radiación es responsable de mayor anchura, longitud y materia seca de la hoja de lechuga, sin embargo, el número de hojas de la cabeza no se ve afectada por las condiciones lumínicas (Li y Kubota, 2009; Krizek et al., 1998).

11.1.3. Factores Fisiológicos

El factor fisiológico más influyente en la calidad de la lechuga en IV Gama es el estado de madurez. Este contribuye al deterioro de la lechuga durante su conservación, ya que influye tanto en la tasa respiratoria del vegetal como en los constituyentes de la lechuga conservada, aumentando su susceptibilidad al pardeamiento. En este sentido, el contenido en vitamina C está influenciado por la madurez siguiendo cada especie un patrón de comportamiento distinto (Lee y Kader, 2000), en hortaliza verdes se observó que a mayor madurez aumentaba el contenido en vitamina C (Shewfelt, 1990; Drews et al., 1997), sin embargo, el contenido fenólico es mayor en las hojas jóvenes (Valente-Pereira et al., 2002; Bennett et al., 2006; Reiferanth y Müller, 2007; Varoquaux et al, 1991). En este sentido, Korus (2011) observó en Brassica oleracea un aumento del 22 % de vitamina C, en las muestras más maduras, además del aumento de la actividad PPO en estas muestras. Sin embargo, no encontró relación del estado de madurez y otras actividades enzimáticas estudiadas (POD y catalasa).

Las características fisiológicas de la lechuga influye en el comportamiento frente a exposición de etileno, en este sentido, Couture et al. (1993) demostraron en su trabajo, el comportamiento de ocho cultivares de lechuga expuestos a etileno, en el que cuatro de ellos el etileno indujo un incremento de PAL y por lo tanto, una disminución de la calidad visual, al contrario que los otros cuatro cultivares que apenas sufrieron aumento de PAL. Además, las muestras sobremaduras presentaron menor contenido fenólico, sin diferencias entre las maduras e inmaduras. El estudio de la madurez se completará en el capítulo III.

11.1.4. Factores Agronómicos

El factor agronómico que más influye en la calidad de la lechuga en IV Gama es la nutrición como el uso de los fertilizantes y el agua. El objetivo de una fertilización óptima es maximizar la calidad con la mínima contaminación ambiental. La lechuga es muy sensible a la acidez del suelo, siendo los de textura franco-arcillosa los más adecuados para su cultivo. Para un alto rendimiento se debe tener en cuenta la vigorosidad de la planta para su colocación por metro cuadrado, por ejemplo, en iceberg varía desde 5 a 7 plantas por m^2 (Maroto et al., 2000)

Los principales nutrientes para el cultivo de frutas y hortalizas son el N, P y K. Muchos estudios han relacionado la disponibilidad de agua y nutrientes con la calidad y rendimiento de los cultivos. En la hoja de tomate, en dosis excesivas frena su crecimiento, aumenta los compuestos fenólicos inhibe la actividad PPO, POD y activa la PAL (Sanchéz et al., 2000). La absorción del nitrógeno en lechuga depende tanto de los factores genéticos como de la fuente de N (El-Nemr et al., 2012). Estos autores observaron, un mayor peso fresco en lechugas cultivadas en hidropónico con una fuente de N de NO_3^--N que las fertilizadas con NH_4^+-N. La carencia de N disminuye el crecimiento, provoca un tallo hueco y una coloración amarillenta, sin embargo, un exceso puede retrasar el acogollamiento (Maroto et al., 2000). Altos niveles de N disminuyen el grosor de la hoja de lechuga, aumenta la acumulación de nitratos, reduce los azúcares y aumenta los ácidos produciendo una aceleración del deterioro debido a la disminución de la respiración (Hoque et al., 2010), en este estudio el valor óptimo de abonado de N es entre 225 Kg N/ha y 112 Kg N/ha de P. El cultivo de lechuga en hidropónico facilita el control de la aplicación de los nutrientes y de la calidad microbiológica.

(Poulsen et al., 1995) demostraron que el incremento de dosis de N provocó la disminución de la concentración de azúcares en la lechuga, provocando también una disminución de la vitamina C y de la materia seca. Durante el acogollamiento de la lechuga es primordial un alto nivel de N, ya que el 80% se absorbe 4 semanas antes de la recolección (Pew et al., 1979).

Por otra parte, una deficiencia de fósforo y potasio produce una disminución del desarrollo vegetativo y en casos extremos no se produce acogollamiento, la aparición de manchas de color verde oscuro que finalmente se necrosan (Blancard D. et al., 2005),

debido a su baja movilidad es importante adicionarlo en riego por inundación antes de la plantación (Maroto et al., 2000). La absorción de potasio disminuye con el aumento de la fertilización de nitrógeno, además es aconsejable adicionarlo en forma de cloruros por la sensibilidad de la lechuga a la alta salinidad. En este sentido, un aumento en el aporte de potasio en piña reduce la concentración de fenoles y la actividad enzimática PPO, POD y PAL (Gomes Soares et al., 2005).

La carencia de Ca origina en lechuga origina una coloración gris en las hojas, el crecimiento de es reducido, particularmente en el corazón, originando a las lechugas un aspecto particular (Blancard D. et al., 2005). Hilton (2008) y Simmone (2001) observaron que un suplemento de este nutriente reduce el color pardo de lechuga cuando se adiciona a bajas dosis de K, además describieron un aumento en la textura, probablemente debido a una mayor fortaleza de la pared celular. Sin embargo, Ke (1986) observó que la dosis de Ca capaz de producir reducción de pardeamiento, disminuye a su vez la actividad PAL, pero causaron una pérdida de peso del 3% provocando una disminución en la frescura de la lechuga. En piña (Hewajulige et al., 2006) y champiñón (Philippoussis et al., 2001) también se observaron una disminución en la incidencia de pardeamiento con la adición de Ca.

El estrés provocado por un exceso o déficit de agua puede ocasionar un problema en la producción agrícola y en la apariencia de frutas y hortalizas. Algunos autores encontraron una reducción del tamaño en productos como cítricos (Bielorai, 1982) y olivas (Inglese et al., 1996). Los días de supresión del riego antes de la recolección pueden afectar al rendimiento de la materia prima y a la calidad microbiológica de la lechuga en IV Gama. Luna et al (2012) observaron un aumento del peso de cabezas de lechuga romana y de la carga microbiológica en el producto IV Gama cuando se regaron el mismo día de la recolección. Sin embargo, iceberg no mostró diferencias ni el peso de las cabezas ni en la carga microbiológica cuando se suprimió el riego 5, 3, 1 y 0 días antes de la recolección. El sistema de riego también puede afectar a la calidad microbiológica de la lechuga en IV gama. Fonseca (2006) observó una mejora de la calidad durante la conservación regando por surcos que por aspersores.

11.2 Factores postcosecha

Los requisitos de calidad que deben cumplir los productos tras su acondicionamiento y envasado están establecidos en el Reglamento nº 1543/2001.

Los procesos de postcosecha en IV Gama como cortado y lavado del producto son capaces de producir un daño, que desencadena señales fisiológicas y químicas, como pérdida de humedad, elevación de la respiración, producción de etileno y la activación del metabolismo de los fenilpropanoides (Baur et al., 2004) desencadenando pérdida de la calidad organoléptica, visual y microbiológica. Por lo tanto, los objetivos de la postcosecha es minimizar estas pérdidas aumentando la vida útil de la lechuga en IV Gama. Además

La investigación está permitiendo en cada fase del procesado minimizar los daños sobre el producto, alargando la vida útil. En la **figura 3** se describe las etapas del procesado en IV Gama.

11.2.1. Recolección, Transporte y Refrigeración

La recolección se puede realizar desde forma manual hasta totalmente mecanizada. En España lo más común es la manual, junto con el destronchado en el campo y posterior traslado a la empresa. Las buenas prácticas de recolección y transporte ayudan a mantener la calidad del producto durante la conservación, como sea dicho anteriormente. La recolección se debe hacer en horas en las que la temperatura es baja, para evitar tasas de respiración elevadas, disminuyendo la necesidad inmediata de enfriamiento (Nicola capitulo de frescut). Tras la recolección los vegetales siguen consumiendo productos fotosintéticos que acumularon durante su crecimiento. La tasa de consumición depende de la actividad respiratoria y por lo tanto, de la temperatura de conservación. Un retraso entre la recolección y el enfriamiento pueden causar problemas en la calidad, debido a la pérdida de agua y de constituyentes antioxidantes, así como el crecimiento microbiano (Thompson et al., 2001). En este sentido, Namesny (1993) estableció un máximo de 6 horas en lechuga iceberg. La velocidad de deterioro es proporcional a la tasa de respiración y aumenta exponencialmente con la temperatura (Cantwell, 2007).

Lechugas con largos periodos de crecimiento tienen menor vida útil que las cultivadas con periodos más cortos (Hayes and Liu, 2008). Realmente la recolección debe de realizarse en estado de madurez óptimo teniendo en cuenta la fecha desde el transplante y las condiciones edafoclimáticas en el verano la maduración puede tardar 40-49 días hasta unos 100 días en el invierno (Rogers et al., 2006).

11.2.2. Cortado e Higienización

El cortado de la lechuga acelera el metabolismo del vegetal generando un aumento de la tasa respiratoria y la degradación del tejido. El daño inducido en el vegetal activa la ruta sintética de los fenilpropanoides aumentando la actividad de PAL y la síntesis de compuestos antioxidantes. El tipo y la variedad de lechuga influyen en la respuesta del corte. Otros factores a tener en cuenta es la dirección, área y forma del corte, Deza-Duran et al. (2011) observaron mayor producción de volátiles en el corte transversal frente al longitudinal, debido probablemente a un mayor daño en la pared celular originando mayor peroxidación lipídica. La actividad PAL aumenta al disminuir el tamaño del corte de lechuga (López-galvez et al., 1996). El método de corte influye en la calidad microbiológica del producto IV Gama, el empleo de utensilios con poco filo causan más daño y permiten una mayor proliferación de la población microbiana (Gleeson y O´Beirne, 2005).

El sistema de lavado durante el proceso del corte es el más eficaz para disminuir el riesgo de la presencia de patógenos y disminuir la carga microbiológica que puede afectar a la pérdida de la calidad durante la conservación, además de eliminar restos de pesticidasy suciedad (Watada et al., 1996). Un retraso entre el lavado y la refrigeración del producto mínimamente procesado permite el crecimiento de la flora bacteriana disminuyendo la vida útil del producto (Sinigaglia et al, 1999). Un punto crítico en el procesado de la industria de IV Gama es la contaminación del agua de lavado, esto hace importante el uso de higienizantes. La concentración, el tipo y el efecto sinérgico de ellos ha sido estudiado (Allende et al., 2006). El ozono reduce el empleo del agua originando un producto menos dañado, además, puede aplicarse combinado con cloro evitando en un 25% la producción de malos olores (Strickland et al., 2007). Los ácidos orgánicos ocasionan mayor acumulación de residuos, además su acción bacteriana depende del pH y el grado de disociación del ácido, entre otras (Akbas y Ölmez, 2007) Actualmente en España el higienizante más empleado es el hipoclorito sódico, la

concentración empleada en la industria de frutas y hortalizas es de 50-100 mg/L, con un tiempo de contacto de 1-2 minutos (FAO/OMS, 2008). En conjunción con el empleo de un higienizante es importante el empleo de agua fría de lavado que disminuya la tasa respiratoria del producto de lechuga en IV Gama y evite el crecimiento microbiano, el rango óptimo de esta temperatura del agua de lavado es de 4ºC a 12ºC (Nicola). En este sentido McKellar et al. (2004) observó como la temperatura del lavado afectó a la respiración del producto aumentando con el incremento de la temperatura. Se han realizado estudios sobre la influencia de choques térmicos con el agua de lavado capaces de reducir la carga microbiana y las actividades enzimáticas causantes de pardeamiento (Salveit y Quin, 2008).

Antes del envasado, el exceso de agua debe ser eliminada para prevenir el crecimiento rápido de la flora bacteriana. El exceso de agua en la lechuga cortada se elimina por centrifugación o mediante tunes de secado. La velocidad y la duración de la centrifugación deben ser controladas, ya que un exceso podría dañar la pared celular de la lechuga acortando su vida útil.

Por otra parte, el higienizante usado puede influir en las actividades enzimáticas del vegetal, Baur et al. (2004) observó una mayor actividad PAL empleando cloro que tratando la lechuga con ozono.

11.2.3. Envasado y Conservación

El envasado de la lechuga en IV Gama preserva y alarga su vida útil. Los factores a controlar durante la conservación de la lechuga en IV Gama son: la humedad relativa, temperatura y atmósfera de conservación. La elección del plástico es un factor muy importante para mantener de forma adecuada los factores anteriormente nombrados. La lechuga posee una gran superficie favoreciendo la deshidratación y pérdida de peso sobre todo a altas temperaturas (Watada et al., 1996), por lo tanto, la elección de un plástico de baja permeabilidad de agua, para la conservación debe ser fundamental. La pérdida de agua se ve favorecida durante el cortado induciendo la síntesis de radicales de oxígeno y H_2O_2 (Hodges et al., 2004). La humedad del producto durante la conservación ayuda al desarrollo microbiológico, Medina et al. (2012) observaron en espinaca almacenadas 36 horas en cámaras con distintas humedades relativas, una mayor carga de psycrófilos y pseudomonas en las muestras de mayor humedad, sin embargo, no observaron diferencias en el contenido de coliformes. Por

otra parte, Agüero et al. (2011) obtuvieron la misma población bacteriana durante la conservación de lechuga en atmósfera MAP y dos humedades relativas óptima (95-98%) y baja (70-72%).

Otro factor es la temperatura, como es conocido una conservación a temperatura ambiente acelera los procesos de deterioro del producto afectando al sabor, color y una disminución del valor nutritivo. La vitamina C es uno de los constituyentes de la lechuga más lábiles durante la conservación, pudiéndose emplear como un indicador de buenas prácticas de conservación (Davey et al., 2000). La temperatura baja, ayuda a disminuir la respiración del producto y el pardeamiento enzimático, ya que reduce el metabolismo y retarda el crecimiento microbiano alargando así la vida útil (Watada et al., 1996).

En este sentido, algunos estudios mostraron la correlación entre diferentes temperaturas de conservación y actividades enzimáticas, Campos-Vargas and Salveit (2002) observaron un mayor aumento de actividad PAL en midribs de lechugas conservadas a 25ºC y 10ºC que a 5ºC, correlacionado con el aumento de la síntesis de compuestos fenólicos. Igualmente, Castañer et al. (1999) describieron mayor actividad PPO tanto en tejidos fotosintéticos y midribs en lechugas tipo baby y romana conservadas a 13ºC que a 5ºC, por el contrario en baby la actividad PAL no presentó diferencias en midribs conservados a 13ºC y 5ºC.

La conservación de los vegetales debe ser una combinación entre temperatura, atmósfera y permeabilidad del envase (Manolopoulou et al., 2009), donde cada vegetal presenta unas características óptimas para su conservación (Salveit, 2001) en función de su respiración. La influencia de la temperatura en la respiración de frutas y hortalizas está caracterizada por Q_{10}, normalmente, altos ratios de respiración requieren alta concentración de O_2 y baja de CO_2.

La modificación de la atmósfera dentro del envase puede ocasionar la formación de malos olores y sabores, debido a la biosíntesis de etanol y acetaldehído.

No siempre se puede extrapolar el ratio de respiración de la literatura a un producto, debido a variables como el cultivar, la estación y las operaciones de

procesado como cortado y lavado (Brody et al., 2011), muchos autores observaron la influencia del higienizante en la respiración como Vandekindere (2008) que obtuvo un aumento en la respiración de iceberg con hipoclorito sódico, sin embargo, no observó diferencias significativas con el uso de peroxiacético.

El uso de una atmósfera adecuada mejora la conservación de los compuestos bioactivos (Gil et al., 1998; Tomás-Barberán y Espín, 2001; Barth y Zhuang, 1996) además de reducir la aparición del pardeamiento al disminuir o inhibir las actividades enzimáticas PPO y PAL a concentraciones de CO_2 adecuadas para cada vegetal (Murr y Morris, 1974; Hyodo y Yang, 1971).

El uso de una atmósfera es capaz de modular la tasa respiratoria, debido a un bajo oxígeno y alto dióxido de carbono (Hodges y Toivonen, 2008). Esto se consigue modificando la composición del aire dentro del envase mediante atmósfera controlada (AC) o modificada (AM).

La permeabilidad de O_2, CO_2 y agua son los factores más importantes para la elección de un plástico en ambas atmósferas, permitiéndonos calcular el radio de respiración del producto y compararlo además con el estrés causado (Martínez et al., 2008). La AM puede ser en pasiva, como consecuencia de la respiración del vegetal y la permeabilidad del envase, o bien, de forma activa donde se introduce una mezcla gaseosa inicial o un vacío con N_2, generándose la atmósfera modificada como resultado de la respiración del vegetal y la mezcla inicial de gases (Martínez et al., 2008). En lechuga la combinación de una atmósfera modificada baja en O_2 (1-2 kPa) y altas concentraciones de CO_2 (12-15 kPa) con temperaturas bajas 4ºC a 7ºC, puede retrasar la producción de fenoles y la inactivación de las actividades enzimáticas PPO, POD Y PAL. Howard y Griffin (1993) observaron un aumento de compuestos fenólicos y actividades PPO y POD en condiciones de conservación controladas (3% CO_2 + 5% O_2 y 10% CO_2 + 11% O_2), debido a las altas concentraciones de O_2. LA atmósfera MAP es capaz de control el crecimiento microbiológico lechugas frescas cortadas conservadas en MAP que en aire, Arvanitoyannis et al. (2011) no observaron diferencias significativas en el recuento de mesófilos y psycrófilos en lechugas conservadas en MAP (5%O_2/ 10%CO_2 y 2% O_2/ 5%CO_2), sin embargo, si obtuvieron significativamente mayor recuento en las conservadas en aire. Por otra parte, Ahn et al.

(2005) observaron en Chinese cabbage que la aplicación de MAP alta en CO_2 redujo las bacterias aeróbicas pero aumentaron las bacterias ácido lácticas, iguales resultados mostró (Zagory, 1999).

11.2.4 Ablandamiento

Un daño provocado en el tejido de la lechuga desencadena una señal de estrés originada por peróxido de hidrógeno en el apoplasto de la célula, la producción de H_2O_2 induce una mayor síntesis en el plasmalema celular mediante la NADH-oxidasa, que aumenta la generación de radicales hidróxilo capaces de incrementar la peroxidación lipídica y el deterioro de la membrana celular (Stahl y Sies, 2002). Este deterioro está relacionado con el desarrollo de malos olores y sabores, además de la aparición de defectos visuales como el pardeamiento (Nguyen-the y Carlin, 1994). Entre los factores físico-químicos más importantes que afectan al ablandamiento de la pared celular son la deshidratación y la temperatura de conservación. La pérdida de humedad provocada por un daño mecánico aumenta la susceptibilidad al deterioro, causando un aspecto lánguido en los vegetales (Acedo, 2010). Sin embargo, Medina et al. (2012) observaron en espinaca que altas humedades (99%) HR provocan una mayor fragilidad y peor calidad visual que las conservadas a humedades relativas de 72% y 85%.

Las bajas temperaturas durante la conservación (< 0,5ºC) originan daños por frío y pérdidas del material vegetal (Cantwell y Kasmire, 2002). Además, un mal uso de las atmósferas modificadas, con altos niveles de CO_2 puede originar "Brown stain" y acelerar el deterioro del tejido (Mateos et al., 1993). Por otro lado, la exposición prolongada, incluso a niveles bajos como 0.01 ppm, puede causar pérdidas significativas en los productos frescos (Cantwell y Kasmire, 2002).

Otra causa de daño en el tejido de lechuga es la rotura de la pared celular por sustancias pectinolíticas. En este sentido, Babic et al. (1996) encontró un alto porcentaje (80%) de *Pseudomonas* en espinaca con actividad pectinolítica, proteolítica y lipolítica. Estas son capaces de degradar la textura del vegetal y producir la consiguiente pérdida de calidad. Además, la conservación a bajas temperaturas favorece el crecimiento de bacterias Psicrótofas, que incluyen a las *Pseudomonas* pectinolíticas (Nguyen-the y Carlin, 1994).

11.2.5 Podredumbres

La aparición de podredumbre en el producto IV Gama origina un rechazo total en el consumidor. El exceso de agua provocado durante la conservación es el principal factor desencadenante de podredumbre. Actualmente existe un consenso en cuanto a que la acción microbiana produce una merma de la calidad visual, acortando la vida útil del producto mínimamente procesado (Cantwell y Suslow, 2002). El daño originado durante el corte y el manejo del producto permiten la salida de jugos que contienen nutrientes que pueden servir de base para el crecimiento microbiano (López-Gálvez, 2009). La microbiota de los productos en IV Gama depende de numerosos factores (tipo de producto, condiciones de cultivo, procesado, condiciones de conservación, etc) y se corresponden normalmente con la que se puede encontrar en el producto en el campo (Delaquis et al., 1999). Las bacterias predominantes en los productos IV Gama son las *pseudomonas* (Gram negativas) como las *Pseudomonas fluorescens* capaces de producir pardeamiento y necrosis en endivia (Alippi et al., 2002) y *Pseudomonas cichorii* (Kiba et al., 2006). Sedlárová et al. (2007) observó una mayor concentración de H_2O_2 y mayor actividad peroxidasa en lechugas inoculadas frente a las no inoculadas. Otras bacterias Gram positivas son las ácido lácticas (BAL) más relevantes en productos ricos en azúcares como frutas (Jacxens et al., 2003). Levaduras cuyos efectos en el material son detectables a recuentos bajos, y los hongos filamentosos que su crecimiento está limitado con las bajas concentraciones de O_2. Además, se produce interacción entre los distintos grupos de microrganismos, como por ejemplo, las BAL y las *pseudomonas* que son capaces de inhibir el crecimiento de otros microrganismos mediante la producción de antibióticos y la competición de nutrientes (Haas y Défago, 2005).

CAPÍTULO II

OBJETIVOS

Uno de los principales problemas que reduce la vida útil de las hortalizas en IV Gama como la lechuga, es el pardeamiento enzimático del corte. Este deterioro tiene gran importancia por su impacto visual que perjudica la aceptación organoléptica y la calidad comercial ocasionando grandes pérdidas económicas. Hasta ahora todas las aproximaciones a este problema han tratado de impedir la aparición del pardeamiento enzimático en el producto procesado mediante el empleo de tratamientos postcosecha incluyendo las bajas temperaturas, lavados con antioxidantes, envasado en atmósferas modificadas, recubrimientos comestibles y choques térmicos. Sin embargo, no se han identificado las causas que pueden influir en la aparición del pardeamiento desde su cultivo hasta su comercialización y que provocan una falta de homogeneidad del producto IV Gama. El objetivo principal de esta tesis doctoral es el estudio y la identificación de distintos factores precosecha y postcosecha y su implicación en el desarrollo del pardeamiento enzimático en variedades de lechuga IV Gama, seleccionadas por su gran problemática e importancia económica.

Para la consecución de estos objetivos generales se plantean los siguientes objetivos específicos:

1. Selección de indicadores de madurez en hortaliza de hoja enteras y en IV Gama.

2. Influencia del estado de madurez de minihojas “baby” y “multi” de variedades de lechugas verdes y rojas para la industria de IV Gama.

3. Influencia de las soluciones nutritivas para el cultivo sin suelo en campo abierto de variedades de lechuga verdes y rojas en diferentes estaciones, sobre las características de calidad y vida útil del producto en IV Gama.

4. Influencia del cultivo en suelo y sin suelo en la calidad sensorial, constituyentes fitoquímicos y calidad microbiológica de variedades de lechugas verdes y rojas en IV Gama.

5. Influencia de la dosis de riego durante el cultivo de lechuga iceberg en la actividad enzimática relacionada con el pardeamiento y el metabolismo fenólico del producto en IV Gama.

6. Influencia de la dosis de riego durante el cultivo de lechuga romana en la tasa respiratoria, pardeamiento enzimático y calidad microbiológica del producto en IV Gama.

7. Influencia de diferentes condiciones lumínicas (luz, fotoperiodo y oscuridad) durante la conservación sobre la calidad de la lechuga romana en IV Gama.

CAPÍTULO III

Materiales y métodos

1. REACTIVOS UTILIZADOS

Los siguientes reactivos fueron adquiridos de Sigma-Aldrich (St. Louis, EE.UU.): hipoclorito sódico, ácido cítrico, ácido L-ascórbico (AA), ácido dehidroascórbico (ADHA), sal disódica del ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), fluoruro sódico (NaF), 1,2-fenilendiamina dihidrocloruro (OPDA), ácido clorogénico, rutina, cianidina 3-O-rutinósido, cetrimida, ácido fórmico, suero de albúmina, manitol, octilfenoxipolietoxietanol (TX-114), fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), benzamida, polivinilpolipirrolidona (PVPP), β-mercaptoetanol, hidrazona del 3-metil-2-benzotiazolinona (MBTH), ácido 3,4 dihidroxifenilpropiónico (DHPPA), N,N´-dimetilformamida (DMF), catalasa (EC 1.11.16), ácido 2,2´-azinobis(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfónico (ABTS), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), 2-hidroxi-2,4,6-cicloheptatrien-1-ona (Tropolona).

2. ESQUEMA DE LAS ETAPAS DE PROCESADO Y DE TRABAJO

RECOLECCIÓN MANUAL

TRANSPORTE

ENFRIAMIENTO A 4 ºC

ELIMINACIÓN DE HOJAS EXTERNAS

CORTADO MANUAL

HIGIENIZACIÓN

CENTRIFUGACIÓN

ENVASADO

CONSERVACIÓN

ANÁLIS Y DETERMINACIONES

3. MATERIAL VEGETAL

El material vegetal estudiado en la presente Tesis Doctoral corresponde a diferentes tipos de lechuga (*Lactuca sativa* L.) utilizados en la industria de IV Gama: romana, iceberg, lollo rojo, lollo verde, hoja de roble y trocadero. Las empresas productoras que han colaborado en el cultivo del material vegetal han sido Syngenta Seeds, Primaflor, Ruralcaja y Z-seeds. Todas las muestras se recolectaron manualmente y se trasladaron inmediatamente a las instalaciones del CEBAS-CSIC (Murcia) donde se mantuvieron durante 24 h a 4 ºC y 95 % de humedad relativa (HR) en oscuridad antes del procesado en IV gama.

4. CARACTERIZACIÓN DE LA MATERIA PRIMA

Para conocer el estado de madurez de la materia prima se midió la longitud total de la cabeza, longitud del espigón y peso en 20 cabezas de lechuga por tratamiento. El índice de madurez se calculó con la ecuación:

$$IM\ (\%) = \left(\frac{Longitud\ del\ espigón}{Longitud\ total\ de\ la\ cabeza}\right) * 100$$

5. CONDICIONES DE PROCESADO

En general, el procesado y obtención de la lechuga en IV gama se realizó simulando las condiciones y etapas aplicadas por la industria de IV gama. El procesado se realizó en una sala refrigerada a 4 ºC.

Los ensayos en los que se estudiaron distintas condiciones de materia prima (genotipo, madurez, cultivo, etc) el procesado se realizó independientemente para cada una de ellas. El procesado comenzó con la eliminación de las hojas no utilizables, como las más externas y las hojas dañadas. Siguiendo las condiciones comerciales, se seleccionaron las hojas intermedias de la cabeza (eliminaron cuatro hojas por cabeza) y fueron eliminadas la zona más apical y basal de la hoja. La etapa de cortado se realizó manualmente con cuchillo afilado para obtener trozos de lechuga de aproximadamente 30 mm de grosor, en las lechugas tipo iceberg y romana, el proceso realizado en las otras variedades empleadas se especifican en el capítulo correspondiente. Tras el cortado, los trozos de lechuga se colocaron en cestillos perforados que se sumergieron en depósitos de

40 L conteniendo agua de red clorada con 100 mg/mL de NaOCl a pH 6,5 ajustado con ácido cítrico durante 30 s. A continuación, los cestillos perforados se sacaron de los depósitos de agua y se permitió el escurrido del agua clorada durante 30 s. Posteriormente, las muestras se aclararon durante 30 s mediante la inmersión en otro depósito de 40 L con agua de red. Tras el aclarado, el exceso de agua del material vegetal se eliminó por centrifugación durante 1 minuto a 440 rpm en una centrífuga industrial (K-50, Kronen gmbH, Kehl am Rhein, Alemania).

6. ENVASADO Y CONSERVACIÓN

Después del procesado, se procedió a pesar la masa de lechuga cortada que se incluyó en cada bolsa. A continuación, la lechuga cortada se envasó a 4 ºC en bolsas en una envasadora vertical (Etna 280-X model, Ulma, Oñate, España). La masa de producto, el polímero plástico empleado, las dimensiones de las bolsas, y las condiciones de conservación para cada uno de los ensayos quedan recogidos en los capítulos correspondientes. Además, se aplicó una atmósfera modificada (AM) pasiva o activa según los objetivos del ensayo. En el envasado en AM pasiva, no se realiza inyección de gas. Este tipo de envasado se utiliza cuando la respiración del producto es suficientemente intensa como para reducir rápidamente el nivel de O_2 sin afectar a la calidad visual. En cambio, el envasado en atmósfera activa requiere de una inyección inicial de gas justo antes del termosellado de la bolsa. En los ensayos en los que fue necesario utilizar un envasado en AM activa, se inyectó nitrógeno N_2 hasta reducir el nivel de O_2 en el interior de la bolsa hasta 1 kPa de O_2. Además del envasado en AM activa o pasiva, en algunos ensayos se aplicó un envasado en bolsas multi-perforadas con diámetro de perforación aprox. de 2 mm para asegurar una atmósfera de aire en el interior y a la vez reducir las pérdidas por deshidratación.

Después del envasado, las bolsas de lechuga en IV gama se conservaron durante 3 días a 4 ºC y el resto del periodo de conservación a 7 ºC siguiendo las recomendaciones de AFHORLA (2010) para los estudios de vida útil. Además, según el objetivo del ensayo se consideraron las condiciones de iluminación de la cámara frigorífica durante la conservación. Así, en la mayoría de los ensayos se mantuvo la cámara frigorífica en oscuridad para evitar la interferencia de la fotosíntesis en la calidad del producto cortado, excepto en el capítulo X.

7. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO EN MATERIA SECA

El contenido en materia seca se determinó siguiendo el método propuesto por Agüero y col. (2008) con ligeras modificaciones en trozos de lechuga obtenidos entre las etapas de cortado e higienizado. De esta forma, se aseguró un muestreo más homogéneo ya que los trozos de lechuga provenían de un gran número de cabezas de lechuga.

El tejido fresco se trituró en una picadora doméstica (Moulinex, Barcelona). Del homogeneizado obtenido se tomó 15 gramos que se colocaron en bandejas de aluminio previamente pesadas. Las bandejas con el tejido vegetal se colocaron en una estufa de aire forzado (Thermocenter TC 40/100, Rotkreuz, Suiza) a 65 ºC durante 48 horas. Se realizaron 4 réplicas para cada uno de los tratamientos estudiados. Para el cálculo del contenido en materia seca se empleó la siguiente fórmula:

$$MS\ (\%) = \left(\frac{Peso\ seco}{Peso\ fresco}\right) * 100$$

8. DETERMINACIÓN DE LA TEXTURA

Para la determinación de la textura del tejido vegetal, se tomaron 25 trozos u hojas antes de la etapa de lavado-higienización. Para la medida de la textura se empleó una célula Kramer con cinco cuchillas (HDP/KS5) acoplada a un analizador de textura (TA.TX.plus, Stable Micro Systems, Reino Unido) con una célula de carga de carga de 294,2 N (30 kg). Esta célula simula el proceso de masticación ya que realiza secuencialmente las fases de compresión, cizalladura y extrusión. El material vegetal se analizó a 7 ºC para evitar la pérdida de textura y deshidratación. Todos los ensayos se realizaron una velocidad de 1,67 mm s^{-1}. Tras el ensayo, se determinó de forma automática la fuerza máxima ofrecida por el tejido mediante el software Texture Exponent 32, versión 4.0.

9. DETERMINACIÓN DE LA PÉRDIDA DE ELECTROLITO

La pérdida de electrolito está relacionada con la integridad de la membrana. Para su medida se siguió el método propuesto por Fan y Sokorai (2005) con ligeras modificaciones. Antes del lavado, se tomaron 50 g de trozos de hoja cortada de la zona intermedia de la cabeza y se sumergieron en 250 mL de agua. Después de 1 min se midió la conductividad eléctrica de la disolución con un conductímetro (Modelo CM35, Crison,

Barcelona, España) (CE1min). Al cabo de 1 hora en agitación a 150 rpm en una placa agitadora (INFORSAG, HT, Suiza) se midió de nuevo la conductividad eléctrica de la disolución (CE_{1h}). A continuación, el tejido junto con la disolución se autoclavaron a 121ºC durante 20 minutos y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Finalmente, se volvió a medir la conductividad eléctrica de la disolución resultante (CE_{TOTAL}). Para la obtención de los resultados se emplearon 4 réplicas por tratamiento. La pérdida de electrolito se expresó en % y se calculó según la siguiente fórmula:

$$Pérdida\ de\ electrolito\ (\%) = \left(\frac{(CE_{1h} - CE_{1\,min})}{(CE_{Total})}\right) * 100$$

10. MEDIDA DEL COLOR

Se midió el color en el tejido fotosintético del trozo de hoja utilizando un fotocolorímetro (Minolta CR-300, Ramsey, NJ, EE.UU) con 8 mm de diámetro de abertura. Se midieron 20 hojas para cada tratamiento a día 0 (L_0*, a_0* y b_0*) y después de la conservación (L*, a* y b*). Las diferencias de color durante la conservación se expresaron utilizando la siguiente fórmula:

$$\Delta E^* = \left[\left(L_0^* - L^*\right)^2 + \left(a_0^* - a^*\right)^2 + \left(b_0^* - b^*\right)^2\right]^{\frac{1}{2}}$$

Este índice se empleó para detectar cambios de color similares a los perceptibles por el ojo humano, en lechuga baby romana (Chisari ycol., 2010).

11. DETERMINACIÓN DE LA COMPOSICIÓN GASEOSA EN EL ESPACIO DE CABEZA

El espacio de cabeza de las bolsas (O_2 y CO_2 kPa) se midió utilizando una analizador de O_2 con una célula de detección electroquímica de cerámica óxido de circonio (CG-1000, Ametek, Thermox Instruments Co., Pittsburgh, PA, USA) y un analizador de CO_2 con detector de infrarrojos (Via 510, Horiba Instruments Co., Irvine, CA, USA). Se tomaron 0,25 ml del espacio de cabeza con una jeringuilla de plástico graduada a través de un "septum" (gota de silicona sobre una cinta aislante). Todas las medidas se realizaron por triplicado. El calibrado y comprobación del correcto funcionamiento del analizador de

infrarrojos se corroboró con patrones de concentración conocida de O_2 (0,1, 0,5, 1, 5 y 10 %) y CO_2 (5 y 10 %) (Abelló Linde, Barcelona, España).

12. DETERMINACIÓN DE LA TASA RESPIRATORIA

La tasa respiratoria de la lechuga en IV gama se midió a 7 ºC mediante los sistemas cerrado y permeable (Fonseca y col., 2002). En el sistema cerrado, se colocó una masa de 150 g de lechuga fresca cortada en frascos herméticos de 1,5 L. Los frascos se cerraron con aire como atmósfera inicial. A intervalos de tiempo regulares se midió la concentración de oxígeno en el espacio de cabeza de cada frasco hasta que alcanzó un 5%. Estos niveles de O_2 se ajustaron a una función polinómica de segundo orden para desarrollar la función de tasa respiratoria como describieron Gong and Corey (1994). En el sistema permeable, 175 g de producto fresco-cortado se colocaron en bolsas de polipropileno (PP) de 35 µm de espesor, con una permeanza al O_2 de 529 mL O_2 m^{-2} d^{-1} atm^{-1}, 1150 mL de volumen inicial y área de 0,2 m^2. Los cambios en O_2 desde 20,9 % en el interior de la bolsa se registraron como una función del tiempo y se ajustaron a una curva para determinar la función de tasa respiratoria como propusieron Lee y col. (1996). Para ambos sistemas, la tasa respiratoria se determine en 4 réplicas por tratamiento.

Para convertir los ml de CO_2 Kg^{-1} h^{-1} a mol CO_2 Kg^{-1} S^{-1} se empleó el factor de conversión propuesto por Banks y col. (1995):

$$\frac{(3.341 * 10^{-11} * Ptot)}{(273.15 + T)}$$

Donde $Ptot$ es la presión atmosférica en Pa (1atm=101325 Pa) y T es la temperatura de conservación en ºC.

De este modo, el resultado expresado en nmol CO_2 Kg^{-1} S^{-1} se calculó con la siguiente ecuación:

$$R\ CO_2 * \frac{(3.341 * 10^{-11} * Ptot)}{(273.15 + T)} * 10^9$$

13. EVALUACIÓN SENSORIAL

La calidad sensorial del producto fresco cortado se evaluó inmediatamente tras el procesado y periódicamente durante la conservación por un panel entrenado constituido por un mínimo de cuatro evaluadores. El análisis sensorial se realizó a ciegas por el panel de catadores. Después de medir la composición gaseosa de 3 bolsas de producto mínimamente procesado, se llevaron a la sala de cata equipada con mesas individuales donde se encontraban los evaluadores. Con las mesas de cata sólo iluminadas con luz roja, para impedir la interferencia de la apariencia, se evaluó el desarrollo de malos aromas al abrir la bolsa, sabor y textura de la lechuga cortada. A continuación, se apagó la luz roja y se encendió la blanca para evaluar el pardeamiento en el corte, pardeamiento en la superficie y calidad visual general.

La escala utilizada para la evaluación de los parámetros de alteración (pardeamiento y malos aromas) fue de 1 a 5. Donde 1 representa el producto sin alteración, 3 indica el límite de aceptación y 5 el producto totalmente alterado. Para el resto de parámetros de calidad evaluados, el valor más elevado correspondió a la máxima calidad y el menor a la más baja. Así, para sabor y textura se utilizó una escala de 5 a 1, donde 5 representó una puntuación máxima y 3 fijó el límite de aceptación. Para la puntuación de la calidad visual general se utilizó una escala hedónica de 9 puntos, donde 9 correspondió un producto de excelente calidad, 5 en límite de aceptación y 1 completamente alterado.

14. MICROSCOPÍA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

Para la observación en el microscopio electrónico de barrido (SEM), las muestras se fijaron en formaldehído (10 %). A continuación se lavaron tres veces en tampón cacodilato (0,1 M) (cacodilato sodio trihidratado, EMS, Hatfield, PA, USA), seguido de una fijación con tetraóxido de osmio (EMS) al 1 % en 0,1 M de tampón fosfato durante 1h. Posteriormente se lavó con tampón fosfato salino (PBS) durante 24 h seguido de la deshidratación de las muestras por inmersión en etanol (30, 50, 70, 90 y 100 %). A continuación, las preparaciones se llevaron al punto crítico del CO_2 (Balzers CPD 020, Balzers, Wiesbaden, Alemania). Las muestras desecadas se colocaron en soportes de aluminio especialmente diseñados para el SEM, y se montaron en placas de carbono con cintas adhesivas etiquetadas (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, EE.UU.). Finalmente, las muestras se recubrieron con un metal conductor, en este caso el oro (Target gold, Quorum Emitech, Kent, US) y se observaron en un SEM (JEOL-JSM 6100, SEM

JEOL, Inc., UK), con un voltaje de aceleración de 20 kV en el modo de detección de electrones secundarios. El número de estomas abiertos y cerrados se determinó en un área de 0,42 mm x 0,57 mm de la superficie axial de la hoja. Un total de 10 muestras fueron analizadas por tratamiento.

15. CONTENIDO EN VITAMINA C

La metodología empleada para la determinación de la vitamina C permitió cuantificar tanto el contenido en ácido ascórbico (AA) como el de dehidroascórbico (ADHA). La suma de ambos permitió conocer el contenido total de vitamina C.

15.1. Extracción de vitamina C

Para la extracción de vitamina C se empleó el método descrito por Gil y col., 1998b, 1999). A partir del material vegetal fresco se añadió el medio de extracción compuesto por ácido cítrico 0,1 M, EDTA 0,05 % p/v, metanol 5 % v/v y NaF 4 mM. La mezcla se homogeneizó con un homogeneizador (T-25 Ika-Werke, Staufen, Alemania) y se filtro a través de una gasa doble. El filtrado se recogió y se ajustó el pH entre 2,2 y 2,4 con HCl y posteriormente se centrifugó a 13 000 *g* a 4 ºC durante 10 minutos en microtubos de centrífuga (Sigma 1-13, Osterode, Alemania). El sobrenadante se pasó a través de un cartucho de extracción en fase sólida Sep-Pak C-18 (Waters, Milford, EE.UU.) previamente activado pasando un mismo volumen de metanol, agua y aire. Después se filtró por una membrana de 0,45 µm (Millar- HV13, Millipore Corporation, Bedford, EE.UU.). A continuación, se añadieron 250 µL de 1,2-fenilendiamina dihidrocloruro (OPDA) (34 mg $100mL^{-1}$) a 750 µL de extracto, para la derivatización del ADHA como fluoroforo 3-(1,2-dihidroxietil)furol[3,4-b]quinoxalina-1-ona (DFQ). Después de 37 min de incubación en oscuridad a 4 ºC, se realizó el análisis. Se realizaron tres extracciones por tratamiento.

15.2. Análisis de vitamina C

Para el análisis de la vitamina C, se inyectaron 20 µL de extracto en un sistema HPLC (High-performance liquid chromatography) (bomba L-6200; Merck-Hitachi, Tokio, Japón), acoplado a un detector ultravioleta-visible (UV-Vis) (Merk-Hitachi, L-7420) de longitud de onda variable y a un integrador (Merk-Hitachi D-25000). La columna empleada fue una C-18 de fase reversa LiChropher 100 (25 x 0,4 cm; 5 µm de tamaño e partícula; LiChroCART 250-4, Damstadt, Alemania) con una precolumna C-18 (1 x 0,32

cm; 5 μm de tamaño de partícula; LiChroCART 250-4, Damstadt, Alemania). La fase móvil empleada fue metanol/agua (5/95, v/v) conteniendo cetrimida 5 mM y fosfato monopotásico 50 mM a pH 4,5. El flujo se mantuvo a 0,9 mL min^{-1}. La longitud de onda del detector se situó inicialmente a 348 nm para la detección de ADHA como DFQ y después a 261 nm para la detección del AA. La cuantificación se realizó por comparación con patrones externos de AA y ADHA en las mismas condiciones que el extracto, los resultados correspondieron a la media de 3 réplicas y se expresaron en mg por 100 g de peso fresco.

16. CONTENIDO EN COMPUESTOS FENÓLICOS

Los compuestos fenólicos analizados en las variedades de lechuga verdes estudiadas fueron derivados de ácidos hidroxicinámicos, flavonoles y flavonas. En el caso de variedades rojas también se analizaron los derivados de antocianos. La suma de todos los derivados corresponde al contenido total de compuestos fenólicos.

16.1. Extracción de compuestos fenólicos

Previamente a la extracción de los compuestos fenólicos se pesaron tres réplicas por tratamiento de material mínimamente procesado fresco con un peso conocido y se congelaron a -80 ºC. Después, las muestras congeladas fueron liofilizadas con un liofilizador (CHRIST, ALPHA 2-4 LD plus, Osterode, Alemania). Para la extracción de los compuestos fenólicos se tomaron 0,5 g de muestra liofilizada y se homogeneizó con 16 mL de una solución hidroalcohólica (25 MEOH: 24 H_2O:3 HCOOH) con 4 mM de NaF a 4ºC en un homogeneizdor (T-25 Ika-Werke, Staufen, Alemania). Se realizaron dos extracciones de 8 mL de extractante del producto homogeneizado para obtener un mayor rendimiento. El homogenado final se filtró a través de una doble gasa y a continuación se centrifugó a 13 000 *g* a 4 ºC durante 10 minutos en microtubos de centrífuga (Sigma 1-13, Osterode, Alemania). . El sobrenadante se pasó por un filtro de 0,45 μm (Millar- HV13, Millipore Corporation, Bedford, EE.UU.). Los resultados obtenidos son la media de tres réplicas por tratamiento.

16.2. Análisis de compuestos fenólicos

Para el estudio de los compuestos fenólicos mediante sistema HPLC/UV-DAD, 20 μL de extracto del vegetal se inyectaron en el sistema HPLC (bomba L-2130; Merck-Hitachi, Tokio, Japón), acoplado a un detector ultravioleta-visible (UV-Vis) (Merk-

Hitachi, L-2455) de longitud de onda variable y a un inyector (Merk-Hitachi l-2200). Para la separación de los compuestos se empleó una columna C-18 de fase reversa LiChropher 100 (25x 0,4cm; 5µm de tamaño de partícula; LiChroCART 250-4, Damstadt, Alemania), protegida con una precolumna C-18 (1 x 0,32 cm; 5 µm de tamaño de partícula; LiChroCART 250-4, Damstadt, Alemania). La fase móvil empleada fue metanol/fórmico (95/5, v/v) fase móvil A y metanol 100 % en la B. El flujo se mantuvo a 1 mL min^{-1}.

Para la elución se empleó un gradiente lineal comenzando con 5% de B durante 20 min. A los 35 min se alcanzó un 35% de B en A y se mantuvo constante durante 5 min. A los 50 min se alcanzó el 90% de B en A. Finalmente el gradiente volvió a las condiciones iniciales. Los datos espectrales de todos los picos fueron registrados en el rango de 200 a 600 nm. La cuantificación se realizó por comparación con patrones externos (Sigma, Saint Louis, Missouri, EE.UU.). Los derivados de ácidos hidroxicinámicos se cuantificaron como ácido clorogénico, los flavonoles (quercitina y Kaempferol) como rutina, la flavona como apiina y las antocianinas como cianidina 3-O-rutinósido (Llorach y col., 2003b). Todos estos compuestos se cuantificaron a 330 nm y las antocianinas a 520 nm. Los resultados se expresaron como mg por 100 g de peso fresco y su valor corresponde a la media de 3 réplicas. En la **Fotografía 3.1** se muestra un cromatograma típico de lechuga.

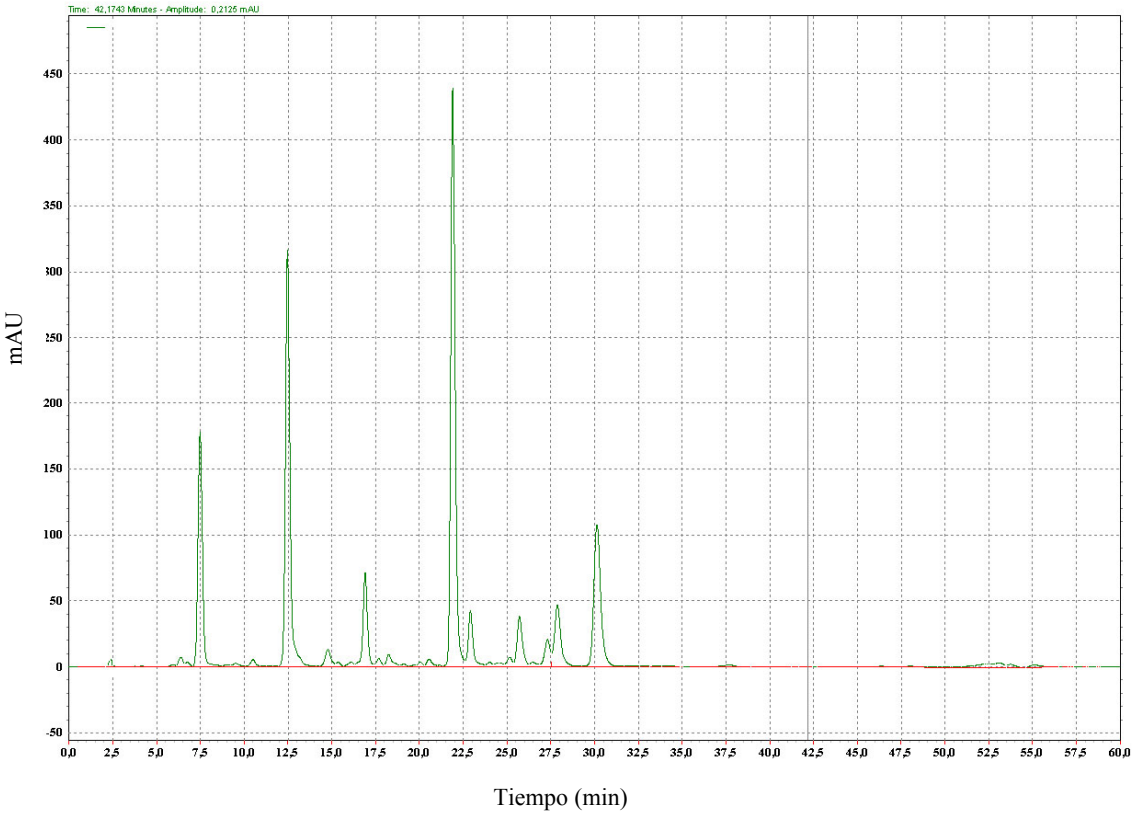


Figura 3.1. Cromatograma de compuestos fenólicos.

17. EXTRACCIÓN ENZIMÁTICA

Para la extracción enzimática de PPO y POD se empleó el método descrito por Cantos y col. (2001) con algunas modificaciones. Se homogeneizaron en un ultraturrax 30 g de midribs (2 x 2 cm) de lechuga con 15mL de tampón fosfato 0,1M pH 7 conteniendo, EDTA 20 mM, 1 % de TX-114 (para la extracción de PPO soluble y de intermembrana), fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), 1 mM, benzamida 5 mM ambos para evitar la acción de proteasas y AA 20 mM. El homogeneizado se sometió a un reparto de fases inducido por la temperatura (35 ºC durante 15 minutos), se filtró la fase clara a través de dos capas de gasa, quedando la superficie turbia debido a las micelas que forma el jabón con pigmentos, proteínas hidrófobas y fenoles (Espín y col., 1997. Posteriormente se centrífugo a 12 000 *g* durante 20 minutos a 4 ºC. El sobrenadante, libre de pigmentos, se utilizó como extracto para la medida de las actividades PPO y POD. Los resultados presentados corresponden a tres réplicas por tratamiento.

La extracción de la enzima PAL se realizó siguiendo el método de Ke y Salveit (1986) con algunas modificaciones. Seis g de midribs congelado (2 x 2 cm) a -80 ºC se homogeneizaron con 16 mL de tampón borato 50 mM (pH 8,5), conteniendo 0,4 g

polivinilpolipirrolidona (PVPP) y 2 µL de *β*-mercaptoetanol. El homogeneizado se filtró con doble capa de gasa y el sobrenadante sin pigmentos se centrifugó 12 000 *g* durante 15 minutos. De la misma forma que las actividades enzimáticas anteriores, los resultados corresponden a la media de tres réplicas.

17.1. Determinación enzimática

Para la determinación de la concentración enzimática se realizaron ensayos espectrofotométricos (espectrofotómetro Jasco V-630, PSC-718, Tokio, Japón), en los que se determinaron las concentraciones de sustrato necesario para las actividades enzimáticas. De acuerdo con la ecuación de Michaelis-Mendel se calculó Km y Vm. La temperatura de medida para PPO y POD se fijó en 25 ºC y 40 ºC para PAL, con una precisión de ± 0,1 ºC.

17.1.1 Polifenol oxidasa (PPO)

La actividad PPO se determinó siguiendo el método de Cantos y col. (2001). En este método se midió la acumulación del aducto formado entre las *o*-quinonas generadas enzimáticamente y el nucleófilo hidrazona del 3-metil-2-benzotiazolinona (MBTH). El cambio de absorbancia por la formación del aducto (de color rojizo) se registro a 467 nm, con un coeficiente de absortividad molar ε=22300 M^{-1} cm^{-1} a pH 6,5. Se añadió 2 % de *N, N´,* dimetil formamida (DMF) para mejorar la solubilidad del aducto sin efecto sobre PPO, posteriormente comprobado por Espín et al., (1995 y 1997). La mezcla de reacción contenía DMF 2 %, MBTH 5 mM, ácido 3,4 dihodroxifenilpropiónico (DHPPA) 2 mM y 10 µL de extracto enzimático. Se añadió catalasa bovina (10 µg mL^{-1}), para eliminar las posibles trazas de H_2O_2, evitando la interferencia de POD. Aunque se comprobó que sin o con catalasa, los valores obtenidos en las muestras fueron similares. Para distinguir entre PPO latente y activa (**Fotografía 3.2**), se añadió SDS 0,1 % al medio de reacción (Espín y Wichers, 1999). Se definió una unidad de PPO como la cantidad de enzima que produce 1µmol del aducto MBTH-DHPPA-*o*-quinona por minuto (Cantos y col., 2001). El volumen final de las muestras fue de 1 mL.

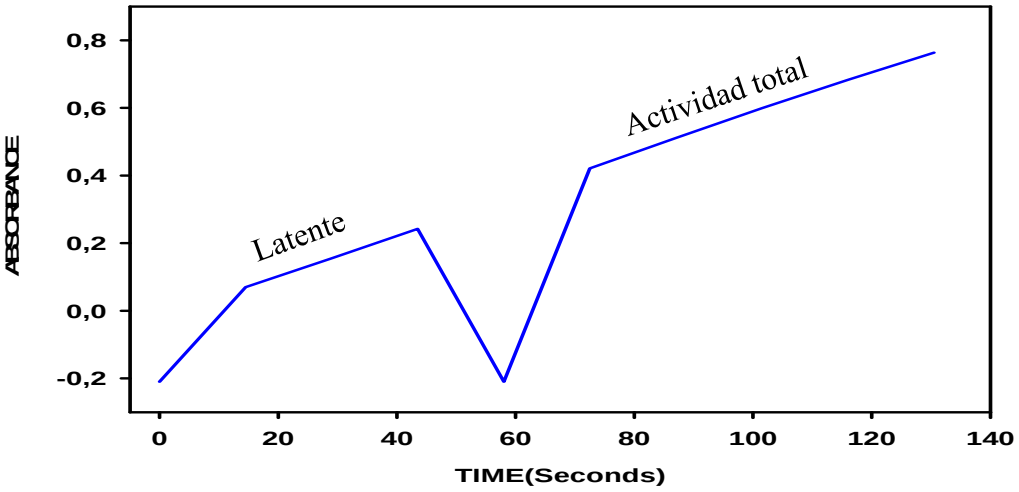


Figura 3.2. Medida de actividad PPO.

17.1.2. Peroxidasa (POD)

La actividad POD se midió siguiendo el método de Cantos y col. (2001). La mezcla de reacción contenía tampón acetato sódico 50 mM (pH 4,5), ácido 2,2´-azino-bis (3-etilbenzotiazolina)-6-sulfónico (ABTS) 2 mM, H_2O_2 2 mM, tropolona 0,2 mM como inhibidor de PPO y 10 µL de extracto. Se definió un actividad POD como la cantidad de enzima que produce 1µmol de radical ABTS* por minuto, medido a 414 nm (ε=31300 M^{-1} cm^{-1}). El volumen final de las muestras fue de 1mL.

17.1.3. Fenilalanina amonio-liasa (PAL)

Para la medir la actividad PAL se empleó la metodología de Ke y Salveit, (1996) con modificaciones. La actividad PAL se relacionó con la acumulación de ácido cinámico a 290 nm (ε=977 M^{-1} cm^{-1}) medida a 40 ºC. El medio de reacción contenía fenilalanina10 mM y tampón borato pH=8. Se definió una unidad de PAL como la cantidad de enzima que produce 1µmol de ácido cinámico por minuto. El volumen final del ensayo fue de 1 mL.

18. DETERMINACIÓN DE PROTEINA

El contenido en proteína se determinó por el método Bradford (1976), utilizando el kit comercial de Bio-Rad ©, Bradford Reagent, Sigma, Aldrich, Stain Louis, Missouri, EE.UU.) (azul brillante G en ácido fosfórico y metanol), que cambia su absorbancia a 595 nm en presencia de proteína. Para la determinación de proteína se mezclaron 15 µL de los

extractos enzimáticos con 985 µL del reactivo Bradford y se dejaron reposar 10 minutos en oscuridad hasta absorbancia constante. La concentración de proteína se calculó con la ecuación de la recta de la representación gráfica concentración frente absorbancia de suero de albúmina. Las concentraciones de proteínas de los distintos extractos enzimáticos se emplearon para el cálculo de las actividades enzimáticas analizadas.

19. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

Las muestras vegetales (30 g) se homogeneizaron 90 s con 0,1 % de agua de peptona tamponada estéril (BWP) (AES Laboratoire, Combourg, France) (1:5 dilución) en bolsas masticadoras estériles con filtro (Seeward Medical, Londres, Reino Unido), mediante un masticador (IUL Instrument, Barcelona, España) (Allendey col., 2008). Las diluciones necesarias de la muestra para la siembra se realizaron con la misma agua de peptona. Los medios de cultivo y condiciones de incubación empleados para el recuento de los distintos grupos microbianos fueron los siguientes: mesófilos aerobios totales se empleó un agar de recuento en placa (PCA) (Scharlau Chemie S.A., Barcelona, España) incubada a 30 ºC durante 48 h. Levaduras y mohos se contaron en Rosa de Bengala (RBA) (Scharlau Chemie S.A., Barcelona, España) a 25 ºC durante 5 a 7 días. Para el recuento de bacterias ácido lácticas (LAB) se empleó agar Man, Rogosa & Sharpe (MRS) (Scharlau Chemie S.A., Barcelona, España) a 30 ºC durante 48 h. Los coliformes totales y fecales se aislaron en agar cromocult (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, UK) a 37 ºC durante 24 h. Las colonias de *Listeria spp*. se determinaron empleando un agar selectivo en placa de Listeria (Oxford formulation Oxoid, basingstoke, Hampshire, UK) a 37 ºC durante 48 h. Todas las muestras fueron analizadas por duplicado y cada recuento microbiológico corresponde a la media de tres muestras diferentes. Los recuentos se expresaron como log ufc g^{-1}.

20. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó un análisis de la varianza con un nivel de significancia $P<0,05$ para todos los análisis y de $P<0,01$ sólo para los datos microbiológicos. Cuando se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos se realizó el test de Tukey´s usando el programa estadístico PASW Statistics 18 for Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

CAPÍTULO IV

INDICADORES DE MADUREZ EN HORTALIZAS DE HOJA

Gil, M.I., Tudela, J.A., Martínez-Sánchez, A., **Luna, M.C**., 2012. Harvest maturity indicators of leafy vegetables. *Stewart Posthar. Rev.,* 8, 1-9.

1. RESUMEN

En este capítulo se describen los distintos estados de madurez para seleccionar el momento adecuado de recolección de hortalizas de hoja dependiendo del destino final del producto, la calidad deseada y la resistencia a la manipulación y al procesado. Los índices para determinar la madurez hortícola son muy variado s, pero en general, los indicadores en cabezas de lechugas son: tamaño, longitud, diámetro, firmeza y densidad. Por otra parte, el número de hojas puede emplearse como índice de madurez en lechugas que no forman cogollo. En lechuga tipo iceberg así como en endibia, escarola, coliflor, radicchio, espinaca y acelga, el estado de madurez está basado en el tamaño, además de en la densidad de cabeza en iceberg y en coliflor. En este sentido, la fuerza ejercida para comprimir la cabeza de lechuga nos puede dar información sobre el estado de madurez, correspondiendo la presión moderada al estado de madurez ideal. Una de las principales conclusiones de este capítulo, es la recopilación de las especificaciones para la recolección de hortalizas para la industria de IV Gama. Esta información confirma que se deben emplear diferentes indicadores según el destino final. El peso de cabeza es un factor clave para la evaluación de la calidad de la materia prima en la industria de IV Gama. Para las minihojas maduras o inmaduras (conocidas como brotes u hojas jóvenes) la longitud de la hoja y del peciolo son buenos indicadores para asegurar la calidad del producto procesado. Se deben desarrollar indicadores de madurez para la recolección con el fin de garantizar la calidad del producto cosechado ya que una de las cuestiones clave para el éxito de la industria de IV Gama es la calidad de la materia prima para asegurar la vida útil del producto fresco cortado.

2. INTRODUCCIÓN

Las hortalizas de hoja como lechuga, escarola, espinaca, acelga, rúcula, berro y otros vegetales de hoja verde se caracterizan generalmente por ser productos muy perecederos, con altas tasas de respiración de pérdida de agua (Cantwell y Kasmire, 2002). Sin embargo, la coliflor es una excepción, debido a que puede almacenarse durante largos periodos. Las hortalizas de hoja alcanzan excelentes atributos de calidad en diferentes estados de madurez y desarrollo de sus hojas. Consecuentemente, existe un amplio intervalo de fechas de recolección, dependiendo del destino final del producto, de la calidad deseada y la resistencia a las operaciones de manipulación y procesado.

La madurez en la recolección es uno de los principales factores determinantes de la calidad y de los cambios que ocurren durante la postcosecha y vida útil (Kader, 2002a;

Shewfelt, 2009). Por lo tanto, se recomienda que la recolección de las hortalizas se realice en su estado óptimo de madurez, no sólo por los beneficios económicos de los productores, sino también, por las respuestas fisiológicas de la planta que le permiten el mantenimiento de la calidad óptima durante la conservación con respecto a otras recolectadas antes o después de su estado óptimo de madurez (Barg y col., 2008). La madurez en la recolección puede influir significativamente en la composición y en el contenido nutricional del cultivo. Por ejemplo, la concentración de ácido ascórbico es mayor en las cabezas de coliflor pequeñas que en las más desarrolladas (Weston y Barth, 1997); en hojas de nabo (*Brassica rapa* L.) inmaduras hay mayor concentración de tiamina y riboflavina pero menos carotenos que en hojas adultas (Salunkhe y col., 1991). Además, la madurez en la recolección no sólo es crítica para la calidad y la vida útil del producto fresco entero sino también para la industria de IV Gama, afectando a la tolerancia a la manipulación, a las operaciones de procesado y finalmente a la vida útil tras el cortado (Kader, 2002b). El objetivo comercial principal de la venta de lechuga es alargar el tiempo máximo sin defectos y que las cabezas sean largas y pesadas (Dufault y col., 2006). Por lo tanto, los objetivos para la recolección de lechuga para la industria de IV Gama son distintos, lo que conlleva el uso de diferentes indicadores de madurez dependiendo del destino final del producto.

3. INDICADORES DE MADUREZ EN HORTALIZAS DE HOJA

Los indicadores de madurez en la cosecha se han establecido para describir el momento adecuado que nos permita una mejor calidad y vida útil del producto. Estos indicadores deben ser sencillos de entender, aplicables, fiables y además realizarse mediante una medición objetiva y no destructiva si es posible (Reid, 2002). La calidad de las hortalizas de hoja para el consumo en fresco es una materia difícil que muchas de las características incluyen la descripción completa del producto. Las cualidades más importantes en las hortalizas de hoja para la aceptación del consumidor están asociadas con las características visuales tales como el color, la forma, el tamaño, la frescura así como la textura y el sabor. La determinación de la madurez varía según el producto hortícola, pero en general, para hortalizas de hoja el tamaño es el criterio principal (Kays, 1999; Cantwell y Kasmire, 2002) aunque la forma y la superficie son empleados habitualmente como índices de madurez (Barg y col., 2008). Otros indicadores importantes incluyen el diámetro, la longitud y la anchura de cabeza, el color, la firmeza y la compacidad del cogollo. Para lechugas no acogolladas el número de hojas se puede utilizar como índice de

madurez. En lechugas tipo romana, las cabezas que son inmaduras (< 30 hojas antes del destronchado) y maduras (alrededor de 35 hojas) tienen mejor sabor que las sobremaduras (menos amargas y más dulces) y además presentan menos problemas postcosecha (Cantwell y Suslow, 2001a). Para lechuga tipo iceberg y coliflor, la compacidad de la cabeza determina el estado de madurez óptimo para la recolección. La **Figura 4.1** muestra distintos estados de madurez en lechuga iceberg y romana basado en la apariencia visual de compacidad y longitud del espigón.

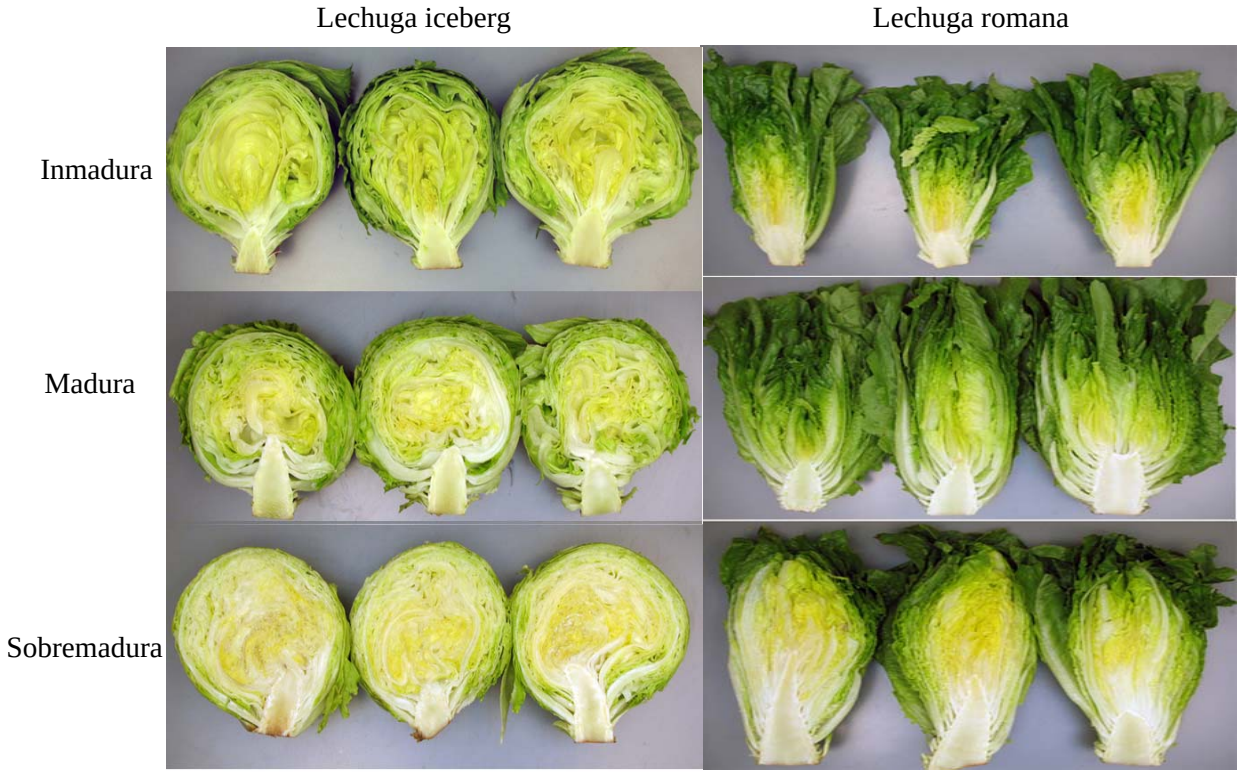


Figura 4.1. Estados de madurez en lechuga tipo iceberg y tipo romana. Fuente: Kader y Cantwell, 2010

Kader y col. (1973) propusieron una escala numérica para clasificar la calidad de la lechuga. Además, definieron unas características descriptivas para la evaluación subjetiva de la firmeza como indicador de madurez para lechuga iceberg (**Tabla 4.1**). En función de la presión ejercida con los dedos sobre la cabeza de lechuga, se puede clasificar en una escala del 1 al 5, desde 1 blanda hasta 5 muy dura. También se emplean ensayos de textura instrumental mediante el uso de la célula Kramer aunque estos ensayos de ingeniería mecánica son menos comunes.

Tabla 4.1. Escala de firmeza de lechuga basada en la presión ejercida con los dedos.

Escala	Clasificación	Descripción de firmeza
1	Blanda	Fácilmente compresible
2	Ligeramente firme	Ni blanda, ni firme, buena formación de cabeza
3	Firme	Compacta pero se puede romper con una presión ligera o moderada
4	Dura	Compacta y sólida
5	Extra-dura	Sobremadura, puede haber costillas centrales rotas

También se han estudiado las propiedades mecánicas de la hoja de lechuga como son la resistencia y la rigidez (Newman y col., 2005). La hoja de lechuga es un sistema de estudio muy complejo que hace difícil medir las propiedades mecánicas debido a la red de nerviaciones que posee. Sin embargo, se ha descrito que el efecto de la madurez influye significativamente sobre la resistencia y la rigidez cuando se comparan hojas de lechuga inmaduras y maduras. Por otra parte, el color de las hortalizas de hoja es un atributo de calidad importante que influye en su compra. Sin embargo, las medidas de color y el contenido en clorofilas no han sido descritos como indicadores de madurez. Por el contrario, un alto contenido de agua es una de las principales características de calidad de la lechuga. De hecho, la evolución del contenido hídrico durante el desarrollo del vegetal es considerado como un índice adecuado para la recolección en un estado fisiológico próximo al estado de madurez óptimo, aunque la decisión se toma normalmente desde un punto de vista económico (Barg y col., 2008). En este sentido, se ha observado los cambios en la capacidad de retención de agua en las hojas de lechuga durante su cultivo. Las normas de calidad comerciales de las hortalizas de hoja no tienen en cuenta los indicadores de madurez, excepto el tamaño y la forma (Kader, 2002c). En este sentido, las normas internacionales para lechuga y escarola (FFV-22), hortalizas de hoja (FFV-58), endibias (FFV-38), repollos (FFV-09) y la col china (FFV-44) incluyen el tamaño y la forma (UNECE, 2010).

Endibia belga (*Cichorium intybus* L.). Es una cabeza pequeña de color crema y hojas amargas. El tamaño y la compacidad indican su madurez que varía en función de la variedad (**Tabla 4.2**). Su recolección se lleva a cabo cuando las hojas exteriores están mas

compactas y la densidad es máxima (Rubatzky y Saltveit, 2004). El período óptimo de cosecha es entre 20 a 30 días, dependiendo de la temperatura. La recolección en el momento adecuado maximiza el potencial de vida útil mientras que un retraso produce una endibia más alargada y menos compacta. Los índices de calidad se basan en el tamaño, compacidad, forma y color. El calibre se determina por el diámetro de mayor sección y por la longitud (Cantwell y Suslow, 2001b).

Col (Redonda). Se debe recolectar cuando las cabezas son firmes y maduras. Para la recolección el índice principal de madurez se basa en el tamaño y la densidad (**Tabla 4.2**). Una cabeza compacta sólo puede comprimirse ligeramente cuando se efectúa una presión moderada con la mano (Cantwell y Suslow, 2001c). Un retraso de unos pocos días en la recolección sobrepasando el límite de madurez puede provocar daños en las cabezas, aumentando la incidencia de enfermedades, particularmente en estaciones húmedas (NGMC, 2004).

La col se debe recolectar cuando alcanza al menos 10 cm de diámetro de cabeza hasta unos 15 a 25 cm. En este tipo de hortalizas acogolladas, la madurez se mide teniendo en cuenta la compacidad y la firmeza. Se considera un cogollo maduro cuando una presión moderada con los dedos es suficiente para comprimirla (NGMC, 2004). Una cabeza sin acogollar es inmadura y no debe ser recolectada. Además, la madurez en la recolección puede basarse en la disposición de las hojas envolventes, normalmente está madura cuando se encuentran extendidas y se expone la cabeza. Una coliflor madura está bien desarrollada y presenta un buen peso en comparación con su tamaño.

Tabla 4.2. Indicadores de madurez de hortalizas de hoja.

Hortalizas de hoja	Indicadores de madurez
Acelga	Las hojas se cosechan periódicamente a mano a partir de 60 días después de la siembra. Las hojas recolectadas con peciolos pueden presentar de 20 a 50 cm de largo (Mencarelli, 2003b).
Col redonda y col china	El peso de la cabeza debería ser mayor de 350 g en el caso de coles tempranas y de 500 g para otras coliflores (NGMC, 2004; UNECE, 2010).
Endibia	La madurez está basada en el tamaño y en la compacidad. La mayor calidad se alcanza con una longitud mínima de 9 cm y máxima de 16-17 cm y un diámetro de 6 cm. La relación entre la longitud y la anchura es normalmente de 2:1 a 3:1 (Cantwell y Suslow, 2001b; Rubatzky y Saltveit, 2004; UNECE, 2010).
Escarola	La madurez está basada en el tamaño (Saltveit, 2004a).
Espinaca	Se recolecta por su tamaño y cuando la recuperación de hojas en buen estado es máxima entre una madurez media y joven. Generalmente, de 3 a 4 semanas desde el primer corte hasta el segundo corte para obtener el máximo rendimiento (Suslow y Cantwell, 2001).
Lechuga iceberg	La madurez está basada en el tamaño y la compacidad de la cabeza. Se considera un estado de madurez ideal cuando la cabeza puede comprimirse con una fuerza moderada con la mano (Cantwell y Suslow, 2002; Saltveit, 2004b).
Lechuga romana	La madurez está basada en el número de hojas y en el desarrollo de la cabeza. Una cabeza poco firme, fácilmente compresible es inmadura, mientras que una cabeza dura corresponde a un estado sobremaduro. Las cabezas inmaduras presentan < 30 hojas antes del destronchado y las maduras por encima de 35 hojas. Las cabezas maduras poseen mejor sabor que las sobremaduras, son menos amargas y más dulces y además poseen menos problemas durante la postcosecha (Cantwell y Suslow, 2001a).
Radicchio	La madurez está basada en el tamaño, generalmente 75 a 85 días después de la siembra. La cabeza es firme y compacta en su estado de madurez óptimo. Las hojas de radicchio presentan formas alargadas y cónicas como la lechuga romana (Cantwell y Suslow, 1999; Mencarelli, 2004).

Col china. Presenta formas diferentes, pero las dos más comunes son tipo Nappa, más corta y ancha, y tipo apio (Michili), más larga y estrecha (Wang y Cerkauskas, 1999). La col china debe ser uniforme, de forma bien compacta, de color amarillo verdoso y hojas arrugadas. La forma de las cabezas y las características de las hojas pueden variar, dependiendo del cultivar. La determinación de la madurez en la especie Brassica no es fácil. Además, los índices de madurez simples no son fiables (Ludford y Isenberg, 1987; Prange, 2004). En algunos cultivares, las hojas exteriores se atan unas semanas antes de la recolección para facilitar la formación de una cabeza apretada y erguida. Ludford y Isenberg (1987) observaron que la col china se conserva mejor cuando las cabezas recolectadas son más compactas. La norma que establece el grado de madurez en la col china se basa en el peso de cabeza (UNECE, 2010). Las cabezas inmaduras además de ser más pequeñas y blandas, tienen una excesiva tendencia a marchitarse y a perder su olor característico. Por el contrario, una cabeza sobremadura es más susceptible al rajado, patógenos y alteraciones fisiológicas y a la subida de la flor.

Bok choy (*Brassica campestris* L. ssp chinensis). Es conocida como acelga china, boy-toyo, pak-choy o col china no acogollada. Las porciones comestibles son brillantes, hojas verde oscuras y tallos gruesos y blanquecinos (Luo, 2004). La recolección se realiza normalmente 7 semanas después del trasplante, aunque puede variar según el cultivar y las condiciones ambientales. Debe presentar unos peciolos erguidos y fuertemente adheridos entre sí. Bok choy debe siempre recolectarse cuando las hojas son frescas, crujientes y amarillentas.

Escarola (*Cichorium endivia* L.). Presenta dos formas; una de hojas estrechas llamada endibia rizada o friseé (var *crispum*) y otra de hojas anchas llamada endibia de hoja ancha (var *latifolia*) (Saltveit, 2004a). Las hojas exteriores de la escarola son amargas y de color verde oscuro. Las hojas interiores son de sabor más suave y de color blanco cremoso. Las hojas jóvenes y tiernas son preferibles a las hojas adultas, ya que estas presentan un sabor menos amargo. El índice de madurez se basa en el tamaño del vegetal (**Tabla 4.2**). Las plantas se cortan completamente desarrolladas de 25 a 30 cm de diámetro a nivel del suelo (Saltveit, 2004a). Sin embargo, si la recolección se retrasa, la escarola se madura excesivamente, volviéndose incomercial por el endurecimiento y el fuerte sabor amargo.

Lechuga (*Lactuca sativa*). Saltveit (2004b) y Cantwell y Suslow (2001a; 2002) resumieron las características de calidad y los índices de madurez de la lechuga. La lechuga se debe recolectar cuando la cabeza esté bien formada y solida (Ryall y Lipton, 1979). La madurez está basada en el tamaño y la compacidad de la cabeza. La firmeza del vegetal está relacionada con la susceptibilidad de determinados trastornos postcosecha (**Tabla 4.2**). Las cabezas más blandas son más fácilmente dañadas, mientras que las más firmes poseen una velocidad de respiración más alta. La máxima vida útil se consigue con cabezas firmes en su estado de madurez óptimo, mientras que cabezas duras y muy duras son más propensas a desarrollar manchado rojizo o "*russet spotting*", costilla rosácea o "*pink rib*" así como otras enfermedades fisiológicas. La cabeza de lechuga se caracteriza por su tamaño y compacidad. Sin embargo, las hojas se clasifican por su tamaño (Hardenburg y col., 1986). Por otra parte, las cabezas de lechuga que se recolectan sobremaduras producen un sabor fuertemente amargo y una textura dura, ocasionando el rechazo del consumidor. En este sentido, las cabezas inmaduras y maduras presentan mejor sabor que las sobremaduras, además de tener menos problemas durante la postcosecha. Durante los últimos años, nuestro grupo ha estudiado diferentes indicadores de madurez en lechuga romana. Las medidas del estado de madurez de las cabezas en el momento de la recolección se realizaron usando diferentes criterios, incluyendo el peso, la longitud del tallo, longitud total y la relación entre la longitud del tallo/longitud total x 100 (Víctor Segura, genetista de Syngenta, comunicación personal). Se estudiaron 12 cultivares de lechuga romana en tres fechas de plantación, con un total de 9 recolecciones entre los meses de enero-mayo. Los resultados mostraron que no existe correlación entre la longitud total y la longitud del tallo, ya que este último aumentó en las últimas recolecciones y la longitud total no (**Figura 4.2A)**. Sin embargo, la longitud del tallo se correlacionó linealmente con el peso, en particular cuando la longitud estuvo comprendida entre 40 y 80 mm (**Figura 4.2B**). Se observó también una buena correlación con el índice de madurez.

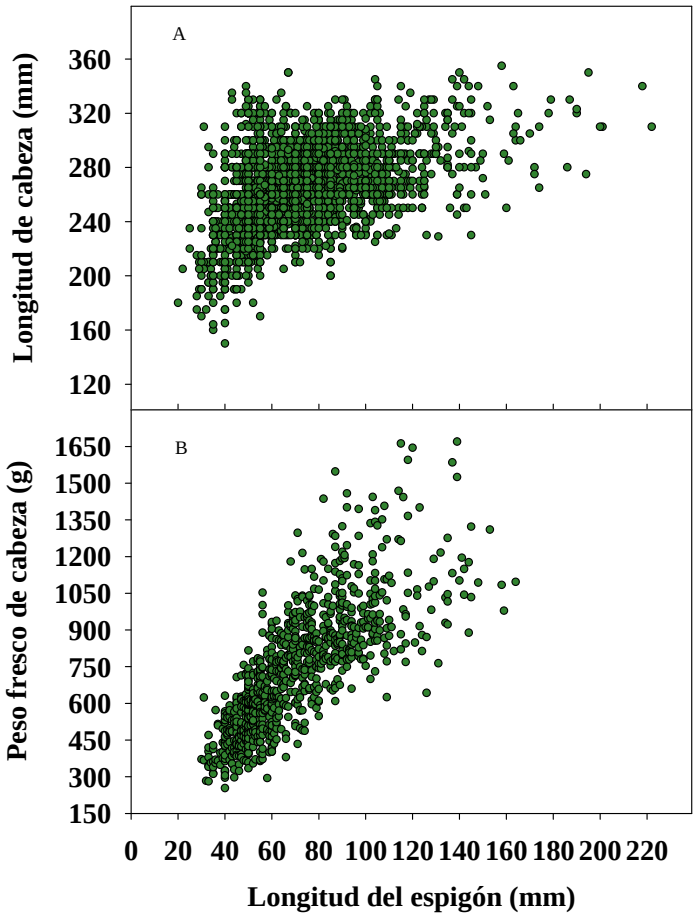


Figura 4.2. En lechuga romana, relación entre la longitud del espigón y la longitud de la cabeza (A) y el peso de la cabeza (B).

El momento de la recolección en un cultivo de lechuga es fácilmente predecible en regiones donde el clima es relativamente uniforme. Generalmente varía de 42 a 49 días de cultivo en verano y de 90 a 100 días en invierno (Rogers y col., 2006). Cuando la recolección se realiza antes de tiempo, se originan bajos rendimientos en la producción y un desarrollo deficiente de los atributos de calidad característicos, mientras que un producto recolectado sobremaduro origina numerosas pérdidas postcosecha (Reid, 2002). Sin embargo, el tiempo es un factor impredecible en otras regiones. Por lo tanto, las técnicas que predicen la fecha de recolección son útiles tanto para la comercialización como para las prácticas agronómicas del este cultivo. Wurr y col. (1988) desarrollaron una técnica para predecir cuando las cabezas alcanzaban el peso o el tamaño adecuado. Encontraron que la mejor predicción podría estar basada en la efectividad de días-grados (EDG), empleando registros de datos de tiempo presente y pasado (1/EDG= 1/DG + a/R) donde DG=días-grados, a es una constante y R=radiación diaria total (Scaife y col., 1987). Sin embargo, las predicciones no pueden estar basadas solamente en el tiempo, por

lo que desarrollaron estudios en la propia lechuga para aumentar la exactitud de las predicciones. Wurr y col. (1992) compararon varios modelos estadísticos para predecir la madurez de la lechuga iceberg y observaron que las predicciones de la madurez basadas en la duración del crecimiento del cultivo desde el trasplante hasta su madurez, definido como una valoración subjetiva de la firmeza, predijo de forma consistente y exacta la madurez comparado con las basadas en la descripción de los cambios en el peso y en el diámetro de la cabeza. Ya que la fecha de madurez está en función de la densidad de cabeza, el peso y el diámetro de cabeza no definen correctamente la madurez de la cabeza. Además, se observa frecuentemente la variación en el peso de cabezas maduras entre variedades. También ha sido estudiada la influencia de la temperatura y la radiación solar en el peso de cabeza (Wurr y col., 1992). Estos resultados mostraron la sensibilidad del cultivo de lechuga a variables medioambientales en estados concretos del cultivo. Además, su análisis nos puede proporcionar una explicación de la variación en la densidad de cabeza y el tamaño observado entre cultivos. Las cabezas más densas se relacionan con bajas temperaturas durante la fase de crecimiento y formación del cogollo, mientras que la densidad de cabeza baja se asocia con exposiciones a altas temperaturas en el mismo periodo y a niveles altos de radiación solar después de la formación del corazón. Las cabezas pequeñas han sido asociadas principalmente con altas temperaturas antes de la formación del cogollo.

La madurez óptima considerada como la relación entre el peso y la longitud del espigón se ha descrito como medida de adaptación durante el crecimiento a días largos y calurosos en lechuga iceberg. De esta forma, valores elevados expresan su facilidad para mantener su ciclo vegetativo, retrasando el espigado mientras que alcanza un rendimiento óptimo (Jenni y Yan, 2009). Los resultados indican que el retraso de la recolección cuando el rendimiento del cultivo es máximo disminuye la calidad de las lechugas (Olfati y col., 2011). Kang y col. (2008) evaluaron el efecto de la madurez sobre la calidad de la lechuga durante la conservación. El deterioro de la lechuga procesada fue mayor en lechugas inmaduras que en las maduras y sobremaduras. Sin embargo, los niveles de pardeamiento fueron mayores en las sobremaduras. La coloración rosada de la costilla, enfermedad fisiológica asociada al estrés por calor en lechuga iceberg, está fuertemente relacionada con la longitud del espigón y de la cabeza así como con el diámetro y el peso, pero no con la densidad del cogollo (Jenni y col.., 2008).

Radicchio (*Cichorium intybus*, L.). La forma de la cabeza es diferente entre variedades, presentando formas largas y cónicas, con hojas estrechas de color rojo; cabezas completamente abiertas, con hojas de color rojo o verde o bien formas redondeadas con hojas rojas (Mencarelli, 2004a). Generalmente, la madurez se establece cuando el producto alcanza el tamaño comercial, basado en el peso de cabeza, hasta un límite aproximado de 75 a 85 días tras la siembra de las semillas (Cantwell y Suslow, 1999) (**Tabla 4.2**). La recolección puede ser muy temprana (45 días), temprana (75 a 90 días) o tardía (120 a 150 días) (Mencarelli, 2004a). Sus características principales son hojas turgentes, costillas blancas y sabor agridulce. La compacidad es importante pero depende de la variedad. Las variedades que necesitan un blanqueamiento se recolectan con sus raíces. Algunas sufren un cambio de color de sus hojas de verdes a rojas o púrpuras durante la madurez o en climas fríos.

Acelga (*Beta vulgaris* L. var. cycla). Sus hojas deben ser firmes, de color verde oscuro, con la costilla y el pecíolo completamente blanco o rojo dependiendo de la variedad (Mencarelli, 2003b). Las hojas con pecíolo suelen medir de 20 a 50 cm de largo. La recolección se realiza manualmente de forma periódica a partir de 60 días después de la siembra. La temporada de cosecha puede durar de 2 a 3 meses en primavera y de 4 a 6 meses durante el otoño e invierno. En algunas ocasiones se realiza la cosecha total de la cabeza.

Espinaca (*Spinacia oleracea subsp.* glabra). Sus hojas deben presentar un color uniforme verde (nunca amarillo verdoso), totalmente turgentes, limpias y libres de daños. Cuando se presentan en manojos, sus raíces deben estar cortadas según las normas establecidas y los pecíolos más cortos que las hojas (Suslow y Cantwell, 2001). La madurez de la espinaca obedece al tamaño de las hojas y al momento de máxima recuperación de hojas sanas y limpias que va desde una madurez intermedia a joven. Las hojas maduras y amarillentas son eliminadas en momento de la recolección (**Tabla 4.2**).

4. INDICADORES DE MADUREZ DE HORTALIZAS DE HOJA PARA LA INDUSTRIA DE IV GAMA

El rendimiento del cultivo y la calidad durante el procesado son los factores más importantes para los productores de IV Gama. Para los productores de lechuga IV Gama, la lechuga debe presentar su madurez óptima puesto que la eficacia se ve reducida si el peso de la cabeza es menor que el mínimo tolerado. Sin embargo, cuando el peso de la cabeza excede de los valores máximos establecidos la lechuga es rechazada debido a la excesiva dureza y sabor amargo de las hojas. Además, cuando la compacidad es elevada, la calidad del proceso disminuye debido al gran tamaño de las piezas y a la dificultad para separar las hojas. Un espigón largo reduce drásticamente el rendimiento de la lechuga procesada incluyendo el coste adicional del cortado a mano (Rogers y col., 2006). Por lo tanto, la variabilidad de las materias primas así como los distintos cultivares, condiciones climáticas y de cultivo y la manipulación durante el pre-procesado influyen en la idoneidad de la lechuga IV Gama (Cantwell y Ermen, 2006; Nicola y col., 2009). Los resultados observados indican que el estado de madurez de lechuga romana influye en la calidad del producto IV Gama, reduciendo la vida útil del producto envasado con el avance del estado de madurez. La incidencia de pardeamiento en el corte fue menor en las cabezas más inmaduras (**Figura 4.3A y B**), aunque al final de la conservación los malos olores fueron significativamente mayores (**Figura 4.3C**). La firmeza disminuyó con la conservación pero se mantuvo mejor en las lechugas más inmaduras (**Figura 4.3D**). Para establecer los criterios más adecuados para evaluar la calidad de la lechuga romana para la industria de IV Gama, se compararon el peso de cabeza y la relación entre la longitud de espigón y la longitud total de cabeza (índice de madurez). Se consideró que una longitud de espigón inferior a 40 mm corresponde a una lechuga romana inmadura mientras que superior a 80 mm a una sobremadura (**Tabla 4.3**). Algunas especificaciones están de acuerdo con nuestras consideraciones y sugieren la longitud del espigón menor a 75-80 mm, rechazando envíos con longitudes mayores (Rogers y col., 2006). Ryder (1999) asoció un espigón largo y contorsionado con temperaturas altas y días largos, recomendando un crecimiento lento para reducirlo.

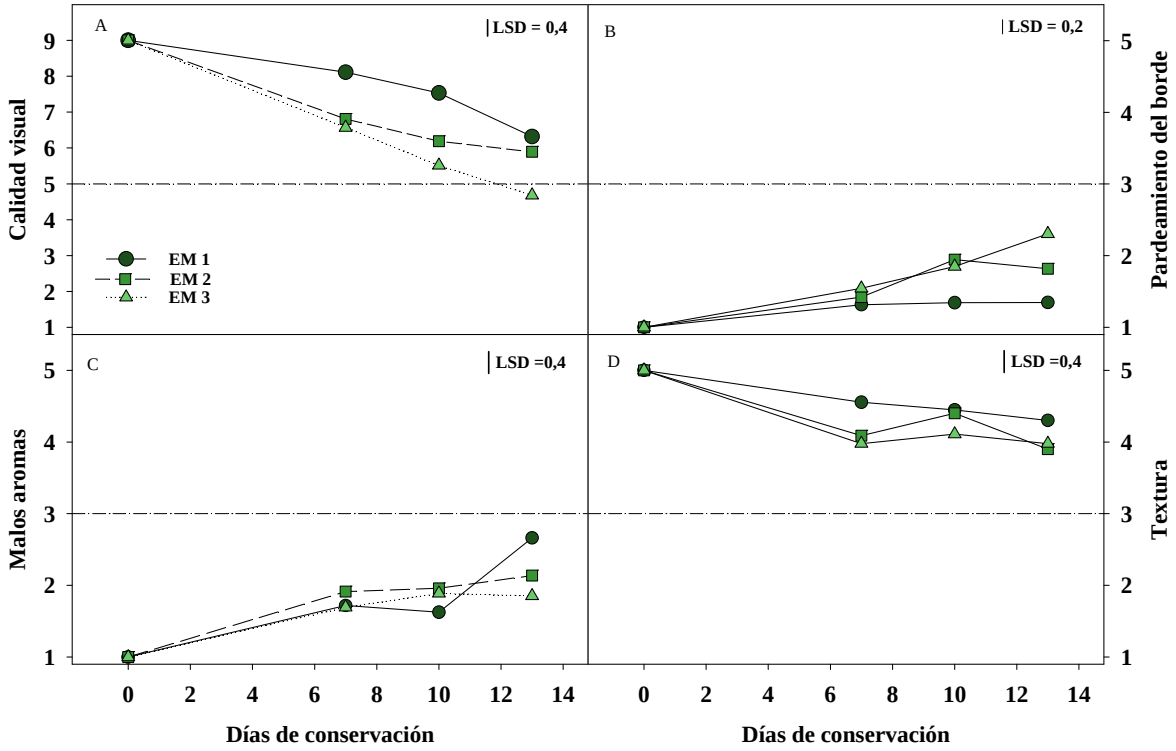


Figura 4.3. Influencia del estado de madurez (EM) basado en la longitud del espigón ($[> 40\ y\ \leq 60\ mm\ EM\ 1], [> 60\ y\ \leq 80\ mm\ EM\ 2]$ y , $[> 80\ mm\ EM\ 3]$ sobre la calidad visual (A) pardeameinto del borde (B), malos olores (C) y textura (D) de lechuga romana fresca cortada conservada durante 3 días a 4ºC y el resto a 7ºC en atmósfera activa (MAP).

En colaboración con productores españoles de IV Gama, hemos recopilado las especificaciones de hortalizas de hoja como materia prima para la industria de IV Gama. En ellas, se han introducido algunos indicadores de madurez óptima para la cosecha como es el peso de cabeza, la longitud de espigón, de la hoja y del peciolo tanto en cabezas de lechuga como en hojas de espinaca y acelga (**Tabla 4.3 y 4.4**).

Tabla 4.3. Índice de madurez de hortalizas de hoja para la industria de IV Gama.

Tipos de lechuga	Peso de cabeza (g)			Longitud máxima del espigón (mm)		Otros parámetros
	Mínimo	**Óptimo**	**Máximo**	**Otoño/Invierno**	**Primavera/Verano**	
Batavia	300	500	650	50	70	
(Trocadero)	300			50	80	Diámetro mínimo: 11cm
Escarola lisa	500	800	1500	50	50	
Escarola rizada	300	600	1000	50	50	Ancho máximo de espigón: 5-15 mm
Iceberg	350-400	500-600		50	50	Compacidad: óptima 3, aceptable 2 y 4 (ver **Figura 4.4**)
Lollo rosso/biondo	180			50	50	
Hoja de roble	180			50	70	
Romana	300-400			50	80	Longitud de cabeza > 20 cm

Figura 4.4. Grados de compacidad de lechuga iceberg.

Tabla 4.4. Índice de madurez de hortalizas de hoja como materia prima para IV Gama.

Madurez de las hojas	**Longitud de la hoja (cm)**		**Peciolo máximo**		**Otros parámetros**
	Mínimo	Máximo	Longitud (cm)	Ancho (mm)	
Espinaca	6	20	6	5	
Acelga	20		15	40	Ancho de hoja: 150-250 mm

Tabla 4.5. Índice de madurez de “brotes” para IV Gama.

Brotes	Longitud de hoja (cm)			Longitud del peciolo (cm)		Otros parámetros
	Mínimo	Óptimo	Máximo	Mínimo	Máximo	
Batavia roja y verde	5	10	12			Ancho de hoja: 7-8 cm
Lollo rosso/biondo				presencia	6	
Acelga roja	5	10	12	presencia	35 % longitud de hoja	Ancho de hoja: 7-8 cm
Mostaza roja	5		8			Ancho de hoja > 7-8 cm
Rúcula	5	10	12	presencia	4-5	Ancho de hoja: 4 cm, anchura peciolo < 3 mm
Espinaca	5	10	12	presencia	35 % longitud de hoja	Ancho de hoja > 7-8 cm
Tatsoi	6	8	12	2	4-5	Ancho de hoja < 7 mm
Berro		8	12			Ancho de hoja: óptimo 40 mm, máximo 60 mm; anchura peciolo: óptimo 2,5-3,5 mm, máximo 4 mm

Los “brotes” recientemente desarrollados como minihojas inmaduras de alta calidad para la industria de IV Gama, incluye hojas de diferentes hortalizas como canónigos (*Valerianella locusta* L.); mizuna (*Brassica rapa* L. *subsp. Japonica*); verdolaga (*Portulaca oleracea* L.); rúcula (*Eruca sativa* Mill., *Diplotaxis tenuifolia* (L.) DC. y *Diplotaxis muralis* (L.) DC.); espinaca (*Spinacia oleracea* L.); nabo (*Brassica rapa* L. Rapa group); brócoli (*Brassica rapa* L. Broccoletto Group); acelga (*Beta vulgaris* subsp. Cicla L.); berro (*Nasturtium officinale* R. Br.) (Wright, 2004; UNECE, 2010). El estado de madurez de estas hojas inmaduras destinadas para IV Gama es un factor crítico que afecta a la calidad y vida útil del producto. La velocidad de deterioro está relacionada con los procesos metabólicos y la tasa de respiración, que son generalmente más altos en estas hojas jóvenes (Martínez-Sánchez y col., 2008). Uno de los beneficios de la lechuga multi-hoja, que son hojas de pequeño tamaño pero adultas cuando se comparan con las hojas de lechuga baby, es el estado de madurez más avanzado que confiere mayor firmeza y vida útil (Martínez-Sánchez y col., 2012). En las especificaciones de brotes como materia prima para la industria de IV Gama, se considera en la cosecha el estado de madurez, la longitud de la hoja y del peciolo y en algunos casos, el ancho de la hoja, como en la lechuga tipo batavia tanto roja como verde (**Tabla 4.5**).

5. CONCLUSIONES

El estado de madurez en la recolección es crítico no sólo para asegurar la calidad del producto durante su vida útil sino también para el procesado en la industria de IV Gama. En el producto comercial, las cabezas inmaduras aumentan la tasa respiratoria y la facilidad al daño mecánico. Las cabezas en su estado óptimo de madurez presentan la máxima vida útil, sin embargo, las sobremaduras sufren daños mecánicos más fácilmente desarrollando el manchado rojizo o “*russet spotting*”, la costilla rosácea o “*pink rib*” así como otras enfermedades fisiológicas. La madurez en la recolección es por tanto uno de los principales factores que determinan la calidad y vida útil del producto fresco cortado. Para la industria de IV Gama, la eficacia del proceso se reduce si las hojas proceden de cabezas inmaduras. La madurez ideal para obtener la máxima calidad del producto fresco cortado es aquella que es necesaria una presión moderada para comprimir la cabeza de lechuga. El producto sobremaduro presenta un sabor fuertemente amargo, hojas duras y una mayor susceptibilidad al pardeamiento, características que pueden causar el rechazo del producto.

CAPÍTULO V

IDONEIDAD DE LECHUGAS MINIHOJAS BABY Y MULTI, DE VARIEDADES VERDES Y ROJAS EN LA INDUSTRIA DE IV GAMA

Martínez-Sánchez, A., **Luna, M. C.**, Selma, M.V., Tudela, J.A., Abad, J., Gil, M.I., 2012. Baby-leaf and multi-leaf of green and red lettuces are suitable raw materials for the fresh-cut industry. *Postharvest Biol. Technol.*, 63, 1-10.

1. RESUMEN

La demanda del consumidor de lechugas con distintas texturas, formas y colores ha impulsado el desarrollo de nuevos productos de lechuga tipo "baby" también conocidas como "brotes" o minihojas jóvenes. El objetivo de este estudio fue la comparación del producto de IV Gama partiendo de distintas materias primas: 1) cabezas enteras de lechuga, 2) mini hojas adultas o "multi" hojas y 3) minihojas jóvenes, "baby" o "brotes". Se cultivaron 3 tipos de lechugas (*Lactuca sativa* L.); de hoja verde, de hoja roja y lollo rosso, las cuales fueron plantadas con distintas densidades de siembra, bajo las mismas condiciones edafoclimáticas, siguiendo prácticas agronómicas comerciales. Aunque las hojas jóvenes fueron sometidas a menor daño que el producto procedente de las cabezas enteras, la madurez de la hoja jugó un papel muy importante aumentando la tasa respiratoria y afectando a la calidad postrecolección. Después de 9 y 11 días de conservación, la lechuga en IV Gama mostró buena calidad visual, sin observarse diferencias entre las distintas materias primas. Sin embargo, a partir de los 12 días, la calidad disminuyó hasta el límite comercial, debido principalmente al pardeamiento en la zona de corte en el producto de IV Gama procedente de cabeza y al ablandamiento en hojas "baby" y "multi". Además, en el procesado de cabezas hay un aumento de la superficie dañada, favoreciendo el crecimiento de bacterias acido lácticas (LAB) y coliformes totales debido a la salida de nutrientes celulares por el corte. Después de 9 días de conservación, la proporción entre la forma reducida y la oxidada de ácido ascórbico (ADHA/AA) aumento 4 veces. Las hojas "baby" presentaron un contenido de compuestos fenólicos mayor que el producto cortado de cabeza alargando la vida útil por encima de los 11 días. En conclusión, las nuevas lechugas "baby" y "multi", verdes y rojas, presentaron una elevada calidad para su comercialización como productos de IV Gama, cumpliendo los requisitos específicos de calidad visual y microbiológica así como un alto contenido en compuestos antioxidantes.

2. INTRODUCCIÓN

Desde su inicio, la industria de IV Gama está en constante evolución desarrollando nuevas variedades. Actualmente la innovación es un factor fundamental para cumplir con las expectativas de los consumidores en términos de comodidad, frescura, sabor y calidad (Floristán, 2009). La lechuga es uno de los productos más importantes en IV Gama y se encuentra entre los vegetales de mayor producción y consumo. Aunque, el tipo iceberg es la materia prima más empleada, se mezcla con otras lechugas de diferentes formas y colores, aportándole un mayor atractivo y aumentando las características de calidad, proporcionando mezclas de variedades de ensaladas desde las llamadas "mesclun" en Francia hasta la "spring mix" en EE.UU (Rijk Zwaan, 2009). Por otra parte, la búsqueda de los consumidores por texturas más suaves y sabores diferentes, ha favorecido el desarrollo de la IV Gama. En este sentido, las hojas "baby" que son hojas jóvenes inmaduras y las hojas "multi" que son hojas maduras, han sido desarrolladas recientemente como variedades de alta calidad para IV Gama. Algunos beneficios del tamaño de estas minihojas comparado con el producto de IV Gama de cabezas incluye: 1) gran eficacia con mayor porcentaje de producto comercial obtenido, 2) procesado más fácil y rápido, 3) presentación más atractiva y 4) mínima oxidación debido al menor diámetro de costilla. Asimismo, las hojas "multi" presentan mayor firmeza que las jóvenes lo cual le puede conferir una vida útil más larga. Sin embargo, las características de calidad y vida útil de estos productos, una vez embolsados no es conocida. Generalmente, es aceptado que el daño fisiológico que ocurre durante el procesado de cabezas causa aumentos en la tasa respiratoria, cambios bioquímicos y deterioro microbiológico, que pueden causar la degradación del color, de la textura y del sabor de lechuga IV Gama así como el desarrollo de pardeamiento durante la conservación (Cantwell, 1996). En el caso de las "baby" el producto puede ser procesado sin apenas preparación ya que las hojas se recolectan intactas. Debido al diámetro pequeño del tallo, es de esperar un menor daño fisiológico y una mínima oxidación respecto a las cabezas. Esto sugiere una conservación más larga de las hojas "multi" en términos de color, contenido nutricional y calidad microbiológica.

Por otra parte, las diferencias en el estado de madurez entre hojas "baby" inmaduras y "multi" maduras, pueden afectar a la vida útil del producto procesado. Las hojas pequeñas rizadas tienen casi el doble de tasa respiratoria que las enteras cuando se almacenan a diferentes temperaturas (Cantwell y Suslow, 2004). Las tasas de

respiración altas indican un metabolismo más activo, que normalmente implica una mayor velocidad de deterioro. Además, pueden ocasionar una pérdida rápida de ácidos, azúcares y otros componentes que determinan la calidad nutricional y sensorial (Cantwell y Suslow, 2002). Sin embargo, el efecto del estado de madurez sobre los compuestos bioquímicos no está descrito en la literatura. En el caso de la espinaca, algunos autores observaron que el estado de madurez intermedio tiene un mayor contenido en compuestos bioactivos (Pandjaitan y col., 2005), mientras que otros estudios mostraron un mayor contenido en antioxidantes en muestras más maduras cuando las compararon con estados "baby" (Zhao y col., 2007). En el caso de la lechuga, algunos autores concluyen que la madurez afecta negativamente al contenido en vitamina C (Drews y col., 1997). Además, la edad de la hoja afecta a la supervivencia y proliferación microbiológica. Brandl y Amundson (2008) observaron que agentes patógenos entéricos podrían proliferar más rápidamente en hojas inmaduras que en las más maduras. Las hojas tipo "baby" podrían ser, por tanto, más apropiadas como materia prima en IV Gama debido a que sufren menor grado de corte, por lo que disminuiría la tasa respiratoria y la aparición de pardeamiento durante la conservación. Sin embargo, debido a una menor firmeza comparada con las hojas "multi", podría ser más difícil el mantenimiento de las propiedades sensoriales, microbiológicas así como en el contenido de constituyentes pigmentados como los antocianos. En este estudio, nuestro objetivo fue aumentar el conocimiento sobre la influencia de la materia prima en la industria de IV Gama, centrándonos en la calidad y vida útil del producto procesado, entendiendo las causas de pérdida de calidad en uno de los productos listo para consumir más demandados "mini hojas de lechugas". Los cambios en la calidad sensorial, fisiológica, microbiológica y nutricional fueron evaluados durante la conservación del producto procesado, en hojas "baby", "multi" y producto cortado de cabezas, tanto verdes como rojas, como materia prima para la industria de IV Gama.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Material vegetal y condiciones de crecimiento

Las lechugas (*Lactuca sativa* L.) de tipo hoja verde, hoja rojo y lollo rosso de Z-Seeds S.L. (Almería) fueron cultivadas bajo condiciones comerciales en Pulpí (Almería) por Primaflor S.A.T. Se empleó un diseño de bloques al azar con tres réplicas por variedad. La siembra de las lechugas minihojas "baby", se realizó directamente en camas usando una densidad de plantación de 800 plantas/ m^2 el 12 de diciembre de

2008. El momento de la recolección se determinó por la longitud total de la hoja, entre 5 y 9 cm, incluido el peciolo. La recolección se realizó mecánicamente el 16 de febrero de 2009, recogiendo 1.5 kg por bloque, con un total de 4.5 kg por variedad. Sin embargo, para las minihojas "multi" y las cabezas, las semillas se sembraron en invernadero el 7 de noviembre del 2008. Las plántulas fueron trasplantadas en el campo después de 35 días, con densidades de 30 m^2 para "multi" y 7 m^2 para cabezas. Las minihojas "multi" se recolectaron justo antes de la formación del cogollo el 10 de febrero del 2009, mientras que las cabezas se recolectaron cuando se formó completamente el cogollo el 17 de marzo de 2009. Para ambos tipos, se cosecharon 15 cabezas por bloque de forma manual. El ciclo de cultivo de minihojas "baby", "multi" y de lechugas de cabeza fue de 66, 95 y 130 días, respectivamente (**Tabla 5.1**). Los datos climatológicos correspondientes al ciclo del cultivo en campo abierto se encuentran en la **Tabla 5.1**. Tanto las lechugas de minihojas "baby" como "multi" se consideran de tamaño "baby", aunque la hoja joven es la llamada "baby" y la madura "multi".

Tras la recolección, las muestras se transportaron refrigeradas al laboratorio CEBAS-CSIC (Murcia), y se almacenaron 24 h a 4 ºC y 70 % HR en oscuridad. Al día siguiente, se realizó la caracterización de la materia prima. Para ello, se midió el peso y la longitud de la hoja. Para el cálculo del contenido en materia seca se emplearon 4 réplicas y para la determinación de la textura 25 hojas. El tamaño de las muestras dependió del tipo de materia prima; en "baby" se tomaron hojas enteras y en "multi" se realizó un solo corte de 13 cm desde el extremo de la cabeza y las cabezas de lechuga se cortaron en rodajas de 30 mm.

Tabla 5.1. Fechas de siembra, trasplante, recolección y ciclos de cultivo, horas de sol, radiación media y neta, temperatura media y lluvias durante el periodo de cultivo minihojas "baby" y "multi" y cabezas de variedades de lechuga verdes y rojas.

Material vegetal	Fecha de Siembra	Fecha de trasplante	Fecha de recolección	Ciclo de cultivo	Media de horas de sol (h/día)	Radiación media (wm^{-2})	Radiación neta (MJm^{-2})	Temperatura media (ºC)	Lluvia (mm)
Minihojas "baby"	12/12/2008	-	16/12/2009	66	7.0	121.7	3.0	8.5	24.2
Minihojas "multi"	07/11/2008	12/12/2008	10/02/2009	95	6.8	117.9	2.8	8.4	24.2
Cabezas	07/11/2008	12/12/2008	17/03/2009	130	7.4	141.4	4.2	9.1	79.0

3.2. Procesado y conservación

El procesado se realizó a 4 ºC en las instalaciones del CEBAS-CSIC. Las hojas dañadas se eliminaron de la materia prima sin ocasionar daños. En las cabezas "multi" se cortó el espigón a 4 cm sobre su base para separar fácilmente las minihojas. Sin embargo, las cabezas se cortaron con una anchura de 30 mm. El procesado se realizó siguiendo las etapas descritas en el capitulo III. Las muestras se envasaron en bolsas de polipropileno (PP) (Amcor Flexibles, Bristol, GB), con una permeabilidad al O_2 de 2.63×10^{-12} mol s^{-1} m^{-2} Pa^{-1} y una permeabilidad al CO_2 de 9.84^{-12} mol s^{-1} m^{-2} Pa^{-1} a 7 ºC y 97% HR. Se envasaron 120 g de producto en bolsas con dimensiones de 230 mm×290 mm en atmósfera pasiva. Se conservaron 3 días a 4 ºC y el resto a 7 ºC en oscuridad. La composición gaseosa del espacio de cabeza, la evaluación sensorial y el contenido de vitamina C y fenoles individuales y totales se evaluaron tras el procesado (día 0) y durante la conservación empleando la metodología explicada en el capítulo III. Para el análisis microbiológico, las muestras fueron analizadas antes, después del procesado y durante la conservación. Las evaluaciones se realizaron en días distintos para cada material vegetal. En minihojas "baby" se evaluaron los días 0, 7, 11, 14, 16 y 18, en "multi" 0, 7, 9, 12, 14, 16 y 19 y en el producto procesado de cabezas los días 0, 8, 10, 13 y 17.

3.3. Composición gaseosa en el espacio de cabeza

El espacio de cabeza (O_2 y CO_2 kPa) fue monitorizado en bolsas individuales, mediante una analizador de O_2 con una célula cerámica de detección electroquímica de óxido de circonio (CG-1000, Ametek, Thermox Instruments Co., Pittsburgh, PA, EE.UU) y un detector infrarrojo de CO_2 (Via 510, Horiba Instruments Co., Irvine, CA, EE.UU). Se tomaron 0.25 ml del espacio de cabeza con una jeringuilla de plástico graduada, a través de un "septum". Todas las muestras se realizaron por triplicado. El calibrado y la comprobación del correcto funcionamiento del analizador y del infrarrojo se realizó mediante el empleo de patrones de concentración conocida de O_2 y CO_2 (Air Liquide S.A., Murcia).

3.4. Evaluación sensorial

La calidad sensorial del producto IV Gama se evaluó inmediatamente tras el procesado y periódicamente por un panel entrenado constituido por un mínimo de 4 evaluadores. Los parámetros estudiados fueron: malos olores, pardeamiento en el corte, pardeamiento en la superficie, textura, sabor y calidad visual general. Se emplearon

diferentes escalas hedónicas explicadas en el capítulo III de esta tesis. Se otorgó el máximo valor de la escala cuando el parámetro evaluado fue el característico del producto, un valor intermedio cuando estuvo en el límite de la vida comercial y el mínimo cuando el producto se encontraba degradado.

3.5. Extracción y análisis de vitamina C

El contenido en vitamina C se calculó siguiendo el método descrito por Gil y col. (1998b, 1999), como la suma de ácido ascórbico (AA) y del ácido dehidroascórbico (ADHA). Para el análisis se emplearon 25 g de tejido comercial. Las muestras fueron analizadas por HPLC (bomba L-6200; Merck-Hitachi, Tokio, Japón), acoplado a un detector ultravioleta-visible (UV-Vis, Merk-Hitachi, L-7420) de longitud de onda variable y un integrador (Merk-Hitachi D-2000A). El análisis por HPLC del ADHA se realizó después de su derivatización a fluoroforo 3-(1,2-dihidroxietil) furol [3,4-b] quinoxalina-1-ona (DFQ) con 1,2-fenilendiamina dihidrocloruro (OPDA) (Zapata y Dufour, 1992). La columna empleada para la separación del DFQ fue una C-18 de fase reversa LiChropher 100 (250 mm x 4 mm; 5 µm de tamaño de partícula; LiChroCART 250-4, Damstadt, Alemania) con una precolumna C-18 (1 x 0.32 cm; 5 µm de tamaño de partícula; LiChroCART 250-4, Damstadt, Alemania). Los patrones empleados, fase móvil, longitud de onda y la velocidad de flujo, han sido descritos en el capítulo III. Los resultados se expresaron en mg por 100g de peso fresco.

3.6. Extracción y cuantificación de compuestos fenólicos

El material congelado y posteriormente liofilizado (0.5 g) fue homogeneizado con una mezcla de MeOH/agua/ácido fórmico (25:24:3, v:v:v) conteniendo NaF. El análisis por HPLC se realizó siguiendo la metodología descrita por Llorach y col. (2008). Las muestras de 20 µL se analizaron por HPLC (bomba L-2130; Merck-Hitachi, Tokio, Japón), acoplado a un detector ultravioleta-visible (UV-Vis, Merk-Hitachi, L-2455) de longitud de onda variable acoplado a un inyector (Merk-Hitachi L-2200). La columna empleada fue una C-18 de fase reversa LiChropher 100 (250 mm x 0.4 mm; 5µm de tamaño de partícula; LiChroCART 250-4, Damstadt, Alemania), usando como fase móvil agua/ácido fórmico (95:5, v/v) (A) y metanol (B). El rango de elución se explica en el capítulo III así como los estándares empleados para la identificación y cuantificación de los compuestos fenólicos individuales. Los resultados se expresaron en mg por 100g de peso fresco.

3.7. Análisis microbiológico

Las muestras vegetales (30 g) se homogeneizaron durante 90 s con 0.1% de agua de peptona tamponada estéril (BWP) (AES Laboratoire, Combourg, Francia) (1:5 dilución), en bolsas de stomacher estériles con filtro (Seeward Medical, Londres, GB) en un stomacher (IUL Instrument, Barcelona) (Allende y col., 2008). La población de mesófilos aerobios totales se cultivó en agar de recuento en placa (PCA) (Scharlau Chemie S.A., Barcelona) incubada a 30 ºC durante 48 h. Las levaduras y los hongos filamentosos se contaron en Rosa de Bengala (RBA) (Scharlau Chemie S.A., Barcelona) a 25 ºC durante 5 a 7 días. Para el recuento de bacterias ácido lácticas (LAB) se empleó agar Man, Rogosa & Sharpe (MRS) (Scharlau Chemie S.A., Barcelona) a 30 ºC durante 48 h. Los coliformes totales y fecales se aislaron en agar cromocult (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, GB) a 37 ºC durante 24 h. Las colonias de *Listeria* spp. fueron enumeradas en el agar selectivo Listeria (Oxford formulation Oxoid, basingstoke, Hampshire, GB) a 37 ºC durante 48 h. Se realizaron tres réplicas por material vegetal y se sembraron por duplicado. La carga microbiológica se expresó como log ufc g^{-1}.

3.6. Análisis estadístico

El análisis de la varianza se realizó con un nivel de significancia de $P < 0.05$, con las variables tipo de material vegetal y genotipo. Cuando se observaron diferencias significativas se realizó el test de Tukey´s usando el programa estadístico PASW Statistics 18 de Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)

4. RESULTADOS

4.1. Características de calidad de minihojas “baby”y “multi” y cabezas de variedades de lechuga de hojas verdes y rojas

La longitud de la hoja fue influenciada por el tipo de material (**Tabla 5.2**). El material procedente de cabezas de lechuga presentó la mayor longitud (16.3 cm) en comparación con las “multi” (10.5 cm) y “baby” (7.1 cm). Sin embargo, no se observaron diferencias en la longitud entre los distintos genotipos en cada estado de madurez (**Tabla 5.2**). El contenido en materia seca se vio afectado por el tipo de material. En general, las cabezas y las “multi” presentaron mayor contenido en materia seca que las “baby” (6.9, 6.7 y 3.4 % respectivamente) pero varió entre los genotipos estudiados (**Tabla 5.2**). Las “multi” y cabezas de tipo hoja verde mostraron significativamente un mayor contenido de materia seca que las “baby” (7.3, 6.5 y 3.6 % respectivamente). Sin embargo, el contenido en materia seca en lollo rosso, fue significativamente mayor en cabezas que en “multi”, y

este a su vez mayor que en “baby” (6.0, 7.4 y 3.0 % respectivamente). En el caso del tipo hoja roja, las “multi” presentaron mayor contenido en materia seca que las cabezas (**Tabla 5.2**). Por otra parte, se observó interacción en la textura entre el genotipo y el tipo de materia prima. El tejido fresco cortado de cabeza presentó mayor firmeza que las minihojas “multi” y “baby” (61.4, 35.1 y 20.1 N, respectivamente), independientemente del genotipo (**Tabla 5.2**). Asimismo, las hojas verdes fueron más firmes que las rojas.

Tabla 5.2. Longitud de hoja, contenido en materia seca y textura de lechugas minihojas "baby", "multi" y cabezas de variedades de lechuga verdes y rojas.

		Longitud de hoja (cm)	Contenido en material seca (%)	Textura (N)
Factores				
Material vegetal	Baby	7.1c	3.4b	20.1c
	Multi	10.5b	6.9a	35.1b
	Cabezas	16.3a	6.7a	61.4a
Genotipo	Hoja verde	10.9	5.8	47.6a
	Hoja roja	11.6	5.8	31.5b
	Lollo Rosso	11.4	5.5	37.8b
Interacción entre material vegetal x Genotipo				
Hoja verde	Baby	6.9c	3.6b	24.1c
	Multi	10.2b	7.3a	41.1b
	Cabezas	15.7a	6.5a	78.2a
Hoja roja	Baby	6.7c	3.7c	15.9c
	Multi	10.5b	7.5a	33.8b
	Cabezas	17.5a	6.1b	44.8a
Lollo Rosso	Baby	7.7c	3.0c	20.5b
	Multi	10.7b	6.0b	30.7b
	Cabezas	15.9a	7.4a	61.8a
Genotipo		ns	ns	***
Material vegetal		***	***	***
Genotipo x Material vegetal		*		**

ns, *, ** y ***, diferencias no significativas o significativas a $P \leq 0.05$, 0.01 y 0.001, respectivamente.

4.2. Cambios en la composición gaseosa del espacio de cabeza durante la conservación en producto procesado en minihojas "baby" y "multi" y de cabezas de lechugas de hoja verde y roja

Se estudió la influencia del tipo de materia prima en el producto procesado envasado en condiciones de atmósfera modificada MAP pasiva analizando los niveles de O_2 y CO_2 de la composición gaseosa del espacio de cabeza de las bolsas de los distintos genotipos (**Figura 5.1**). En general, los valores de O_2 durante la conservación del material procesado, fue menor en "baby" que en "multi" y cabezas. De la misma forma, los niveles de CO_2 fueron siempre superiores en "baby" (**Figura 5.1**). El análisis de la varianza (ANOVA) aplicado a la composición gaseosa entre el día 9 y 11 de conservación, mostró diferencias significativas entre el material y el genotipo sin observarse interacción significativa entre ellos. Después de 9 y 11 días de conservación, los niveles más bajos de O_2 se observaron en los envases de "baby" (6.9 kPa O_2), mientras que los más altos fueron en "multi" y en producto fresco cortado de cabezas (9.6 y 9.2 kPa O_2, respectivamente). Los niveles de CO_2 fueron significativamente mayores en "baby" que en "multi" y material procesado de cabezas (9.0, 7.1 y 8.2 kPa, respectivamente). De la misma manera, el genotipo influyó significativamente la composición gaseosa. Los genotipos de hoja verde y hoja roja mostraron un nivel de O_2 menor que el tipo lollo rosso (8.1, 8.5 y 9.2 kPa, respectivamente) y mayores de CO_2 (8.6, 7.9 y 7.4 kPa, respectivamente).

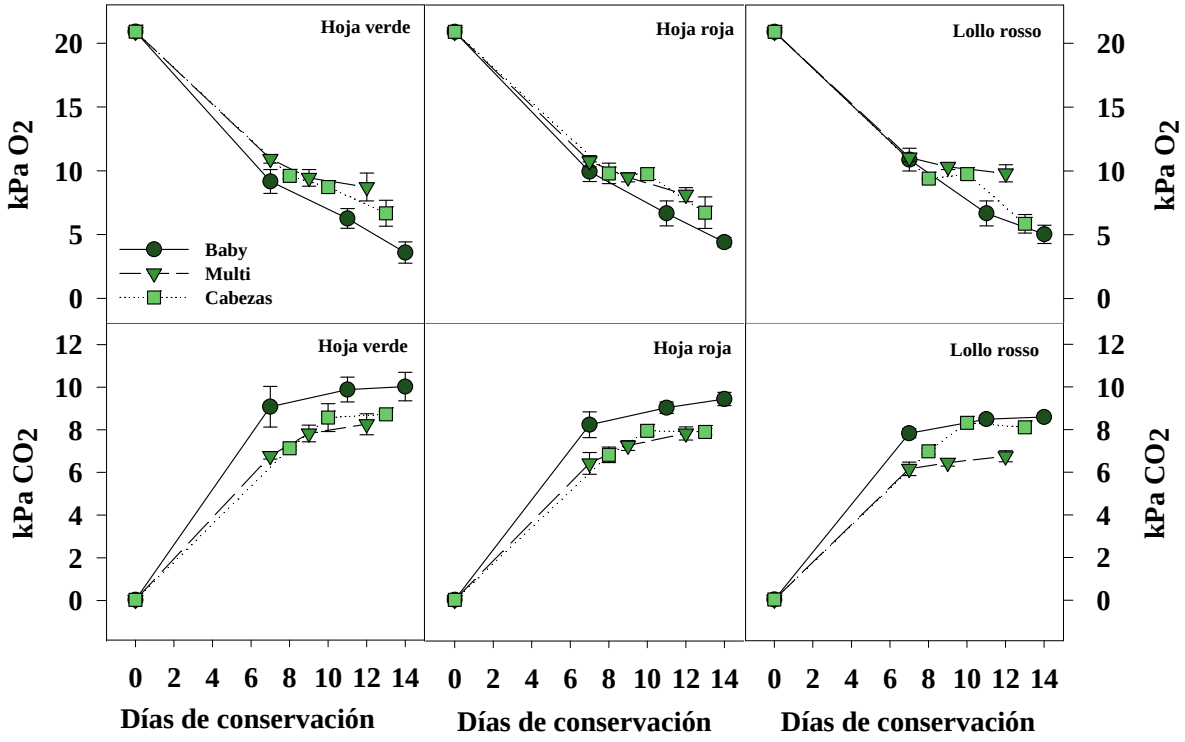


Figura 5.1. Cambios en la composición gaseosa durante la conservación del producto procesado procedente de minihojas "baby" y "multi" y de cabezas de variedades de lechuga verdes y rojas.

4.3. Cambios en la calidad sensorial durante la conservación del producto procesado de minihojas "baby" y "multi" y de cabezas de variedades de lechuga verdes y rojas.

El tipo de material afectó de forma diferente a la calidad visual dependiendo del genotipo. En general, la calidad visual disminuyó durante la conservación, siendo las minihojas "multi" y "baby" las que presentaron siempre de forma significativa, una mejor calidad visual que el producto procedente de cabezas (**Figura 5.2**). El análisis de la varianza (ANOVA) aplicado a calidad visual entre los días 9 a 11 de conservación, mostró que los productos procesados de minihojas "baby" y "multi" mantuvieron mejor la calidad visual que el tejido de cabezas (6.9, 6.6 y 6.2, respectivamente). En el caso de las cabezas, se observó mayor pardeamiento en la zona de corte cuando se comparó con el producto de minihojas "multi" y "baby" (2.4, 1.6 y 1.7 respectivamente). El análisis de la varianza (ANOVA) aplicado al pardeamiento del corte, después de 9 a 11 días de conservación, mostró que el pardeamiento del corte fue significativamente mayor en el tipo hoja verde (2.2) que en los tipos pigmentados, hoja roja y lollo rosso (1.7). En general, el tipo hoja roja presentó mejor calidad visual que los tipos de hoja verde y lollo rosso para el mismo periodo de conservación. En el tipo de hoja verde, la minihoja "baby" mostró mejor

calidad visual después de 9 a 11 días de conservación que la "multi" y que el producto cortado de cabezas. En el tipo hoja roja, las minihojas "baby" y "multi" presentaron significativamente mejor calidad visual que el producto procedente de cabezas. Sin embargo, en el caso de lollo rosso, después de 9 y 11 días de conservación, no se observaron diferencias significativas en la calidad visual entre los tres tipos de materia prima. El bajo pardeamiento desarrollado en el corte del producto procesado de cabezas fue debido a que quedó enmascarado por la pigmentación (**Figura 5.2**).

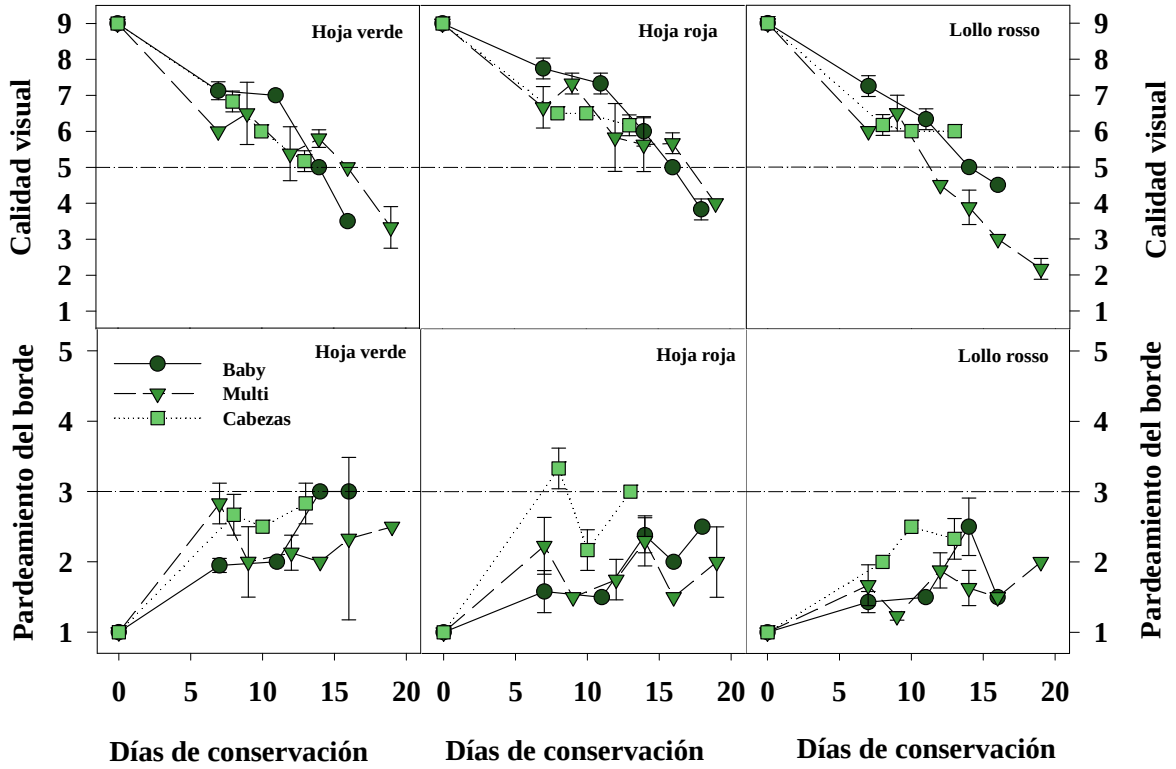


Figura 5.2. Cambios en la calidad visual y en el pardeamiento del borde durante la conservación del producto procesado procedente de minihojas "baby" y "multi" y de cabezas de variedades de lechuga verdes y rojas.

4.4. Cambios en el contenido fitoquímico durante la conservación del producto procesado de minihojas "baby" y "multi" y de cabezas de variedades de lechuga verdes y rojas.

Se observaron diferencias significativas tras el procesado en el contenido de vitamina C entre los diferentes materiales procedentes de los tipos de hoja verde y roja (**Figura 5.3**). El producto procesado de hoja verde "multi" mostró el mayor contenido de vitamina C (31 mg AA y 9 mg ADHA por 100 g), seguido de las minihojas "baby" (16 mg

AA y 6 mg ADHA por 100 g) y de la lechuga cortada de cabezas (14 mg AA y 6 mg ADHA por 100 g). Sin embargo, en el caso de lollo rosso se obtuvieron valores similares entre los tres tipos de material (14 mg AA y 6 mg ADHA por 100 g). Durante la conservación, el contenido en vitamina C disminuyó notablemente, independientemente del tipo de material y genotipo. La relación entre la forma oxidada y la reducida de ácido ascórbico (ADHA/AA) aumentó de 2 a 4 veces después de 9 y 11 días de conservación. Al final del periodo de conservación, los productos procesados de los diferentes materiales alcanzaron valores similares (0.5-3.0 mg AA y 1.2-1.8 mg ADHA por 100 g) (**Figura 5.3**).

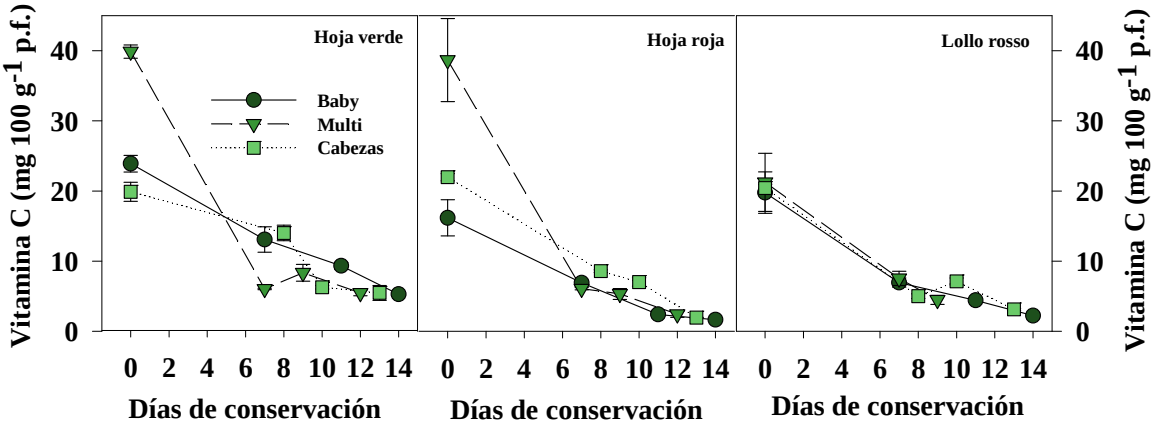


Figura 5.3. Cambios en el contenido de vitamina C durante la conservación del producto procesado procedente de minihojas "baby" y "multi" y de cabezas de variedades de lechuga verdes y rojas.

Cuando se estudió la influencia del tipo de material en el contenido de compuestos fenólicos, se observó que en el momento de la recolección el producto procesado de minihojas "baby" mostró el contenido fenólico mayor comparado con las minihojas "multi" y el producto de cabezas. Inmediatamente después del procesado, en el tipo de hoja verde, el contenido de fenoles totales fue de 510, 400 y 100 mg por 100 g cuando el producto procedía de "baby", "multi" y cabezas respectivamente. En el caso del tipo hoja roja, el contenido de fenoles totales fue de 1160, 675 y 690 mg por 100 g en "baby", "multi" y producto cortado de cabezas, respectivamente y en el caso de lollo rosso, el contenido fenólico total fue 1075, 995 y 690 mg por 100 g en "baby", "multi" y cabezas, respectivamente.

En el caso del tipo de hoja verde, los derivados de ácido caféico fueron los principales compuestos fenólicos (272 mg por 100 g), mientras que los flavonoles fueron los principales en lechugas rojas (691 y 641 mg por 100 g en hoja roja y lollo rosso,

respectivamente). Como era de esperar, los antocianos estaban presentes sólo en las lechugas de genotipos pigmentados (146, 96 y 46 mg por 100 g en “baby”, “multi” y cabezas, respectivamente de hoja roja y 127, 147 y 90 mg por 100 g en “baby”, “multi” y cabezas, respectivamente de lollo rosso).

Durante la conservación, se observó un aumento en el contenido de flavonoles en minihojas “baby”. Este aumento se observó a partir de los 11 días de conservación en el tipo de hoja verde y de 7 días en el caso de las lechugas pigmentadas, hoja roja y lollo rosso (**Figura 5.4**). En el genotipo de hoja verde, se observaron diferencias significativas en la concentración fenólica total entre los distintos materiales al final de la conservación. Asimismo, el mayor contenido fue en “baby”, seguido de “multi” y finalmente del material cortado procedente de cabezas (438, 294 y 151 mg por 100 g, respectivamente). Sin embargo, no se observaron diferencias en el contenido fenólico entre los tres tipos de material de hoja roja después de 13 días de conservación (792, 815 y 703 mg por 100 g, respectivamente).

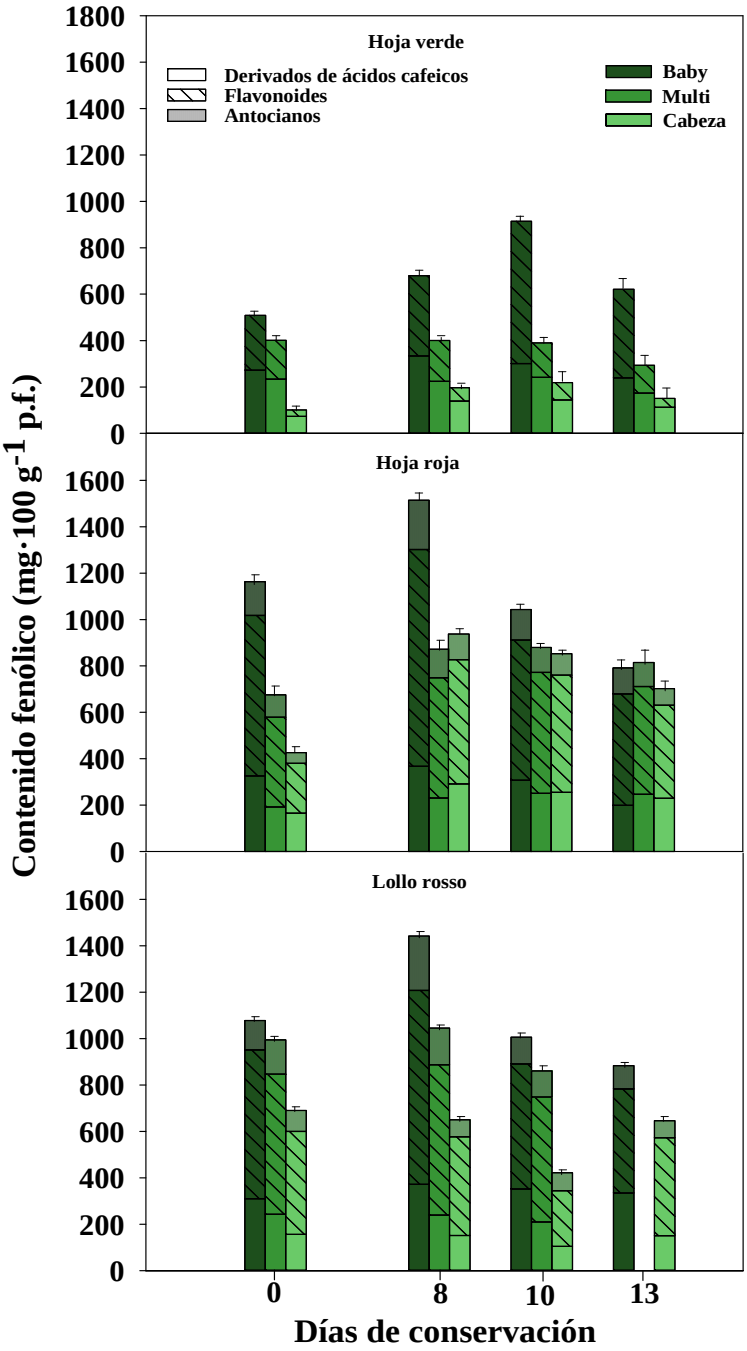


Figura 5.4. Cambios en el contenido fenólico durante la conservación del producto procesado procedente de minihojas "baby" y "multi" y de cabezas de variedades de lechuga verdes y rojas.

4.5. Cambios en el recuento microbiológico durante la conservación del producto procesado procedente de minihojas "baby" y "multi" y de cabezas de variedades de lechuga verdes y rojas.

La comparación del recuento de mesófilos entre los diferentes tipos de material antes del procesado (material no lavado), puso de manifiesto que las minihojas "baby" presentaban 1 log ufc g^{-1} menor que las muestras de "multi", y cabezas para los tres genotipos estudiados (**Figura 5.5**). Después del lavado, la carga microbiana inicial de mesófilos en "baby" disminuyó en 0.4, 1.5 y 1.0 log ufc g^{-1}, mientras en "multi" la disminución fue solo de 1.1, 0.5 y 0.0 log ufc g-^{1} y en cabezas fue de 0.0, 1.8 y 0.0 log ufc g^{-1} en los tipos de hoja verde, hoja roja y lollo rosso, respectivamente (**Figura 5.5)**. Durante la conservación, la carga microbiana de mesófilos aumentó significativamente ($P < 0.05$) en los tres materiales vegetales, alcanzando el mayor recuento en minihojas "baby" y el menor en "multi" de los genotipos rojos al final de la conservación (**Figura 5.5**).

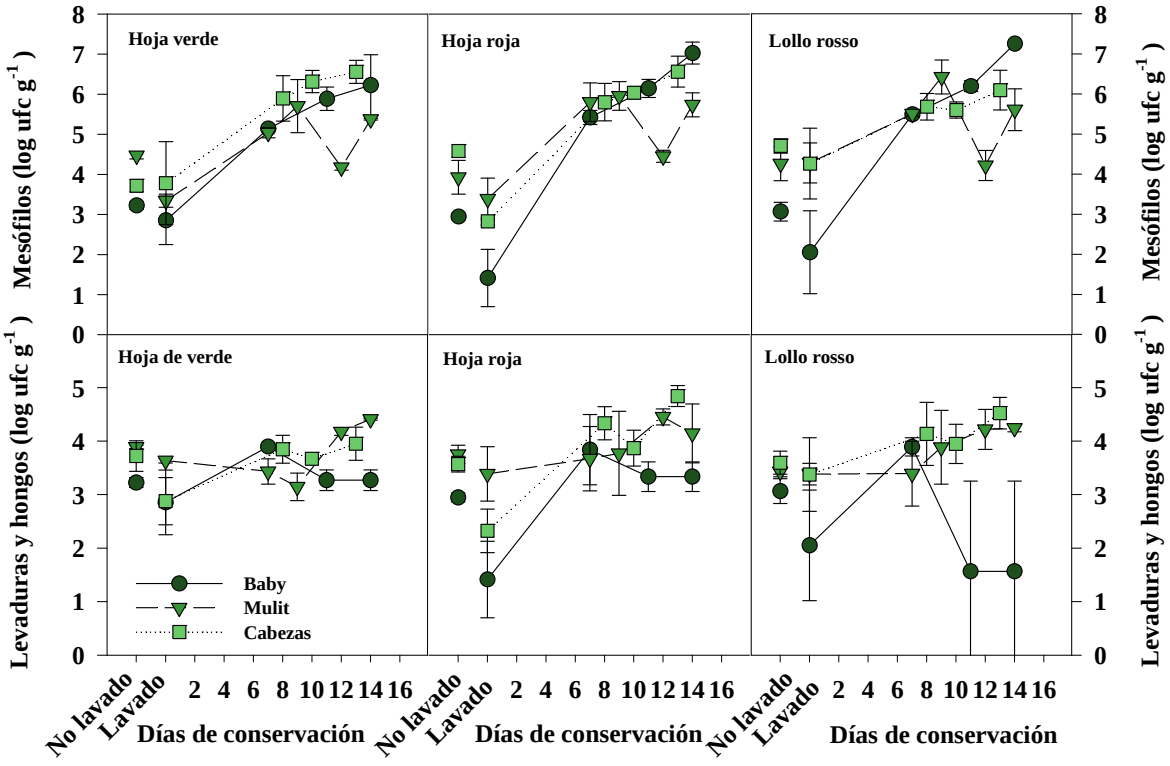


Figura 5.5. Cambios en el recuento de mesófilos, levaduras y hongos filamentosos durante la conservación del producto procesado procedente de minihojas "baby" y "multi" y de cabezas de variedades de lechuga verdes y rojas.

Inicialmente el recuento de levaduras y hongos filamentosos fue mayor en minihojas "baby" no lavadas que en "multi" y cabezas, en un rango de 0.4 a 0.8 log ufc g^{-1} de diferencia en todos los genotipos (**Figura 5.5**). Después del lavado, en todas las muestras la carga microbiana de levaduras y hongos filamentosos disminuyó. Esta disminución fue más notable en el tipo de hoja roja (1.5, 0.4 y 1.2 log ufc g^{-1} menores en "baby", "multi" y producto fresco cortado de cabezas, respectivamente). Durante la conservación, el recuento de levaduras y hongos filamentosos en hoja verde no sufrió prácticamente cambios ya que aumentó menos de 1 log ufc g^{-1}, mientras que en los genotipos rojos aumentó rápidamente (**Figura 5.5**). Al final de la conservación, la carga de levaduras y hongos filamentosos fue siempre menor en minihojas "baby", alcanzando recuentos similares en "multi" y cabezas (**Figura 5.5**).

Antes del lavado, la carga microbiana de bacterias ácido lácticas (LAB) fue inferior en cabezas que en "baby" y "multi" (1.0 y 1.8 log ufc g^{-1} menores, respectivamente) en los tres genotipos (**Figura 5.6**). Después del lavado, el recuento de LAB de "baby" y "multi" disminuyó en 0.6 y 1.3 log ufc g^{-1}, mientras que el material procedente de cabezas no varió (**Figura 5.6**). Durante la conservación, LAB creció rápidamente en el producto procedente de cabezas independientemente del genotipo y permaneció estable en "baby" y "multi". Al final de la conservación, se encontraron diferencias significativas en LAB. El producto procedente de cabezas alcanzó el recuento más elevado en relación con las "baby" (1.5, 2.6 y 2.2 log ufc g^{-1} mayor en hoja verde, hoja roja y lollo rosso, respectivamente) (**Figura 5.6**).

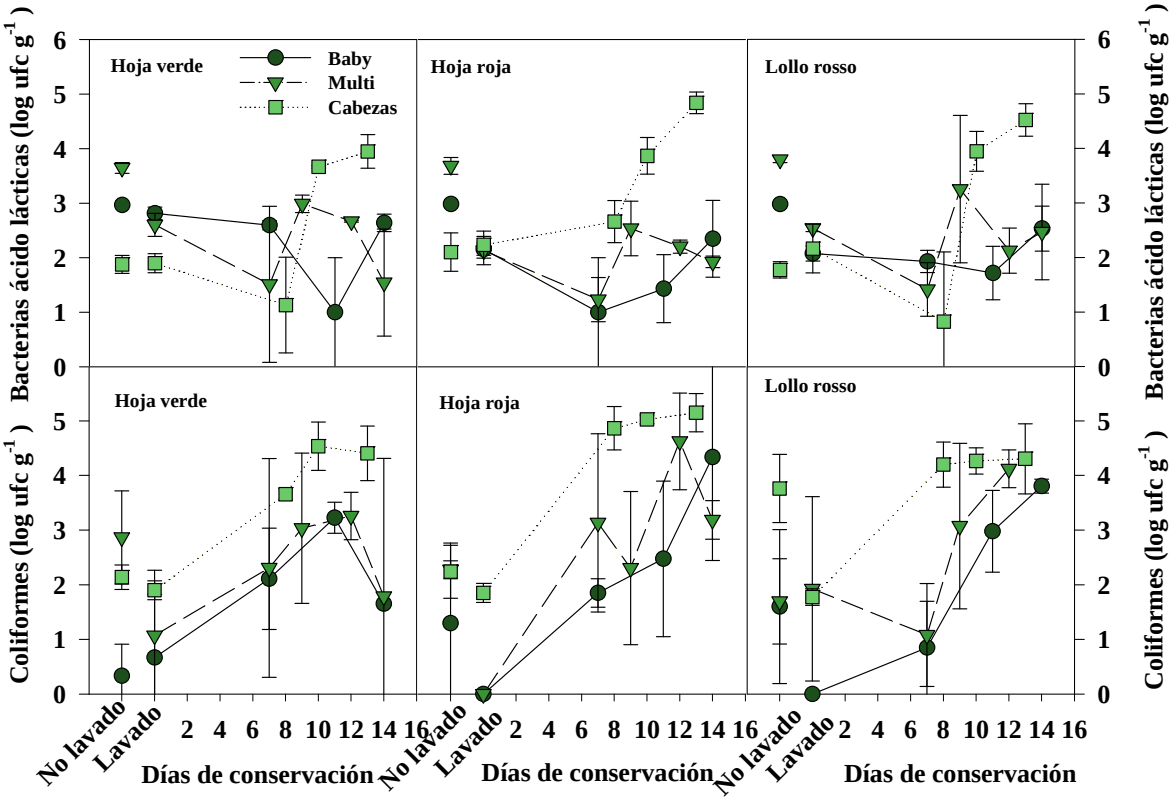


Figura 5.6. Recuento de bacterias ácido lácticas y coliformes totales durante la conservación del producto procesado procedente de minihojas "baby" y "multi" y de cabezas de variedades de lechuga verdes y rojas.

En lechugas de hoja verde, los coliformes totales en muestras sin lavar de minihojas "baby" fueron significativamente menores que en "multi" y cabezas (0.3, 2.9 y 2.1 log ufc g^{-1}, respectivamente). Sin embargo, en los genotipos rojos, el recuento en "baby" fue similar a los otros materiales empleados (**Figura 5.6**). Después del lavado, se encontró una reducción logarítmica en hoja verde de 0.0, 1.8 y 0.2 en "baby", "multi" y cabezas, respectivamente, mientras que en hoja roja fue de 1.3, 2.3 y 0.4 (en "baby", "multi" y cabezas, respectivamente) y finalmente en lollo rosso 1.6, 0.8 y 2.0 (en "baby", "multi" y cabezas, respectivamente). Durante la conservación, la población de coliformes aumentó notablemente, particularmente en el caso de lechugas cortadas de hoja verde, aunque se observó una alta variabilidad entre réplicas de "baby" y "multi" (**Figura 5.6**). Los recuentos de coliformes fecales y *Listeria spp.* estuvieron por debajo del límite de detección (< 1 log ufc g^{-1}).

5. DISCUSIÓN

La respuesta al corte es un factor clave para mantener la calidad del producto IV Gama. Sin embargo, el estado de madurez puede contribuir a la fisiología del producto y por tanto, en la vida útil del producto cortado. Las lesiones fisiológicas causadas por el procesado aumentan la velocidad de las reacciones bioquímicas responsables de los cambios en la calidad visual, incluyendo el pardeamiento y el contenido de fitoquímicos (vitamina C y fenoles) (Salveit, 2003). En la preparación de las lechugas comerciales de cabezas, el daño fisiológico de los tejidos ocurrió debido al cortado. Esto probablemente causó un aumento en la tasa respiratoria, disminuyendo la concentración de O_2 y aumentando el CO_2. En el caso de minihojas "baby" y "multi", la lesión sólo se realizó durante la recolección. Sin embargo, la tasa respiratoria de las minihojas "baby" particularmente de los tipos de hoja verde y roja, fue significativamente mayor que las minihojas adultas "multi". Por lo tanto, los tejidos inmaduros jóvenes tienen mayor tasa respiratoria que las hojas adultas desarrolladas. Una tasa de respiración alta significa una mayor actividad metabólica, resultando normalmente en una aceleración del deterioro. Cantwell y Suslow (2002) observaron que tejidos maduros cortados tienen aproximadamente el doble de tasa respiratoria que las cabezas intactas. En nuestro estudio, observamos mayor influencia en la tasa respiratoria del estado de madurez que del daño producido durante el procesado. Este factor tiene gran implicación en la calidad y vida útil de la lechuga fresca cortada como se discute a continuación. La atmósfera modificada varió entre las muestras de diferentes materias primas. En el caso de lechuga cortada procedente de cabezas, la atmósfera controló eficazmente el pardeamiento del corte, siendo diferente a la recomendada en hojas jóvenes (Ballantyne y col., 1988; Cantwell y col., 1998).

Bajo la misma atmósfera MAP pasiva, las cabezas desarrollaron más pardeamiento en el corte que las muestras jóvenes. Observamos una mínima oxidación en lechugas jóvenes debido al pequeño tamaño del tallo. La calidad sensorial de los productos no varió significativamente entre los diferentes tipos de material después de 9 y 11 días de conservación. Sin embargo, después de este periodo, la textura blanda de las minihojas "baby" no fue capaz de mantenerse durante la conservación, reduciendo la vida útil comparadas con el producto cortado procedente de cabezas. Al final de vida útil de minihojas "baby" es característico el ablandamiento, la podredumbre blanda y el pardeamiento.

Para la obtención de un producto fresco cortado de calidad es necesario que la materia prima inicial presente una alta calidad (Cantwell, 2004). En nuestro estudio, todos los productos procesados mostraron alta calidad después de 9 y 11 días de conservación, sin apreciarse diferencias entre ellos. Sin embargo, por encima de los 12 y 14 días conservación, la calidad disminuyó hasta el límite comercial debido principalmente al pardeamiento en la zona de corte en cabezas y al deterioro de los tejidos blandos en las hojas jóvenes. Las diferencias en materia seca y textura entre las hojas jóvenes no influyo en la calidad visual y vida útil del producto. El deterioro de lechugas tipo "baby" fue el mayor defecto después de 12 días de conservación, aunque nunca fue valorado por debajo de 3, observándose variabilidad entre los materiales vegetales. Sólo de forma ocasional, se encontraron algunas piezas pequeñas muy blandas. El desarrollo de malos olores sólo se detectó a partir de los 13 días de conservación en el producto procesado de cabezas, ya que los malos olores son un problema típico en la lechuga IV Gama (López-Gálvez y col., 1997).

Los nuevos hábitos de consumo relacionados con alimentos saludables, han promovido el auge a nivel mundial de minihojas tipo "baby" como fuente natural de compuestos antioxidantes como vitamina C y fenoles. Los resultados muestran que la vitamina C, principalmente AA, está asociada a la resistencia de alteración del color y la protección de fenoles frente a las oxidaciones durante un tiempo determinado en la conservación (12 días aproximadamente). En lechugas de hoja verde, el AA ha sido descrito como el principal compuesto responsable del control de especies reactivas de oxígeno después del cortado (Degl´Innocenti y col., 2007). De hecho, en tejidos con niveles bajos de AA, el AA es consumido rápidamente y los fenoles pasan a utilizarse para el control de los radicales libres. En nuestro estudio, la relación ADHA/AA aumentó durante la conservación. El pardeamiento causado por PPO puede ser retrasado el tiempo que permanezca el AA en las muestras para oxidar las quinonas a fenoles (Heimdel y col., 1995). Las hojas de lechuga joven están más expuestas a la luz, por tanto, sus compuestos antioxidantes son capaces de tener un efecto foto-protector bajo condiciones lumínicas excesivas (Zhou y col., 2009). Sorprendentemente, nuestros resultados muestran, un descenso más rápido de los compuestos antioxidantes en lechugas jóvenes que en el producto cortado de cabezas.

En la actualidad, los agricultores muestran un gran interés por el aumento en los compuestos antioxidantes de la lechuga, para mejorar las propiedades saludables del producto y satisfacer así la demanda de los consumidores. Los diferentes tipos de material y genotipos mostraron diferencias en los contenidos fenólicos. Estudios anteriores han demostrado, que el daño por corte aumenta el metabolismo fenólico en el tejido vascular de la lechuga, provocando una acumulación de compuestos fenólicos que posteriormente se oxidan ocasionando el pardeamiento en los tejidos (Tomás-Barberán y col., 1997; Ferreres y col., 1997). Nuestros resultados, corroboraron que el producto procesado de minihojas "baby" contenía mayor concentración de fenoles que el producto de "multi" y cabezas, y muestran al genotipo como primer factor en la variabilidad de la concentración de antioxidantes. El contenido en flavonoides y derivados de ácido cafeico fue mayor en los genotipos rojos estudiados, mientras que el genotipo de hoja roja presentó más antocianos, de acuerdo con otros trabajos publicados (Dupont y col., 2000, Nicolle y col., 2004; Llorach y col., 2008). Por este motivo, las lechugas rojas presentaron menos pardeamiento debido al efecto enmascarador de los antocianos. La selección de los genotipos rojos, hoja roja y lollo rosso con alto contenido de antioxidantes, podrían mejorar la respuesta al procesado mínimo, manteniendo la calidad nutricional del producto.

Por otra parte, el aumento de la superficie lesionada por el corte y la disponibilidad de los nutrientes celulares proporcionan condiciones que favorecen el crecimiento de LAB y coliformes totales, comparado con superficies no cortadas de las hojas jóvenes (Nou y Luo, 2010). Resultados similares se han descrito, donde los tejidos sanos son peores sustratos para el oportunismo microbiológico y tejidos dañados promueven un rápido deterioro, ya que proporcionan más sustratos a la población microbiana (Zagory, 1999). El contenido en humedad, puede ser uno de los factores más críticos para la duración de la vida útil en lechugas tipo "baby", porque la calidad y seguridad microbiológica puede ser afectada si no se elimina el exceso de agua después del lavado. Sin duda, el riesgo del crecimiento de bacterias patógenas puede aumentar con alta HR, baja concentración de O_2 y alta temperatura (> 5 ºC) (Cantwell y Suslow, 2002). En nuestro estudio, la alta humedad en minihojas "baby" y "multi" aumentó el recuento de coliformes pero no de LAB. Como en el caso de coliformes, el crecimiento de mesófilos no estuvo deprimido por MAP, siendo nuestros valores algo mayores que los obtenidos por López-Gálvez y col., (1997) para ensaladas comerciales. Estudios anteriores, para la selección de variedades de lechugas, mostraron una correlación entre la mala apariencia, caracterizada por el

pardeamiento, el ablandamiento, la podredumbre y el recuento microbiológico al final de vida útil (Zhang y col., 2007).

6. CONCLUSIONES

A la vista de los resultados presentados, podemos concluir, que el tipo de materia prima puede influir en la calidad del producto procesado. Se observaron algunas diferencias en calidad visual y microbiológica, así como en el contenido en fitoquímicos. Las lechugas minihojas "baby" presentaron la mejor calidad. Sin embargo, los datos sugieren no exceder el tiempo de conservación de 12 días en producto procesado procedente de cabezas, debido al desarrollo del pardeamiento y a la pérdida de textura y deterioro de las minihojas, independientemente del genotipo. Se recomienda el desarrollo de variedades de minihojas tipo "multi" y "baby" (maduras y jóvenes) por las excelentes características sensoriales y nutricionales del producto procesado. Dichas variedades reúnen los requerimientos para IV Gama respecto a la excelente calidad visual, baja carga microbiana y alto contenido en compuestos fitoquímicos.

CAPÍTULO VI

INFLUENCIA DE LAS SOLUCIONES NUTRITIVAS EN CULTIVO SIN SUELO EN CAMPO ABIERTO EN DIFERENTES ESTACIONES, EN LA CALIDAD Y VIDA ÚTIL DE LECHUGAS VERDES Y ROJAS EN IV GAMA

Luna, M. C., Martínez-Sánchez, A., Selma, M.V., Tudela, J.A., Beltrán, D., Baixauli, C., Gil, M.I., 2012. Influence of nutrient solutions in open field soilless system on the quality characteristics and shelf life of the fresh-cut red and green lettuces (*Lactuca sativa* L.) in different seasons". *J. Sci. Food Agric*., en prensa.

1. RESUMEN

Las soluciones nutritivas evaluadas para la producción de lechuga en un sistema de cultivo sin suelo no influyeron en la calidad y vida útil del producto en IV Gama. Cuando la concentración iónica fue aumentando, el peso fresco fue disminuyendo aunque dependió del genotipo y de la fecha de recolección. El índice de madurez y el contenido en materia seca varió según la estación de cultivo pero fue independiente de la solución nutritiva aplicada. En verano, el índice de madurez fue mayor, sin embargo, el contenido en materia seca fue menor que en invierno. La solución nutritiva aportada no influyó en la textura y calidad visual del producto en IV Gama. La concentración iónica media mejoró el contenido en vitamina C y en compuestos fenólicos. Observamos que el genotipo tuvo una gran influencia en la vida útil del producto en IV Gama, influyendo en menor grado las soluciones nutritivas aportadas. En general, los genotipos rojos mostraron un contenido mayor en antioxidantes, ayudando al mantenimiento de la calidad sensorial durante la conservación.

2. INTRODUCCIÓN

La optimización del manejo de los fertilizantes es esencial para mejorar la producción y la calidad de la lechuga y reducir al máximo el coste de producción. En el sistema de cultivo tradicional en suelo, se ha demostrado que la producción de lechuga necesita unos niveles de nitrógeno (N_2), calcio (Ca^{2+}) y potasio (K^+) adecuados para proporcionar una calidad elevada durante la vida útil (Nicola y col., 2007; Hoque y col., 2010). Por ejemplo, los niveles de N_2 altos ocasionan enfermedades, acelerando el deterioro durante la postcosecha (Hoque y col., 2010), disminuyendo los niveles de azúcares, vitamina C y materia seca en el vegetal. Por el contrario, un déficit de N reduce el crecimiento en el cultivo de lechuga. El K^+ está involucrado en el cierre estomático; un déficit de K^+ aumenta la susceptibilidad frente a patógenos, además de interferir en la absorción del Ca^{2+} y del magnesio (Mg^{2+}) (Nicola y col., 2007).

En Europa, la mayoría de los vegetales para IV Gama son cultivados en sistema sin suelo. Este es un sistema altamente productivo en el que se ha demostrado en algunos productos que aumenta la vida útil tras el procesado y la conservación (Fontana y col., 2003; Nicola y col., 2004). El cultivo sin suelo permite el control nutricional de la planta, maximiza el rendimiento y minimiza el efecto de la contaminación ambiental (Savvas y Adamidis, 1999). La concentración total de nutrientes en la solución empleada en el

cultivo sin suelo es uno de los aspectos más importantes para asegurar el éxito de la producción de lechuga. Los niveles altos de nutrientes inducen estrés osmótico, toxicidad iónica y desequilibrio nutricional, mientras que los niveles bajos conducen generalmente a una nutrición deficiente (Fallovo y col., 2009). Los sistemas sin suelo han sido adoptados en investigación para conocer el efecto salino en lechugas "baby" debido a la precisión en el control nutricional. Algunos de estos resultados han mostrado que soluciones nutritivas con alta conductividad eléctrica (CE) mejoran la calidad y la vida útil de lechugas "baby" (Scuderi y col., 2011), aumentando el contenido mineral en la hoja (Fallovo y col., 2009) y reduciendo las actividades de enzimas oxidativos (Chisari y col., 2010). Aunque algunos estudios indican que los nutrientes pueden afectar a la calidad de la lechuga (Cuppett y col., 1999; Tittonell y col., 2001; Hoque y col., 2010), es escasa la información sobre la influencia del cultivo sin suelo en campo abierto en la calidad de la lechuga IV Gama (Chiesa y col., 2009; Hilton y col., 2009). Es indiscutible que la calidad de la materia prima debe ser excelente para asegurar un producto en IV Gama perfecto. La selección del cultivar es un factor importante en la industria de IV Gama debido a que las características como el color, la forma, la frescura, la textura y el potencial de pardeamiento pueden variar dependiendo del genotipo (Nicola y col., 2009). El objetivo de este trabajo fue el estudio de la influencia de diferentes soluciones nutritivas en las características de calidad de tres genotipos de lechuga, incluyendo lechugas de hoja verde y roja, cultivadas en un sistema sin suelo en campo abierto y la evaluación de la vida útil del producto en IV Gama.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

Se estudiaron 3 genotipos de lechuga (*Lactuca sativa* L.); 2 rojos (lollo rosso cv Evasion de Seminis y hoja de roble cv Jamai de Rijk Zwaan) y uno verde (trocadero cv Daguan de Syngenta): Las lechugas fueron cultivadas en la finca experimental de la Fundación Ruralcaja en Paiporta (Valencia). Para el ensayo se empleó un área de 425 m^2, distribuida uniformemente para cada genotipo. Las lechugas se cultivaron en dos periodos distintos, recolectando material en verano y en invierno. Las semillas se plantaron en un invernadero con temperaturas de 31.9/ 19.8 ºC (día/noche) en el cultivo de verano y 22.9/13.8 ºC (día/noche) en el cultivo de invierno. El trasplante se realizó 30 días después de la siembra de las semillas en un cultivo sin suelo desarrollado por New Growing Systems S.L. (NGS™, Almería) (Patente nº 2.221.636/7). Este sistema consistió en una bolsa de plástico de 12 m de longitud que actúa de soporte del cultivo y acumula el exceso de agua gracias a su capa inferior (**Fotografía 6.1**). Este sistema se encuentra apoyado

sobre una estructura de hierro que da forma a las múltiples capas de plástico fijadas a él a través de clips. La estructura de hierro se colocó sobre soportes telescópicos para facilitar la labor. Se dispuso de forma que la pendiente fue del 2 % para asegurar el retorno del agua al tanque de recirculación. Cada bloque de cultivo constaba de 5 líneas de 12 m de longitud, con 40 plantas por línea (10 plantas/ m^2). La separación entre plantas fue de 0.3 m. El área dedicada a cada genotipo fue la misma.

Fotografía 6.1. Plantación del cultivo sin suelo.

Se compararon tres soluciones nutritivas; baja, media y alta concentración iónica, en las cuales se varió el macroanión (NO_3^-) y los macrocationes (K^+, Ca^{2+} y NH_4^+) (**Tabla 6.1**). Los distintos aportes de macro y micronutrientes dieron lugar a distintas CE de las soluciones nutritivas, 1.4, 1.9 y 2.4 dS m^{-1} para la concentración iónica baja, media y alta, respectivamente. Para la preparación de las soluciones nutritivas se empleó agua destilada a pH 6.5. Las condiciones climatológicas en campo abierto fueron de 29.4/ 19.8 ºC (día/noche) en el cultivo de verano y 16.2/ 5.1 ºC (día/noche) en invierno. Los bloques se designaron al azar con tres réplicas por solución nutritiva y genotipo en ambas estaciones de cultivo. Las muestras se recolectaron 33 días después del trasplante en verano y 96 días en invierno, cumpliendo con el peso mínimo comercial establecido para cada genotipo (180 g para lollo rosso y hoja de roble y 300 g para trocadero). Para la obtención de las muestras se recolectaron 30 cabezas por tratamiento (10 cabezas por bloque). Las hojas exteriores se eliminaron siguiendo las operaciones comerciales estandarizadas para la recolección. Las muestras se transportaron (200 km) en un vehículo refrigerado al laboratorio del CEBAS-CSIC (Murcia) y se almacenaron a 4 ºC y 70 % de humedad relativa (HR) en oscuridad hasta la mañana siguiente. Antes del procesado, se caracterizó

la materia prima, midiendo la longitud de la cabeza y del espigón así como el peso. El índice de madurez se calculó como la longitud del espigón/longitud total x 100 según lo indicado en el capítulo de Materiales y Métodos. Los resultados mostrados son la media de los resultados de las estaciones de verano e invierno.

Tabla 6.1. Características de las soluciones nutritivas.

	Concentración iónica		
	Baja	Media	Alta
pH	6.55	6.55	6.55
CE (dS m^{-1})	1.40	1.90	2.40
Soluble-Cl^-	2.96	2.96	2.96
Mg^{2+}	1.48	1.48	1.48
Na^+	2.31	2.31	2.31
K^+	1.63	5.03	9.13
Ca^{2+}	3.37	4.05	4.50
NH_4^+	1.05	1.14	1.23
NO_3^-	5.05	10.05	15.05
HCO_3^-	0.47	0.47	0.47
$H_2PO_4^-$	1.55	1.55	1.55
SO_4^{2-}	2.48	2.48	2.48

Los valores son expresados en mmol L^{-1}

3.1. Procesado, envasado y conservación

El procesado de las cabezas se realizó en condiciones higiénicas descritas en el capítulo III. Para el envasado se empleó una envasadora vertical (modelo Etna 280-X, Ulma, Oñati) y un plástico de polipropileno (PP) (Amcor Flexibles, Bristol, GB) con una permeabilidad al O_2 de 2.63 pmol $s^{-1}m^{-2}$ Pa^{-1} y de 9.84 pmol s^{-1} m^{-2} Pa^{-1} para el CO_2 a 7 ºC

y 97 % de HR. El tamaño de los envases fue de 230 x 320 mm. La lechuga lollo rosso (125 g) se envasó en aire creando una atmósfera modificada MAP pasiva como consecuencia de la tasa respiratoria del producto y la permeabilidad de la película plástica. Las lechugas hoja de roble (125 g) y trocadero (200 g) se envasaron en atmósfera MAP activa creada por inyección de N_2 para reducir la concentración de O_2 a 0.5-2 kPa, aproximadamente. La elección de la atmósfera de conservación se realizó siguiendo las especificaciones comerciales para cada genotipo. Todas las muestras se conservaron 3 días a 4 ºC y el resto a 7 ºC en oscuridad.

Para determinar el contenido en materia seca, se empleó tejido comercial sin lavar, secándolo en una estufa de aire forzado a 65 ºC hasta peso constante. Las muestras se pesaron antes y después del secado, y a partir de estos pesos se calculó la relación del peso seco y el peso fresco. Se emplearon 4 réplicas de 15 g de tejido comercial por solución nutritiva. Los resultados son la media de los datos obtenidos en las estaciones de verano e invierno.

La textura se midió empleando una célula Kramer con cinco cuchillas (HDP/KS5) conectada a un analizador de textura (TA.TX.plus, Stable Micro Systems, GB) como se describe en el capítulo III. Los resultados se obtuvieron de 20 réplicas por solución nutritiva y son la media de los valores obtenidos en las estaciones de verano e invierno.

3.2. Composición gaseosa del espacio de cabeza

Los cambios en la composición gaseosa (O_2 y CO_2 kPa) fueron seguidos en las bolsas individuales, usando una analizador de O_2 provisto de una célula cerámica de detección electroquímica de óxido de circonio (CG-1000, Ametek, Thermox Instruments Co., Pittsburgh, PA, EE.UU) y un detector infrarrojo de CO_2 (Via 510, Horiba Instruments Co., Irvine, CA, EE.UU). Se tomaron muestras de 1 mL del espacio de cabeza del envase a través de un septum. Se emplearon de 3 a 5 bolsas por solución nutritiva. Los resultados corresponden a la estación de invierno.

3.3. Evaluación sensorial

La calidad sensorial de la lechuga IV Gama se evaluó inmediatamente tras el procesado y periódicamente durante la conservación por un panel entrenado constituido por un mínimo de cuatro evaluadores. Los parámetros estudiados fueron: malos olores,

pardeamiento en el corte, pardeamiento en la superficie, textura, sabor y calidad visual general. Se emplearon diferentes escalas hedónicas descritas en el capítulo III. Se otorgó el valor máximo de la escala cuando el parámetro evaluado era el característico del producto, un valor intermedio cuando estaba al límite de la aceptación y el mínimo cuando era inaceptable. Los resultados corresponden a la estación de invierno.

3.4. Extracción y cuantificación de vitamina C

El contenido en vitamina C, como suma de los contenidos en ácido ascórbico (AA) y ácido dehidroascórbico (ADHA), fue determinado siguiendo el protocolo de Gil y col., (1998b; 1999) con algunas modificaciones (Llorach y col., 2008). Se analizaron 20 µL del extracto por HPLC (Merck-Hitachi, Tokio, Japón). La separación se llevó a cabo con una columna C-18 (250 mm x 4 mm x 5 µm de tamaño de partícula, LiChropher® 100, Barcelona). En el capítulo III se describen los patrones, la fase móvil, la velocidad de flujo y las longitudes de onda empleadas. Los resultados fueron expresados en mg por 100 g de peso fresco y proceden de la media de datos de la estación de invierno.

3.5. Extracción y cuantificación de compuestos fenólicos

Las muestras de lechuga IV Gama congeladas y posteriormente liofilizadas (0.5 g) se homogeneizaron con una mezcla de MeOH/agua/ácido fórmico (25:24:3, v:v:v) conteniendo NaF. El análisis por HPLC se realizó siguiendo la metodología descrita por Llorach y col. (2008). Las muestras (20 µL) se analizaron en un HPLC (bomba L-2130; Merck-Hitachi, Tokio, Japón), acoplado a un detector ultravioleta-visible (UV-Vis, Merk-Hitachi, L-2455) de longitud de onda variable y a un inyector (Merk-Hitachi L-2200). La columna empleada fue una C-18 de fase reversa LiChropher 100 (250 mm x 4 mm; 5µm de tamaño de partícula; LiChroCART 250-4, Damstadt, Alemania), usando como fase móvil H_2O/ácido fórmico (95:5, v/v) (A) y MeOH (B). El rango de elución se describe en el capítulo III, además de los patrones empleados para la identificación y cuantificación de los compuestos fenólicos individuales. Los resultados fueron expresados en mg por 100 g de peso fresco, y proceden de la media de datos de la estación de invierno.

3.6. Análisis estadístico

Los datos de peso fresco, índice de madurez, contenido en materia seca y vitamina C corresponden a la media de datos de la estación de invierno y de verano. Sin embargo, los datos del contenido fenólico, composición gaseosa, malos olores, calidad visual y

pardeamiento del borde se obtuvieron de las muestras recolectadas en invierno. El análisis de la varianza (ANOVA) se realizó con un nivel de significancia de $P < 0.05$ Cuando se observaron diferencias significativas, se realizó el test de Tukey´s usando el programa estadístico PASW Statistics 18 de Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Cuando en el contenido de compuestos fenólicos se observaron diferencias en ANOVA, se realizó el test de Tukey´s honestly significant difference (HSD) con una $P < 0.05$.

4. RESULTADOS

4.1. Características de calidad de la materia prima

La influencia de las soluciones nutritivas sobre el peso dependió del genotipo y de la estación de cultivo (**Tabla 6.2**). En todos los genotipos, el peso fue mayor en la recolección de invierno, sin observarse diferencias entre soluciones nutritivas. Cuando la lechuga trocadero se cultivó en invierno, el peso disminuyó al aumentar la concentración iónica (409.3, 352.3 y 315.4 g para baja, media y alta concentración iónica, respectivamente) (**Figura 6.1A**).

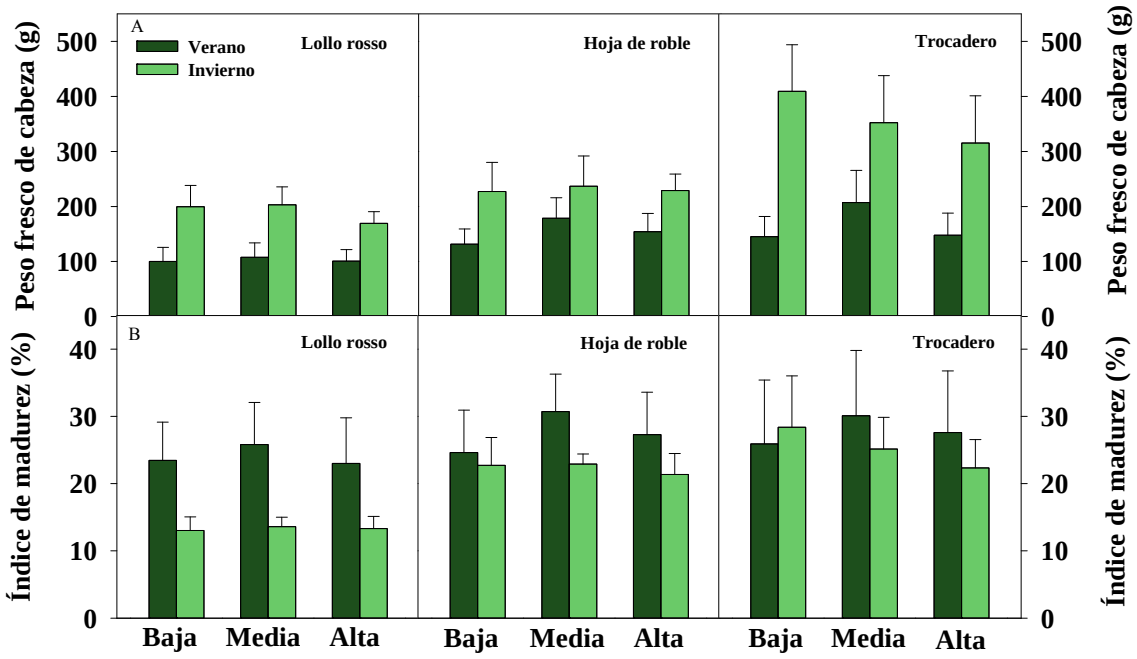


Figura 6.1. Influencia de las soluciones nutritivas (baja, media y alta concentración iónica) sobre el peso fresco (A) y el índice de madurez (B) de lechugas lollo rosso, hoja de roble y trocadero cultivadas en verano e invierno.

Tabla 6.2. Tabla ANOVA sobre la influencia de la solución nutritiva, del genotipo y de la estación de cultivo en el peso fresco, índice de madurez, contenido en materia seca y en vitamina C.

	Peso fresco (g)	Índice de madurez (%)	Contenido en materia seca (%)	Contenido en vitamina C (mg $100g^{-1}$ p.f.)
Solución nutritiva (SN)	***	**	***	**
Genotipo (G)	***	***	***	***
Estación (E)	***	***	***	***
SN x G	***	ns	ns	ns
SN x E	***	**	**	ns
G x E	***	***	ns	**
SN x G x E	***	ns	ns	**

ns, *, ** y ***, diferencias no significativas o significativas a $P \leq 0.05$, 0.01 y 0.001, respectivamente.

El índice de madurez fue influenciado por la estación pero dependió del genotipo (**Tabla 6.2**) (**Figura 6.1B**). Las diferencias de madurez fueron más evidentes en los genotipos rojos que en el genotipo verde. Debido a las altas temperaturas, las lechugas presentaron mayor índice de madurez en verano. Sin embargo, la materia seca fue menor en verano debido al ciclo de cultivo más corto (33 frente a 96 días en invierno). Los genotipos rojos mostraron ligeramente mayor contenido en materia seca que el genotipo verde trocadero (**Figura 6.2A**). Por otra parte, se observaron diferencias de textura entre genotipos. Lollo rosso exhibió mayor textura sin diferencias entre soluciones nutritivas (datos no mostrados). El contenido en vitamina C de las lechugas cultivadas bajo diferentes soluciones nutritivas se muestra en la **Figura 6.2B**. Los genotipos rojos mostraron mayor contenido de vitamina C. La proporción de AA fue mayor frente a la de ADHA. El contenido de AA entre soluciones nutritivas fue 56, 65 y 63 % para lollo rosso, hoja de roble y trocadero, respectivamente. Las soluciones nutritivas influyeron de forma similar en el contenido de vitamina C en los tres genotipos estudiados. Las lechugas pigmentadas cultivadas con la concentración iónica media presentaron el mayor contenido de vitamina C, mientras que las cultivadas con la solución nutritiva más baja mostró un contenido

menor. Sin embargo, en lechuga trocadero no se observaron diferencias entre soluciones nurtitivas (**Figura 6.2**).

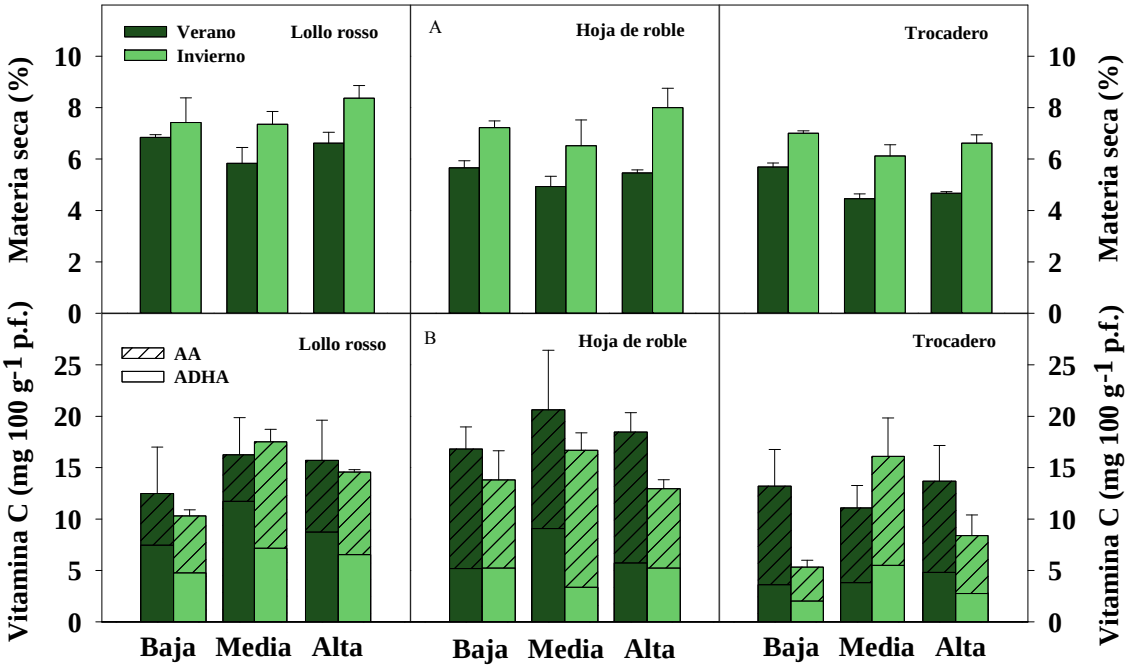


Figura 6.2. Influencia de las soluciones nutritivas (baja, media y alta concentración iónica) sobre el contenido en materia seca (A) y vitamina C (B) de lechugas lollo rosso, hoja de roble y trocadero cultivadas en verano e invierno.

Como era de esperar, el contenido en derivados del ácido cafeico, flavonoles y antocianos fue mayor en las lechugas de hoja roja que en el tipo verde trocadero, con valores medios entre soluciones nutritivas de 345, 261 y 103 mg por 100 g^{-1} en lollo rosso, hoja de roble y trocadero, respectivamente. En general, el grupo de derivados del ácido cafeico fue el más abundante, seguido por los flavonoides y finalmente por los antocianos presente este último sólo en los genotipos rojos. El contenido fenólico total e individual se vio influenciado por las soluciones nutritivas y por el genotipo. La concentración iónica media presentó el mayor contenido fenólico en todos los genotipos estudiados (**Tabla 6.3**). Esta misma tendencia se observó en los derivados de ácido cafeico. Sin embargo, lollo rosso fue el único genotipo donde el contenido en flavonoides disminuyó cuando la concentración iónica aumentó. En el caso de antocianos, no se encontraron diferencias significativas entre soluciones nutritivas en las lechugas de hoja roja.

Tabla 6.3. Influencia de las soluciones nutritivas (baja, media y alta concentración iónica) en el contenido fenólico individual y total de lechugas lollo rosso, hoja de roble y trocadero cultivadas en invierno.

Genotipo (G)	Soluciones nutritivas (SN)	Derivados del ácido cafeico (mg 100 g^{-1} p.f.)	Flavonoles (mg 100 g^{-1} p.f.)	Antocianos (mg 100 g^{-1} p.f.)	Fenoles totales (mg 100 g^{-1} p.f.)
Lollo rosso	Baja	159.5b	184.3a	31.1	374.8a
	Media	227.1a	147.4ab	23.0	397.5a
	Alta	139.4b	100.5b	21.4ns	261.3b
Hoja de roble	Baja	116.6b	50.0b	15.0	181.7b
	Media	191.0a	118.6a	21.3	330.8a
	Alta	137.3b	57.6b	12.2ns	270.1b
Trocadero	Baja	77.7	6.3b	-	84.0b
	Media	99.3	21.4a	-	120.7a
	Alta	97.8ns	6.5b	-	104.4ab
G		***	***	***	***
SN		***	***	ns	***
G x SN		***	***	ns	***

Los resultados corresponden a tres réplicas. Las letras de una misma columna para un mismo genotipo representan diferencias significativas ($P < 0.05$) de acuerdo al test de HSD (honestly significant difference). ns, *, ** y ***, diferencias no significativas o significativas a $P \leq 0.05$, 0.01 y 0.001, respectivamente.

4.2. Calidad y vida útil de lechuga IV Gama

No se observaron diferencias en los niveles de O_2 y CO_2 durante la conservación entre soluciones nutritivas. Los cambios observados sólo fueron debidas al genotipo (**Figura 6.3A**). Después de 8 días de conservación, lollo rosso presentó los niveles más altos de O_2 comparados con hoja de roble y trocadero (11.8, 0.4 y 0.0 kPa, respectivamente) debido a su conservación en MAP pasivo. Trocadero mostró los niveles

más elevados de CO_2 que lollo rosso y hoja de roble (9.5, 6.1 y 4.5 kPa, respectivamente). Durante la conservación, los niveles de O_2 y CO_2 dentro de los envases de lollo rosso y trocadero continuaron disminuyendo y aumentando, respectivamente sin alcanzarse el equilibrio. Sin embargo, en los envases de hoja de roble se alcanzó el equilibrio, permaneciendo sin cambios el O_2 y el CO_2 hasta el final de la conservación. La composición gaseosa generada dentro de los envases originó el desarrollo de malos aromas (**Figura 6.3A**). En este sentido, trocadero presentó el mayor desarrollo de malos aromas, alcanzando el límite comercial a día 8 de conservación, mientras que lollo rosso y hoja de roble fueron valorados por encima del límite comercial. Sin embargo, entre día 8 y 12 de conservación, los malos aromas aumentaron significativamente en los genotipos rojos y al final de la conservación permanecieron próximos al límite comercial (**Figura 6.3B**).

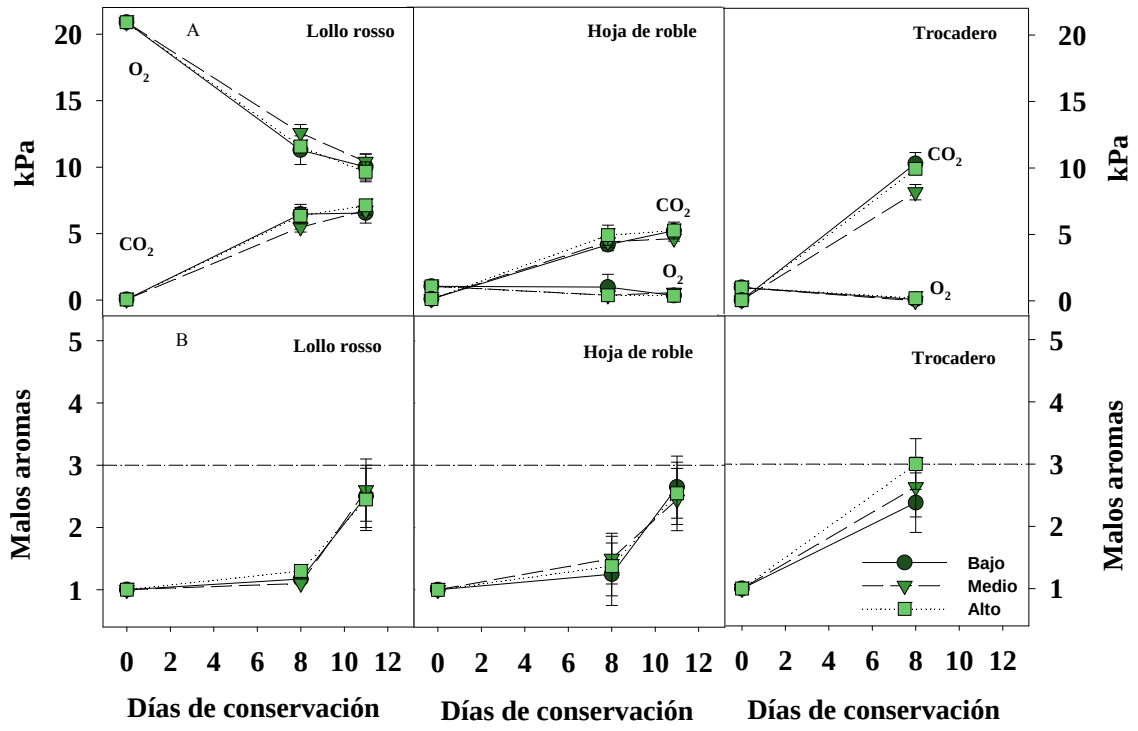


Figura 6.3. Influencia de las soluciones nutritivas (baja, media y alta concentración iónica) en los cambios en la presión parcial de O_2 y CO_2 (kPa) (A) y en los malos olores (B) de lechugas lollo rosso, hoja de roble y trocadero en IV Gama cultivadas en invierno y conservadas 3 días a 4 ºC y el resto a 7 ºC.

La calidad visual de la lechuga IV Gama justo después del procesado fue excelente en todos los genotipos (valores de 8 y 9) sin observarse diferencias entre las soluciones

nutritivas (**Figura 6.4A**). El genotipo fue el principal factor que origino diferencias en la calidad visual durante la conservación. Como era de esperar, la calidad visual disminuyó con los días de conservación, pero los genotipos rojos siempre mostraron mejor calidad visual que el genotipo verde trocadero debido al rápido deterioro producido en los trozos procedentes de las hojas exteriores. Por esta razón, la lechuga trocadero se valoró por debajo del límite comercial a día 8, finalizando su periodo de conservación (**Figura 6.4A**). Entre los días 8 y 11, los genotipos rojos desarrollaron pardeamiento en la zona del corte sobrepasando lollo rosso el límite comercial (**Figura 6.4B**). Después de 11 días de conservación, las lechugas cultivadas con la concentración iónica media presentaron mejor calidad visual, principalmente por el menor desarrollo de pardeamiento en el borde. En el caso de la lechuga trocadero no se observó pardeamiento debido a los bajos niveles de O_2 durante la conservación.

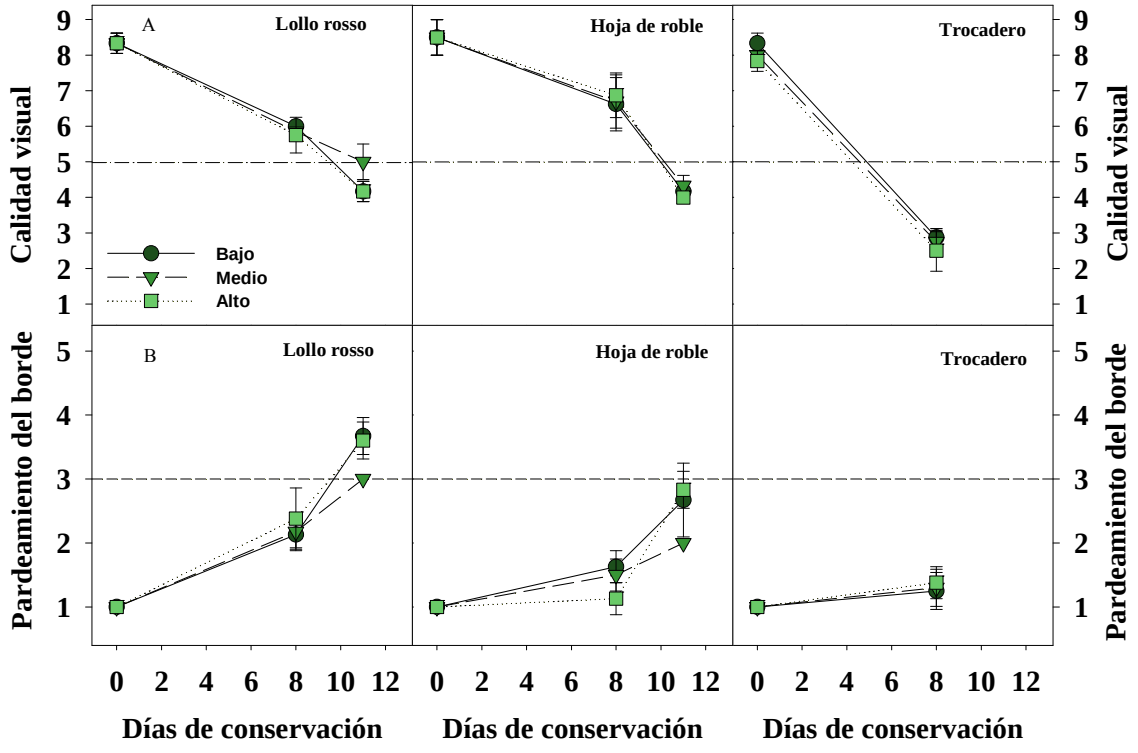


Figura 6.4. Influencia de las soluciones nutritivas (baja, media y alta concentración iónica) en la calidad visual (A) y pardeamiento en el borde (B) de lechugas lollo rosso, hoja de roble y trocadero en IV Gama cultivadas en invierno y conservadas 3 días a 4 ºC y el resto a 7 ºC.

5. DISCUSIÓN

En la producción de lechugas, los cultivos sin suelo pueden tener algunas ventajas como es la protección contra el viento y de otras condiciones climatológicas adversas, además de programar mejor la fecha de recolección (Nicola y col., 2009). Cuando las condiciones climatológicas son favorables el cultivo en campo abierto supone una ventaja económica. Actualmente, es escasa la información que se disponible sobre la influencia del cultivo sin suelo en campo abierto en la calidad visual de la lechuga en IV Gama. Las condiciones de cultivo tales como los sistemas de producción, el riego, la lluvia y la fertilización influyen en la calidad de la materia prima llegando a modificar su comportamiento fisiológico y la idoneidad para IV Gama (Cantwell y Kasmire, 2002). La variabilidad de la materia prima sigue siendo un reto debido a que todos los factores pre y postcosecha afectan a las características de calidad incluyendo la composición, la textura y la vida útil. Una producción exitosa depende de la velocidad de crecimiento la cual está relacionada con la optimización de nutrientes. Se ha demostrado que el empleo de soluciones nutritivas óptimas incrementa el rendimiento y la calidad de la lechuga cultivada en sistemas sin suelo en invernadero (Cuppett y col., 1999; Yang y col., 2006; Fallovo y col., 2009; seo y col., 2009). En nuestro estudio observamos que la sensibilidad y la tolerancia a diferentes concentraciones iónicas dependen del genotipo. Los resultados demuestran que los genotipos rojos fueron más adecuados al cultivo sin suelo que el genotipo verde trocadero debido a la elevada velocidad de crecimiento y al rápido deterioro después del corte, principalmente de los trozos de las hojas más adultas. En general, la concentración iónica media fue la más adecuada, teniendo en cuenta algunas características como el peso y el contenido en vitamina C. Aunque algunos estudios indican que un suministro óptimo de N_2 y P provoca un crecimiento más lento y un índice de área inferior de la hoja debido a la limitación de la fotosíntesis y de la expansión celular (Hoque y col., 2010), nosotros no observamos ningún cambio ni diferencia entre las distintas concentraciones. Además, algunos estudios sugieren una disminución de la fuerza y la rigidez de la lechuga al aumentar la aplicación de N_2 (Newman y col., 2005). Simmonne y col., (2001) recomendaron el uso de nitrato de calcio para mejorar la textura de la lechuga, a pesar de no observar diferencias en el rendimiento entre las distintas fuentes de N_2 empleadas. En nuestro estudio, no observamos cambios en la textura, ni en el desarrollo de enfermedades y ni en el deterioro durante la conservación entre las distintas soluciones nutritivas empleadas, aunque las diferencias entre genotipos fueron importantes (Dántuono y Neri, 2001; Hilton y col., 2009). Además, las condiciones climatológicas,

incluyendo la luz y la temperatura, influyeron de forma manifiesta las características de calidad respecto a algunos constituyentes. Debido a un ciclo de cultivo más corto en verano que en invierno (33 vs 66, respectivamente), el peso fresco y la materia seca fueron menores, sin embargo, el índice de madurez fue mayor. Se conoce que la cantidad e intensidad de luz recibida por el cultivo influye en el contenido de vitamina C (Lee y Kader, 2000). La radiación neta fue de 438 y 220 MJ/m^2 en verano e invierno, respectivamente, aunque las horas de sol acumuladas fueron 374 y 529 en verano e invierno, respectivamente.

El aumento en la CE de las soluciones nutritivas en cultivos de lechuga minihojas provocó una reducción del contenido de azúcares debido al aumento de la tasa respiratoria (Fallovo y col., 2009). En nuestro estudio, las concentraciones de O_2 y CO_2 no se vieron influenciadas por las soluciones nutritivas en ningún genotipo. En lechuga iceberg se ha descrito que al disminuir el aporte de N mejora la vida útil de la lechuga (Poulsen y col., 1995). Sin embargo, la lechuga IV Gama no presentó alteraciones durante su conservación por la aplicación de diferente dosis de N_2, de acuerdo con Hilton y col., (2009). Se observó una reducción del pardeamiento en la zona de corte durante la conservación en los genotipos rojos cultivados bajo la concentración iónica media, debido probablemente al mayor contenido en vitamina C y en compuestos fenólicos que ayudaron al control del desarrollo de pardeamiento enzimático. Lee y Kader (2000) señalaron que existe una correlación entre el aporte de N_2 y el contenido en vitamina C en lechuga trocadero. Los compuestos fitoquímicos en el que los compuestos fenólicos se incluyen, tales como los derivados del ácido cafeico, flavonoides, antocianos (Lee y Kader, 2000) y carotenos (Li y col., 2010) de la lechuga son sintetizados durante el cultivo. Estos metabolitos secundarios actúan como antioxidantes naturales para proteger a las plantas de condiciones ambientales adversas, tales como la radiación UV o las operaciones de procesado en IV Gama (Li y col., 2010). Las lechugas pigmentadas mostraron mayor contenido en flavonoides y derivados del ácido cafeico que las lechugas de hoja verde (Llorach y col., 2008; Cantwell y Kasmire, 2002). Esto podría estar relacionado con el mantenimiento de la calidad visual después del corte y durante su vida útil. Un sistema de cultivo capaz de aumentar los compuestos antioxidantes en el vegetal es deseable debido a su efecto protector frente a especies reactivas de oxígeno, mejorando la estabilidad de las membranas (Hodges y Toivonen, 2008). Resultados similares fueron observados en otros estudios donde se comparaba el cultivo sin suelo y el tradicional en los genotipos rojos (Tittonell y col.,

2001). La elección de un sistema de cultivo apropiado no es tarea fácil. Los agricultores necesitan variedades resistentes a estreses bióticos y abióticos, garantizando a su vez un alto rendimiento, una buena aptitud para la cosecha mecánica, cabezas de tamaño uniforme, madurez uniforme y menores tasas de rechazo durante el procesado (Nicola y col., 2004). Los productores demandan variedades de lechuga con tasas de respiración y actividades enzimáticas bajas, tolerantes al estrés como son las operaciones mecánicas (lavado, selección, cortado y secado) (Nicola y col., 2004). Los genotipos rojos estudiados son más resistentes que el genotipo verde trocadero a las operaciones mecánicas, alargando la vida útil después del procesado.

6. CONCLUSIONES

Los sistemas sin suelo son recomendados debido al control nutricional de los cultivos, permitiendo estandarizar los parámetros de calidad de la materia prima del producto para IV Gama. Las soluciones nutritivas aplicadas no originaron importantes cambios en las características de calidad de la materia prima, aunque dependió del genotipo y de la estación de cultivo. Los resultados obtenidos en este estudio demuestran que los genotipos rojos podrían ser más adecuados para este sistema de producción, bajo la solución nutritiva media. La accesibilidad de nutritientes y el rápido crecimiento en algunas variedades como trocadero pueden acortar la vida útil, en particular en verano debido al ciclo de cultivo más corto. El ajuste de nutrientes en el cultivo sin suelo es crucial considerando que las condiciones climatológicas y el genotipo juegan un papel relevante en la calidad del producto IV Gama.

CAPÍTULO VII

INFLUENCIA DEL CULTIVO EN SUELO Y SIN SUELO EN LA CALIDAD SENSORIAL, CONSTITUYENTES BIOACTIVOS Y CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE LECHUGAS VERDES Y ROJAS EN IV GAMA

Selma, M.V., **Luna, M.C**., Martínez-Sánchez, A., Tudela, J.A., Beltrán, D., Baixauli, C., Gil, M.I., 2012. Sensory quality, bioactive constituents and microbiological quality of green and red fresh-cut lettuces (*Lactuca sati*va L.) are influenced by soil and soilless agricultural production systems. *Postharvest Biol. Technol.,* 63, 16-24.

1. RESUMEN

Se estudió la calidad y vida útil de la lechuga IV Gama cultivada en suelo (sistema de producción tradicional), y sin suelo (sistema de producción innovador) en tres genotipos: lechugas pigmentadas de los genotipos lollo rosso y hoja de roble y lechuga de hoja verde del genotipo trocadero. Las lechugas se cultivaron en la misma finca al aire libre y durante el mismo periodo de invierno. Las muestras cultivadas en suelo necesitaron un mayor ciclo de cultivo que las muestras cultivadas sin suelo (102 y 63 días después del trasplante, respectivamente). Después de la recolección, la calidad visual de la lechuga IV Gama de hojas rojas cultivadas sin suelo fue mejor que las cultivadas en suelo. Sin embargo, en el genotipo verde, el sistema sin suelo proporcionó peor calidad visual del producto cortado que el de suelo. La lechuga tipo lollo rosso cultivada en el sistema sin suelo presentó mayor contenido en compuestos fitoquímicos, incluyendo la vitamina C y el contenido de compuestos fenólicos individuales y totales que la cultivada en suelo. Al final de la conservación, la lechuga IV Gama de lollo rosso y hoja de roble cultivadas en el sistema sin suelo mostraron significativamente mayor contenido en vitamina C que las de suelo. Además, se observó una correlación entre el alto contenido en antioxidantes y el mantenimiento de la calidad así como con el control del desarrollo de pardeamiento en lechugas IV Gama cultivadas sin suelo. Se observó que los sistemas sin suelo son más efectivos en el control de la contaminación microbiana debido a una menor carga microbiológica inicial y a un crecimiento de la flora más lento durante la conservación. Al final de vida útil, el recuento microbiano del producto cultivado en suelo fue de 3 y 1.5 log ufc g^{-1} superior para bacterias ácido lácticas y coliformes totales, respectivamente, que las cultivadas sin suelo. Los resultados mostraron que el material procedente del cultivo sin suelo, como nuevo sistema de producción, proporcionó mejor calidad sensorial y microbiológica, aunque dependió del genotipo y de la época de cultivo.

2. INTRODUCCIÓN

La lechuga (*Lactuca sativa L.*) es uno de los principales vegetales de IV Gama tanto para la comercialización en restaurantes de comida rápida y catering como para el consumo en hogares. Con este propósito, la materia prima debe ser de calidad superior para proporcionar durante todo el año productos frescos cortados o en IV Gama de alta calidad, incluyendo el desarrollo de cultivares específicos para mantener la homogeneidad de la materia prima. La máxima calidad tras la recolección se puede lograr entendiendo y gestionando los factores precosecha que influyen en la calidad de la materia prima y en la

del producto en IV Gama (Crisoto y Mitchell, 2002). Sin embargo, los factores precosecha a menudo interaccionan de forma compleja dependiendo de las características del cultivar.

La lechuga es cultivada tradicionalmente en suelo, pero recientemente se están considerando otras técnicas alternativas de cultivo sin suelo. Son numerosos los sistemas de cultivo sin suelo en todo el mundo, entre ellos; el New Growing System (NGS^{TM}), Nutrient Film Technique (NFT^{TM}), aeropónico y los sistemas en bandejas de flotación (Johnson, 2008; Fallovo y col., 2009). Hay una amplia variación entre sistemas en suelo y sin suelo en términos de aportación de nutrientes, tamaño de las parcelas, localización del cultivo, condiciones ambientales y productividad. Estas variaciones de un sistema de producción a otro pueden afectar a la calidad de la materia prima y del producto procesado en IV Gama. Los sistemas sin suelo son adecuados para ciclos de cultivo cortos y con alta densidad de plantación. A menudo se emplean para producciones de alto valor añadido como lechugas tipo “baby” o minihojas (Nicola y col., 2005). En estos sistemas, hay mejor control de la nutrición de la planta, evitando a su vez la contaminación del suelo (FAO/WHO, 2008). Algunos estudios han evaluado la calidad de la lechuga cultivada en sistemas sin suelo (Cupper y col., 1999; Tittonell y col., 2001; Hoque y col., 2001). Sin embargo, los estudios que comparan la calidad postcosecha en los cultivos con y sin suelo son limitados, particularmente en productos de IV Gama. Los términos de calidad y vida útil que se aplican a los productos en IV Gama, no siempre se emplean de la misma manera para la materia prima. Las características microbiológicas, sensoriales y nutricionales se han descrito como criterios necesarios para la determinación exacta de la vida útil de frutas y hortalizas en IV Gama (Cantwell y Suslow, 2002). La importancia del contenido en compuestos fitoquímicos en los alimentos vegetales está despertando cada vez más interés entre productores y procesadores para satisfacer la demanda por parte de los consumidores de productos con alto contenido en antioxidantes. Las prácticas de cultivo están consideradas como factores claves que pueden influir en la contaminación y exposición de patógenos humanos al consumidor (Suslow y col., 2003). En su mayor parte, las lechugas se cultivan al aire libre, donde animales, pájaros e insectos pueden contaminar o bien se pueden contaminar en el procesado o después en la conservación y transmitir patógenos al hombre (Harris y col., 2002). Otro riesgo potencial para la contaminación de la lechuga es el suelo que puede estar contaminado con patógenos y que pueden transmitirse a los alimentos. La variabilidad en las prácticas agrícolas de producción es un factor crítico y es necesario conocer la influencia de las mismas en la calidad microbiológica del producto

procesado. La lechuga recién recolectada contiene una flora microbiana natural, la cual no es patógena (FAO/WHO, 2008). Sin embargo, las lechugas IV Gama pueden albergar una amplia variedad de microorganismos, incluso patógenos ocasionales cuando se contaminan durante alguna etapa en la pre o postcosecha (Beuchat, 2006). La lechuga IV Gama, de los genotipos rojos, lollo rosso y hoja de roble, ha sido considerada en todo el mundo como vehículo para la transmisión de microorganismo causantes de enfermedades (Ackers y col, 1998; Hilborn y col, 1999.; Doyle y Erickson, 2008). La variabilidad en la calidad y susceptibilidad microbiológica de la lechuga IV Gama está relacionada con las características del cultivar. Las enormes diferencias en la morfología de la superficie, la composición de los tejidos y las actividades microbiológicas ofrecen una amplia gama de nichos ecológicos diversos para distintas especies o grupos microbianos (Beuchat, 2002). Considerando los sistemas de producción como un factor crítico, en este estudio hemos querido identificar si existen diferencias en la calidad y vida útil del producto procesado en IV Gama, entre variedades de lechuga verdes y rojas, cultivadas en suelo y sin suelo, localizados en la misma área de producción y recolectadas en el mismo estado de madurez. Esto nos permitirá conocer cómo afectan los sistemas de producción a la calidad y seguridad de los productos en IV Gama cultivados durante la misma estación. Este estudio trata de identificar diferencias en la calidad sensorial y microbiológica, así como el contenido en compuestos bioactivos como vitamina C y contenido en compuestos fenólicos totales e individuales en tres genotipos de lechuga.

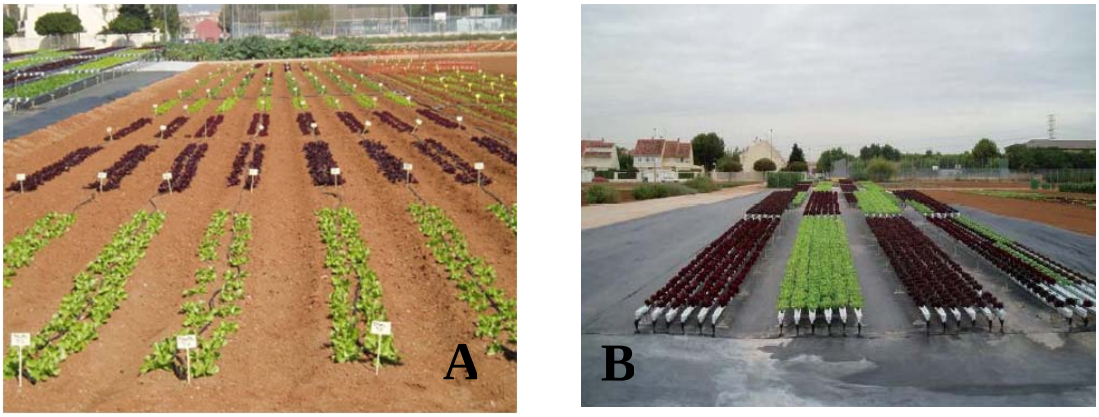
3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Material vegetal

Los genotipos de lechuga (*L. sativa* L.), rojas (lollo rosso cv Evasion y hoja de roble cv Jamai) y verde (trocadreo cv Daguan) fueron cultivados en dos sistemas de cultivo, suelo y sin suelo, en la misma ubicación. La finca pertenece a la Fundación Ruralcaja la cual está situada en Paiporta, Valencia (39º 3´N, 0º 3´W). El área dedicada al cultivo en suelo comprende 600 m^2 en camas elevadas. Antes del trasplante, al suelo se le aplicó 50 kg ha^{-1} de H_3PO_4 y 150 kg de K_2SO_4 así como una solución nutritiva con Mg^{2+}, Na^+, K^+, y Ca^{2+} en el agua de riego (**Tabla 7.1**). El tamaño de partícula del suelo fue de 59.3 % de arena, 18.0 % limo y 22.7 % de arcilla, clasificada como textura arcillo arenosa (USDA Texture Soil Clasification, 1978). El color del suelo fue de 7.5 amarillo-rojo 4/6 de acuerdo con el sistema estándar Munsell (Soil Survey Division Staff, 1993). Las características del suelo se encuentran en la (**Tabla 7.1)**. La densidad de plantación fue de

10 cabezas/m^2 espaciadas 0.3 m, incluyendo unas líneas de plantas en las orillas que no fueron empleadas.

El área dedicada al sistema sin suelo fue de 425 m^2. La concentración de nutrientes de la solución nutritiva se muestra en la **Tabla 7.1**. La conductividad eléctrica (CE) de la solución nutritiva fue de 1.9 dS m^{-1} y el pH de 6.5. Para la preparación de las soluciones nutritivas se empleó agua destilada. Para el desarrollo del sistema NGT™ se empleó una instalación hidropónica (Patente no. 2 221 636/7), explicada en el capítulo anterior. El espacio entre plantas fue de 0.3 m^2. Cada bloque consistió en seis líneas de 12 m, conteniendo 40 plantas por línea (**Fotografía 7.1B)**. Al igual que en suelo, la superficie dedicada a cada cultivo fue similar para los tres genotipos (**Fotografía 7.1A**).



Fotografía 7.1. Plantación del cultivo en suelo (A) y sin suelo (B).

Tabla 7.1. Composición del suelo y de la solución nutritiva del sistema sin suelo.

	Composición del suelo	Solución nutritiva
pH	8.43	6.55
CE (dS m^{-1})	0.17	1.90
Soluble-Cl^-	0.02	2.96
Mg^{2+}	1.39[(a)]	1.48
Na^+	0.14[(a)]	2.31
K^+	0.83[(a)]	5.03
Ca^{2+}	7.10[(a)]	4.05
NH_4^+		1.14
NO_3^-		10.05
HCO_3^-		0.47
$H_2PO_4^-$		1.55
SO_4^{2-}		2.48
CIC (cmol kg^{-1})	9.45	
COT (g kg^{-1} p.s.)	12.9	
N kj (g kg^{-1} p.s.)	1.10	
P-disponible (g kg^{-1} p.s.)	0.44	
K-disponible (g kg^{-1} p.s.)	3.23	
$CaCO_3$ (g kg^{-1} p.s.)	196.40	

Los valores de suelo están expresados en: macronutrientes (g/kg), cationes de intercambio y aniones solubles (cmol/kg). Los valores de la solución nutritiva son expresados en: mmol/L. [a]cationes de intercambio. CIC, Capacidad de intercambio catiónico, COT, Carbono orgánico total, p.s. peso seco.

El diseño de los bloques con tres réplicas se realizó al azar en los dos sistemas de cultivo. La siembra de las semillas se realizó en un invernadero en bandejas de plástico y fueron trasplantadas tras 30 días. La recolección se llevó a cabo 63 días en el sistema sin suelo y 102 días en el sistema en suelo. Tras estos ciclos se alcanzó el peso mínimo requerido para cada genotipo, 180 g en lollo rosso y hoja de roble y 300 g en trocadero, de acuerdo con las especificaciones comerciales de materia prima para IV Gama. Se recolectaron 30 cabezas por bloque, con un total de 90 por genotipo y condición de cultivo. Las hojas exteriores se eliminaron imitando las operaciones comerciales. Después de la recolección, las muestras se transportaron refrigeradas (200 km) al CEBAS-CSIC (Murcia) donde se conservaron 24 h a 4 ºC y 70 % de HR en oscuridad. Para la caracterización de las muestras, el día de procesado se midió el peso, la anchura y el índice de madurez dado por la longitud del tallo/longitud total de cabeza de 25 cabezas, así como la materia seca, la textura y el contenido en compuestos fenólicos totales e individuales.

3.2. Condiciones de procesado, envasado y conservación

Las condiciones de procesado fueron las descritas en el capítulo III. Para el envasado se empleó una envasadora vertical (modelo Etna 280-X, Ulma, Oñati) y un plástico de polipropileno (PP) (Amcor Flexibles, Bristol, GB) con una permeabilidad al O_2 de 2.63pmol $s^{-1}m^{-2}$ Pa^{-1} y de 9.84 pmol s^{-1} m^{-2} Pa^{-1} al CO_2 a 7 ºC y 97 % de HR. El tamaño del envase fue de 230 x 320 mm. El genotipo lollo rosso (125 g) se envasó en aire creando una atmósfera modificada pasiva como consecuencia de la tasa respiratoria del producto y la permeabilidad de la película plástica. Los genotipos hoja de roble (125 g) y trocadero (200 g) se envasaron en atmósfera MAP activa creada por inyección de N_2 para reducir la concentración de pO_2 al 0.5-2 kPa, aproximadamente. La elección de la atmósfera de conservación se realizó siguiendo especificaciones comerciales para cada genotipo. Todas las muestras se conservaron 3 días a 4 ºC y el resto a 7 ºC en oscuridad.

La caracterización de las muestras se realizó el día de procesado para lo cual se midió el peso fresco de cabeza, la longitud de cabeza, la longitud de espigón, el contenido en materia seca y la textura, de acuerdo con la metodología descrita en el capítulo III.

Los análisis realizados en este estudio junto con el análisis estadístico de los datos se llevaron a cabo según lo especificado en el capítulo III. Para el análisis de gases se

empleó 1ml de muestra del espacio de cabeza de los envases almacenados 7, 9 y 11 días en los cultivos en suelo y de 8 y 11 días en las muestras sin suelo, junto con la evaluación sensorial. La determinación de vitamina C se realizó inicialmente y tras 8 días de conservación, sin embargo, la medida de la calidad microbiológica se llevó a cabo antes y después del lavado así como tras 8, 9 y 11 días de conservación.

4. RESULTADOS

4.1 Características fisiológicas de los genotipos rojos y verdes de lechuga cultivados en sistemas de producción en suelo y sin suelo.

Los sistemas de cultivo mostraron diferencias significativas en el peso de las cabezas, con un comportamiento diferente dependiendo del genotipo (**Figura 7.1**). Las cabezas de lechuga de hoja de roble y trocadero cultivadas en suelo alcanzaron mayor peso que las cultivadas en el sistema sin suelo. Sin embargo, el genotipo lollo rosso cultivado sin suelo mostró significativamente mayor peso que las cultivadas en suelo. No se observaron diferencias en el índice de madurez entre los sistemas de cultivo para los genotipos estudiados (**Figura 7.1**). Este hecho permitió comparar el efecto de los sistemas de cultivo en el producto IV Gama, sin considerar las fechas de plantación. Hoja de roble fue el único genotipo donde la textura mostró diferencias significativas entre los sistemas de cultivo (**Figura 7.1**). La firmeza del cultivo en suelo fue mayor que en la de sin suelo. Además, el contenido en materia seca de los genotipos rojos cultivados en suelo fue significativamente mayor que los cultivados sin suelo, excepto en el genotipo verde trocadero que no mostró diferencias en la materia seca entre los distintos sistemas de cultivo estudiados (**Figura 7.1**).

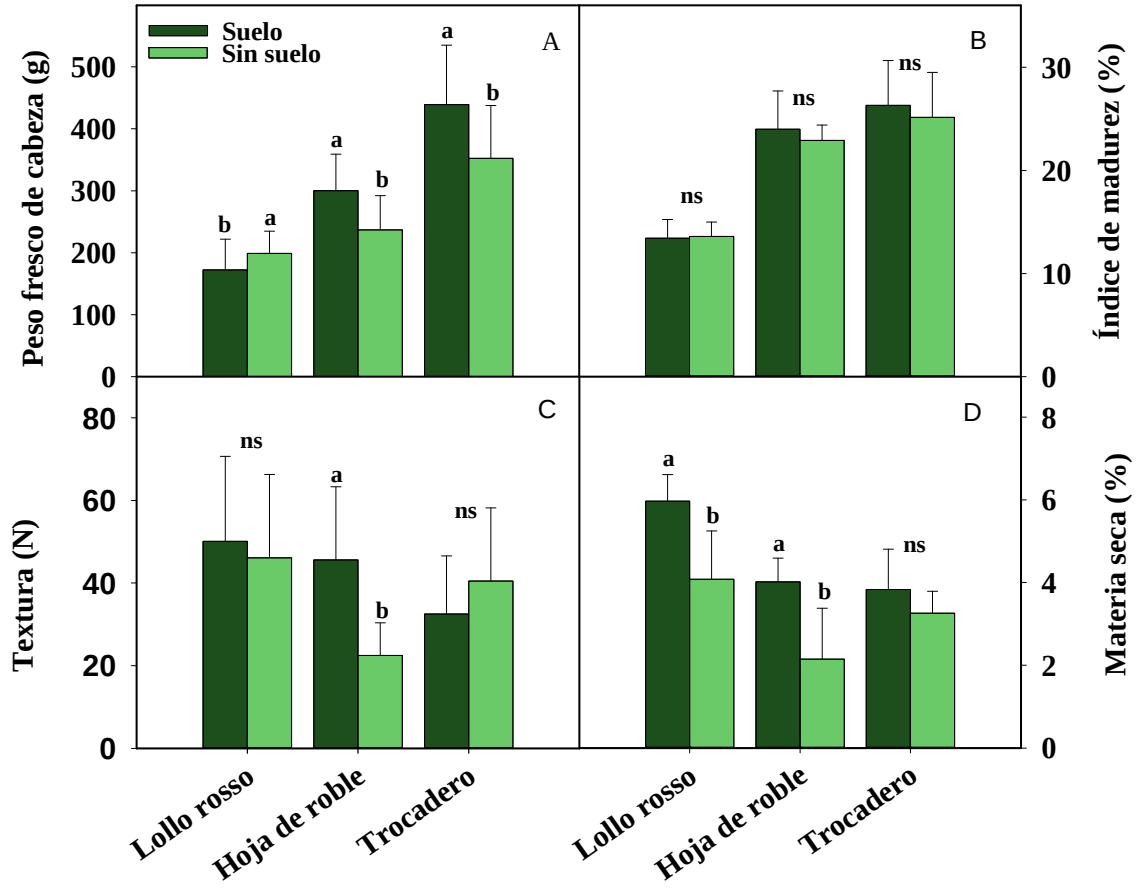


Figura 7.1. Peso fresco (A), índice de madurez (B), textura (C) y contenido en materia seca (D) de lollo rosso, hoja de roble y trocadero cultivados en sistema sin suelo y en suelo. Las barras son la media de 25 cabezas en peso e índice de madurez, 25 réplicas para textura y 5 réplicas para el contenido en materia seca.

4.2. Calidad y vida útil de lechugas rojas y verdes en IV Gama cultivadas en sistema en suelo y sin suelo.

4.2.1 Composición del espacio de cabeza

No se observaron diferencias en la composición gaseosa de lollo rosso en IV Gama entre las muestras cultivadas en suelo y sin suelo (**Figura 7.2**). La concentración inicial de O_2 (21 kPa) disminuyó y la de CO_2 aumentó en la misma proporción, sin alcanzarse el equilibrio después de 11 días de conservación en MAP pasiva. Sin embargo, se observaron diferencias entre los niveles de O_2 y CO_2 en hoja de roble y trocadero cultivados en suelo y sin suelo durante la conservación en MAP activa (**Figura 7.2**). Las lechugas IV Gama de hoja de roble y trocadero cultivadas sin suelo mostraron niveles más altos de CO_2 que las cultivadas en suelo. Los niveles iniciales de oxígeno (1.5 kPa) dentro del envase de hoja de

roble en IV Gama cultivada sin suelo disminuyeron significativamente (0.3 kPa) a los 8 días, comparados con los niveles en suelo (1.5 kPa a los 7 días). En lechuga trocadero IV Gama, sin embrago, los niveles de O_2 fueron similares para ambos sistemas de cultivo (0.1 kPa a los 7días) (**Figura 7.2**).

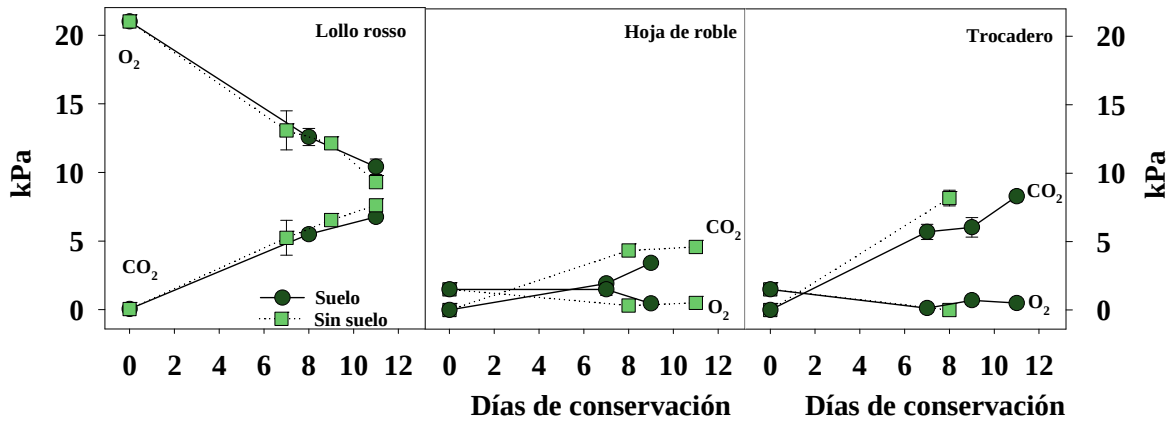


Figura 7.2. Cambios en la presión parcial de O_2 y CO_2 (pO_2 y pCO_2) del espacio de cabeza en los envases de lechugas lollo rosso, hoja de roble y trocadero IV Gama cultivadas en distintos sistemas de producción, en suelo y sin suelo durante 4 días a 4 ºC y el resto a 7 ºC.

4.2.2. Análisis sensorial

La calidad visual general inicial de los genotipos rojos (lollo rosso y hoja de roble) cultivados sin suelo fue significativamente mejor que los cultivados en suelo, sin observarse diferencias en el genotipo verde trocadero (**Figura 7.3A**). La calidad visual disminuyó durante la conservación pero los genotipos rojos cultivados sin suelo presentaron mejor calidad visual que cultivados en suelo. Por el contrario, la lechuga en IV Gama trocadero cultivada en suelo presentó mejor calidad visual que sin suelo. Después de 8 días de conservación, la calidad visual de trocadero cultivado sin suelo estuvo en el límite comercial (valor=5), mientras que las cultivadas en suelo mantuvieron mejor la calidad visual. Los niveles altos de pO_2 durante la conservación en lollo rosso conservado en MAP pasiva no controlaron el desarrollo de pardeamiento en el borde y después de 8 días, se observó un pardeamiento moderado, particularmente el cultivado en suelo (**Figura 7.3B**). La lechuga hoja de roble cultivada en suelo desarrollo un pardeamiento severo comparado con las cultivadas sin suelo, a pesar de ser conservadas en atmósfera modificada activa (**Figura 7.3B**). La causa fue la pérdida de calidad visual después de 8 días de conservación, estando por debajo del límite comercial. En el caso de la lechuga

trocadero, no se observó desarrollo de pardeamiento en ambos sistemas de cultivo debido a los niveles bajos de O_2 durante la conservación. El principal motivo de la pérdida de calidad en trocadero fue el deterioro de las hojas exteriores y los malos olores tanto en los cultivos en suelo como en los sin suelo. Las condiciones de cultivo no afectaron otros parámetros estudiados como el pardeamiento en la superficie y el sabor (datos no mostrados).

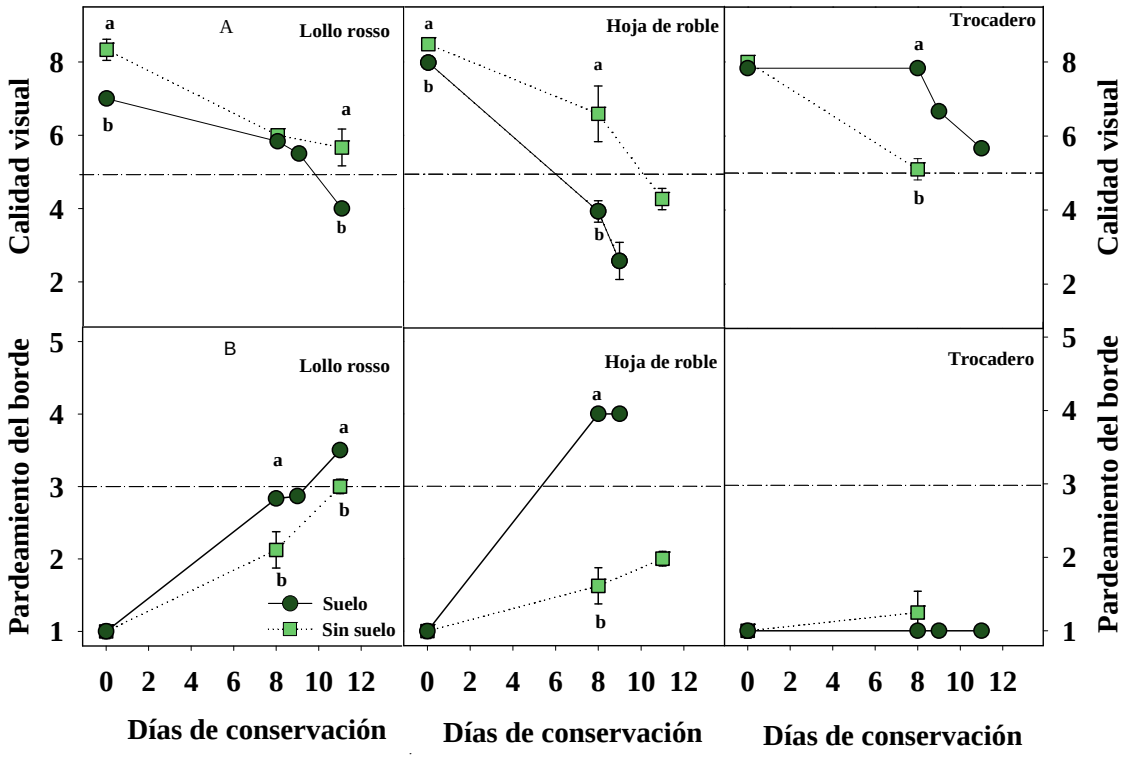


Figura 7.3. Influencia de los sistemas de producción en suelo y sin suelo en la calidad visual (A) y el pardeamiento (B) de lechuga IV Gama lollo rosso, hoja de roble y trocadero conservada durante 4 días a 4 ºC y el resto a 7 ºC. Los valores son media de 3 réplicas y la desviación estándar. Para un mismo tiempo de conservación, las letras distintas indican diferencias significativas.

4.2.3. Vitamina C

El contenido en ácido ascórbico (AA) fue similar o ligeramente superior al de ácido dehidroascórbico (ADHA) en los genotipos rojos y verde. A día 0, lollo rosso fue el único genotipo que mostró mayor contenido en vitamina C cuando las muestras fueron cultivadas sin suelo (**Figura 7.4**). Después de 8 días de conservación, el contenido en vitamina C en lollo rosso disminuyó ligeramente, pero se mantuvo mejor en las muestras cultivadas sin

suelo. Durante la conservación, el contenido en vitamina C en lechuga hoja de roble cultivada sin suelo aumentó, aumentado las diferencias entre ambos sistemas de cultivo.

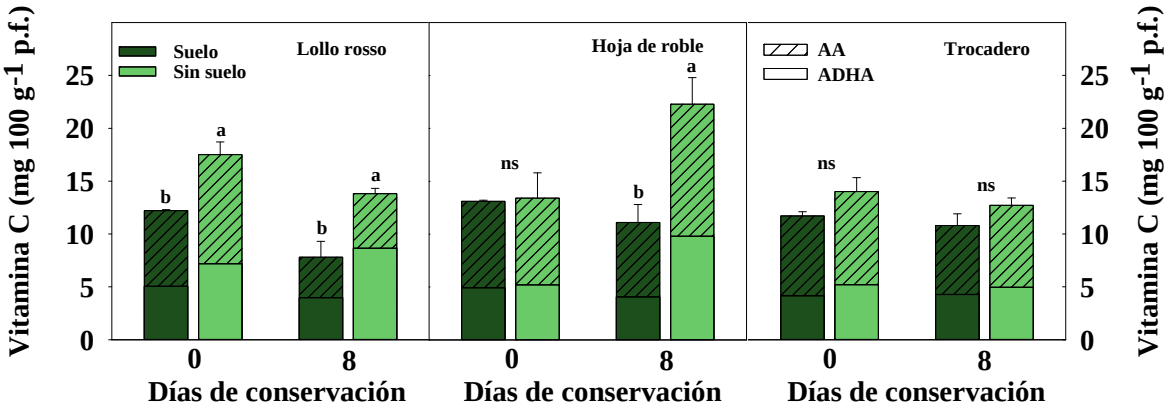


Figura 7.4. Influencia de los sistemas de producción en suelo y sin suelo en el contenido en vitamina C medido como ácido ascórbico (AA) y ácido dehidroascórbico (ADHA) de lechuga IV Gama lollo rosso, hoja de roble y trocadero conservada durante 4 días a 4 ºC y el resto a 7 ºC. Las barras representan la media de 3 réplicas y la desviación estándar. Para un mismo tiempo de conservación, letras distintas indican diferencias significativas. Ns: sin diferencias significativas.

4.2.4. Cambios en el contenido fenólico

El contenido fenólico en los genotipos rojos cultivados en suelo y sin suelo fueron de 355 y 338 mg por 100 g de peso fresco en lollo rosso y hoja de roble, respectivamente y de 114 mg por 100 g en trocadero. Se observó que lollo rosso cultivado sin suelo presentaba un mayor contenido que el cultivado en suelo, mientras que no se observaron diferencias entre los sistemas de cultivo en las lechugas hoja de roble y trocadero (**Figura 7.5**). Los derivados del ácido cafeico fueron el principal grupo fenólico en ambos genotipos, seguido de los flavonoles y los antocianos, identificados estos últimos en los genotipos rojos. El contenido de antocianos en los cultivos en suelo y sin suelo fue de 19 y 26 mg por 100 g en lollo rosso y hoja de roble, respectivamente.

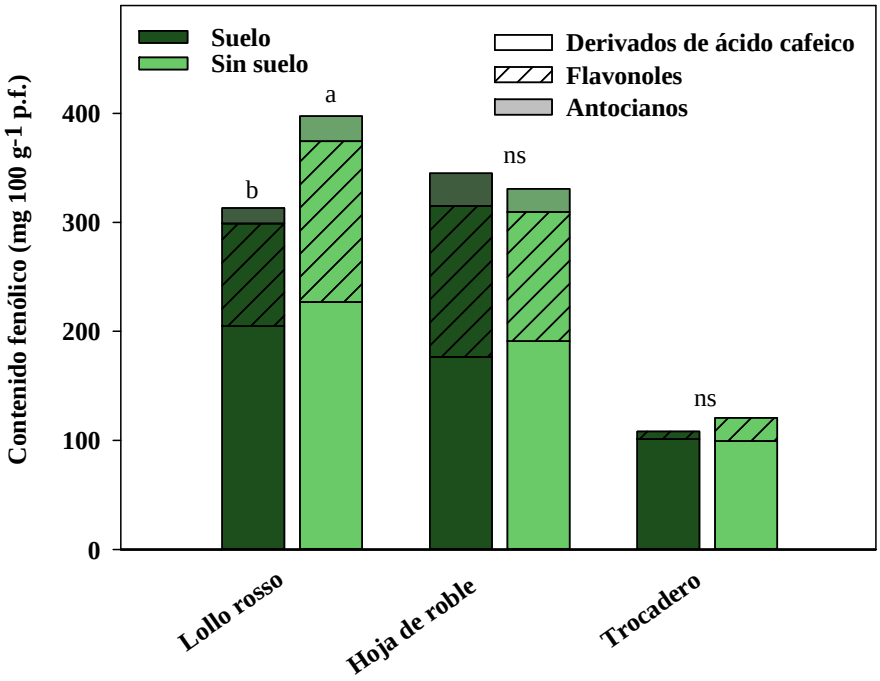


Figura 7.5. Influencia de los sistemas de producción en suelo y sin suelo sobre el contenido fenólico de lollo rosso, hoja de roble y trocadero tras el procesado en IV Gama. Los valores representan la media de 3 réplicas. Letras distintas indican diferencias significativas. Ns: sin diferencias significativas.

4.2.5. Cambios en la calidad microbiológica

La población inicial de bacterias aerobias mesófilas en las lechugas cultivadas en suelo fue de 0.9 log ufc g^{-1}. Este recuento fue superior al recuento en las muestras cultivadas sin suelo para los tres genotipos. Después del lavado, el recuento de mesófilos iniciales disminuyó en todos los genotipos estudiados (0.3-1.6 log ufc g^{-1}) sin diferencias entre ambos sistemas de cultivo (**Figura 7.6**). Durante la conservación, el recuento de mesófilos aumentó significativamente ($P < 0.05$) en ambos condiciones de cultivo y para los tres genotipos (**Figura 7.6**).

La población inicial de levaduras y hongos filamentosos en muestras no lavadas cultivadas en ambos sistemas presentaron recuentos similares en un rango de 4.0 a 4.6 log ufc g^{-1} en todos los genotipos (**Figura 7.6**). Después del lavado, el recuento de levaduras y hongos filamentosos disminuyó 1-1.5 log ufc g^{-1}, aunque no se observaron diferencias significativas entre los dos sistemas de cultivo. Durante la conservación, el recuento de levaduras y hongos filamentosos en la lechuga IV Gama aumentó ligeramente en los genotipos rojos, alcanzando la misma carga microbiológica al final de la conservación,

mientras que en la lechuga trocadero no se observaron cambios entre los sistemas de cultivo (**Figura 7.6**).

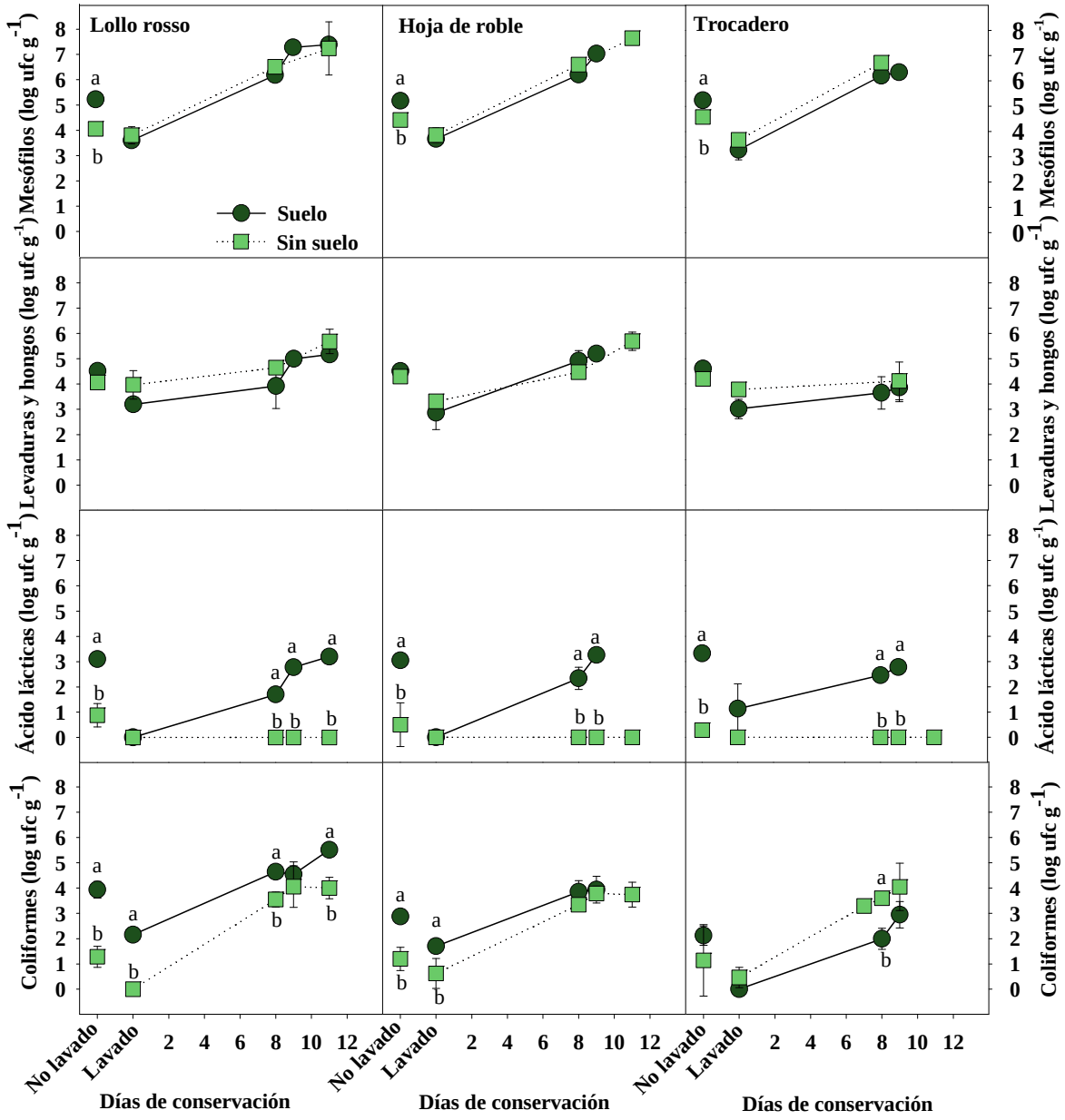


Figura 7.6. Influencia de los sistemas de producción en suelo y sin suelo en el recuento de mesófilos, levaduras y hongos filamentosos, bacterias ácido lácticas y coliformes totales de lechuga IV Gama lollo rosso, hoja de roble y trocadero conservada durante 4 días a 4 ºC y el resto a 7 ºC. Los valores representan la media de 3 réplicas y la desviación estándar. Las letras distintas indican diferencias significativas. Ns: sin diferencias significativas.

La población de bacterias ácido lácticas (LAB) en muestras sin lavar fue significativamente superior en lechugas cultivadas en suelo que sin suelo (3.1 ± 0.1 y 0.6

±0.3 log ufc g^{-1}, respectivamente) para los tres genotipos. Después del lavado, el recuento de las muestras en suelo disminuyó 2.8 log ufc g^{-1} alcanzando valores cercanos al límite de detección (< 50 ufc g^{-1}).

Durante la conservación, se observó un aumento en las LAB en las lechugas lavadas cultivadas en suelo, alcanzando niveles similares a las lechugas sin lavar para los tres genotipos. Sin embargo, durante la conservación se observó un menor recuento de LAB en las lechugas IV Gama cultivadas sin suelo comparado con las cultivadas en suelo. Se observaron diferencias significativas en el recuento de LAB, alcanzando recuentos 3 log ufc g^{-1} superiores en las muestras cultivadas en suelo con respecto a las cultivadas sin suelo, para los tres genotipos estudiados. Los niveles de LAB no alcanzaron las especificaciones de Debevere (1996) empleadas para la determinación de la vida útil.

Los coliformes totales en lechuga IV Gama sin lavar cultivadas en suelo fueron significativamente mayores (3.9, 2.9, 2.1 log ufc g^{-1} en lollo rosso, hoja de roble y trocadero, respectivamente) con respecto a las lechugas cultivadas sin suelo (1.2 ± 0.1 log ufc g^{-1}) (**Figura 7.6**).

Durante el lavado se observó una disminución más importante en lechugas IV Gama cultivadas en suelo (1.8, 1.2, 2.1 log ufc g^{-1} en lollo rosso, hoja de roble y trocadero, respectivamente) comparadas con las cultivadas sin suelo (1.3, 0.6 y 0.1 log ufc g^{-1} en lollo rosso, hoja de roble y trocadero, respectivamente). El recuento de coliformes totales presentó diferencias significativas entre los sistemas de cultivo en lollo rosso y trocadero, mientras que en hoja de roble no se observarón diferencias significativas (**Figura 7.6**). Los valores de coliformes fecales y *Listeria* spp. fueron inferiores al límite de detección.

5. DISCUSIÓN

Las condiciones de cultivo son importantes para mantener la calidad de la lechuga en IV Gama. El contenido en nutrientes es uno de los aspectos más importantes para el éxito de la producción vegetal. Desde esta perspectiva, los sistemas sin suelo representan una práctica agrícola importante, porque permiten el control preciso de la nutrición de la planta mejorando el rendimiento de los vegetales de hoja (Nicola y col., 2005). De acuerdo con nuestros resultados, para alcanzar el mismo estado de madurez, el ciclo de cultivo en invierno en suelo fue más largo que en el cultivo sin suelo (102 vs 63 días). Por el

contrario, en primavera se observó un ciclo similar de cultivo entre ambos sistemas. Sin embargo, no se pudo estudiar la calidad visual de la lechuga en IV Gama por falta de acogollamiento del corazón de la lechuga cultivada en el sistema sin suelo.

En este estudio, el periodo de crecimiento corto en los sistemas sin suelo en invierno permitió reducir el deterioro ocasionado por las condiciones climatológicas adversas. La información que nos permite conocer las condiciones de cultivo sin suelo que afectan a la calidad y seguridad de la lechuga IV Gama es limitada respecto a la información que existe del cultivo en suelo. En este estudio fue posible la comparación de los sistemas en suelo y sin suelo porque ambos se realizaron en la misma finca experimental al aire, durante la misma estación y con el mismo estado de madurez para los tres genotipos. Al controlar estas variables, nos permitieron centrarnos en el efecto del sistema de cultivo “en suelo vs sin suelo”. Se estudiaron lechugas rojas y verdes para evaluar si influye el genotipo en el sistema de producción. Además comparamos, los sistemas sin suelo en campo abierto y en invernadero. Sin embargo, no se pudo completar el estudio en invernadero debido a la falta de acogollamiento en lechuga trocadero y falta de color en los genotipos rojos, además del desarrollo de enfermedades como la presencia de tib burn en todos los genotipos.

La influencia de las prácticas agrícolas en la calidad postcosecha es poco conocida. El pardeamiento en la zona de corte es el principal factor en la pérdida de calidad de la lechuga IV Gama (López-Gálvez y col., 1996; Kim y col., 2005). En nuestro estudio, el desarrollo de pardeamiento se impidió en lechuga trocadero en IV Gama debido al bajo nivel de O_2 en el espacio de cabeza (< 1 kPa).

Sin embargo, el pardeamiento desarrollado en las muestras de lechuga IV Gama lollo rosso y hoja de roble cultivadas en suelo, se consideró significativamente visible y afectó negativamente a la calidad del producto. En muestras de hoja de roble conservadas en atmósfera activa se observaron diferencias en el pardeamiento entre cultivos en suelo y sin suelo, debido al descenso de los niveles O_2 por debajo de 1 kPa a partir de 7 días en las muestras cultivadas sin suelo. En el caso de lechugas IV Gama lollo rosso, la concentración de O_2 fue muy elevada (13 kPa a los 7 días) para prevenir eficazmente el pardeamiento y los niveles de CO_2 también moderados (5.2 kPa) como consecuencia de la conservación en atmósfera pasiva. Lipton (1978) observó que solo niveles de CO_2 > 7.5

kPa retrasaron efectivamente e incluso evitaron el pardeamiento en la superficie del corte, independientemente de la concentración de O_2. El control del pardeamiento en lechugas IV Gama lollo rosso y hoja de roble cultivadas sin suelo pudo ser debido en parte, al alto contenido en compuestos antioxidantes. Observamos un alto contenido en compuestos fenólicos como antocianos y flavonoides, particularmente en los genotipos rojos, de acuerdo con estudios anteriores (Nicolle y col., 2004; Llorach y col., 2008). Estos compuestos junto con la vitamina C juegan un papel importante en la resistencia de la planta y la adaptación al estrés medioambiental en la lechuga (Oh y col., 2009). En nuestro estudio, observamos dicha función durante la conservación aumentando significativamente el contenido en vitamina C en lechuga hoja de roble cultivada sin suelo. Oh y col. (2009) describieron la activación del metabolismo secundario y la protección de los antioxidantes cuando se transfirió lechuga de un ambiente protegido a condiciones normales de cultivo. Los sistemas de cultivo sin suelo empleados en este estudio son aconsejables debido al incremento del contenido en antioxidantes, especialmente en los genotipos rojos, además del aumento de las propiedades saludables del vegetal y la protección frente a las etapas de procesado y conservación de los productos de IV Gama (Hodges y Toivonen, 2008).

La preocupación por la posible contaminación de lechuga debido a su consumo en crudo ha aumentado, ya que no se incluye ningún proceso que sea microbiológicamente letal. Esta preocupación está justificada por la producción intensiva de lechuga la cual está definida como de riesgo elevado (Franz y col., 2008). El contacto directo de la lechuga con el suelo aumenta el riesgo microbiológico incrementando la población microbiana. Consecuentemente, los cultivos sin suelo pueden mejorar el rendimiento y la calidad microbiológica de la lechuga (Fallovo y col., 2009). En nuestro estudio, comprobamos que el sistema sin suelo aporta una mejor calidad higiénica lo que le permite ser empleado como alternativa al cultivo tradicional, evitando la contaminación microbiana obteniendo recuentos de coliformes inferiores.

Estudios recientes sugieren que la internalización de *E. coli* O157:H7 desde el medio hidropónico contaminado es mayor comparado con la internalización de patógenos procedentes de suelo contaminado (Sharma y col., 2009). Por lo tanto, un requerimiento principal de estos sistemas de cultivo es el mantenimiento de la calidad del agua, mediante el control higiénico de las soluciones nutritivas y de los sistemas de riego y recirculación (FAO/WHO, 2008). Del mismo modo, el riego y las precipitaciones favorecen la

transferencia de partículas del suelo a la lechuga (Abu-Hamdeh y col., 2006). Guías generales de alimentos seguros como es “La guía para minimizar los riesgos microbiológicos de frutas y hortalizas” (FDA, 1998) no han tenido en cuenta la seguridad alimentaria en la producción de lechuga y otras hortalizas de hoja con los sitemas de producción mediante técnicas sin suelo. Los sistemas sin suelo se han descrito como alternativa para el cultivo de lechuga de IV Gama debido a su bajo recuento de enterobacterias (Scuderi y col., 2011), en consonancia con nuestros resultados.

6. CONCLUSIONES

Los sistemas de cultivo sin suelo en campo abierto pueden ofrecer beneficios para la producción de lechugas ya que mejora la calidad de la materia prima y por lo tanto, la del producto en IV Gama. En general, el sistema alternativo sin suelo puede incrementar los compuestos bioactivos y reducir el riesgo microbiológico. En este estudio, observamos que el sistema sin suelo puede ser más adecuado para el cultivo de determinados genotipos y determinadas épocas del año, atendiendo a la vida útil tras el corte. Por lo tanto, para asegurar la vida de la lechuga tras el procesado en IV Gama, es necesario combinar el sistema de producción adecuado y la elección de variedades adecuadas.

CAPÍTULO VIII

INFLUENCIA DEL EXCESO DE RIEGO EN LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA RELACIONADA CON LA CALIDAD, PARDEAMIENTO Y METABOLISMO FENÓLICO DE LECHUGA ICEBERG IV GAMA

Luna, M.C., Tudela, J.A., Martínez-Sánchez, A., Allende, A., Marín, A., Gil, M.I., 2012. Long term deficit and excess of irrigation influences quality and browning related enzymes and phenolic metabolism of fresh-cut iceberg lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Postharvest Biol. Technol.*, 73, 37-45.

1. RESUMEN

Se estudió la influencia de cinco tratamientos de riego por goteo (50 % exceso, 25 % exceso, control, 25 % déficit y 50 % déficit) en la calidad y vida útil de lechuga iceberg (*Lactuca sativa* L.) entera y en IV Gama en 6 recolecciones durante tres años consecutivos. Para evitar las diferencias climatológicas entre recolecciones, se consideró la lluvia y la evapotranspiración del vegetal (ETc) durante el cultivo. El agua total aplicada se calculó considerando los tratamientos de riego + lluvia - ETc. Para poder interpretar los datos, se establecieron cuatro regímenes de riego R1 (0-100), R2 (101-200), R3 (201-300) y R4 (301-400) mm, independientemente del momento del cultivo y de las lluvias. En el momento de la recolección, las lechugas sometidas a mayor aporte hídrico presentaron menor peso, menor conductividad eléctrica del tejido, menor materia seca y un estado de madurez más avanzado. Además, el producto procesado presentó peor calidad visual y desarrolló malos olores. Sin embargo, el desarrollo de pardeamiento en el borde fue controlado por la atmósfera modificada (MAP) en todos los regímenes. Cuando el tejido vascular fue conservado en aire, los distintos regímenes de riego causaron respuestas diferentes de las actividades enzimáticas tales como fenilalanina amonio-liasa (PAL), polifenol oxidasa (PPO), peroxidasa (POD) así como en el contenido de compuestos fenólicos totales e individuales. El análisis del tejido vascular del régimen de mayor aporte de agua presentó 17 veces más actividad PAL. Además, el desarrollo de pardeamiento aumentó al aumentar la actividad PPO y el porcentaje de PPO activa, en particular con el mayor aporte de riego. A día 2, los compuestos fenólicos y en particular los derivados cafeicos mostraron un gran aumento, principalmente las muestras menos regadas, debido a la baja actividad PPO y por lo tanto, al menor consumo de compuestos fenólicos por parte de la PPO. La actividad POD no varió con los distintos regímenes de agua.

2. INTRODUCCIÓN

La disponibilidad de agua se ha convertido en un factor limitante en muchas áreas de producción de lechuga lo que ha provocado un aumento en el número de estudios sobre su gestión, especialmente en los climas áridos como el oeste de EE.UU. y España. Sin embargo, en otros casos, la aplicación de agua de riego supera las necesidades del cultivo, debido al bajo precio del agua en relación con el valor de la cosecha (Gallardo y col., 1996). Una mejora en el uso del agua requiere un mejor conocimiento del riego. Sin embargo, es necesaria una información más detallada sobre

los cambios estacionales en el crecimiento de la lechuga y en sus necesidades de agua, así como en el rendimiento y en las características de calidad.

En el caso de la lechuga IV Gama, las características de calidad de la materia prima deberían ser definidas en las especificaciones. Sin embargo, poco se conoce sobre la influencia de las prácticas agronómicas, en particular, las dosis de riego en las características de calidad del producto IV Gama. El objetivo principal de los productores de lechugas para IV Gama, es la obtención de un producto con una vida útil larga tras el corte. Sin embargo, la variabilidad en la vida útil a lo largo de las distintas estaciones, hace que las prácticas agrícolas, incluyendo el riego, sea uno de los factores más importantes que influyen en la calidad de la materia prima y en la vida útil del producto procesado.

Un riego adecuado influye positivamente en el rendimiento y en la uniformidad del cultivo, además de afectar al contenido fitoquímico del tejido vegetal y a la respuesta de los enzimas relacionados con el pardeamiento. Algunos estudios indican que las dosis de riego pueden afectar de forma positiva, negativa o no afectar al contenido fitoquímico y a los atributos de calidad (Crosby y col., 2008). El contenido de algunos fitoquímicos está relacionado con el tamaño y el estado de madurez del vegetal, además de la dosis de riego aplicada durante el cultivo. Sin embargo, la relación entre el riego y el contenido en fitoquímicos es muy difícil de explicar. Es evidente que los compuestos antioxidantes juegan un papel importante en la adaptación frente al estrés abiótico como es el déficit hídrico (Dixon y Paiva, 1995). Un elevado número de compuestos antioxidantes son metabolitos secundarios producidos por las plantas en respuesta a determinados estreses, incluyendo una amplia gama de compuestos fenólicos simples y complejos, derivados principalmente de la vía de los fenilpropanoides (Mittler, 2002; Oh y col., 2009). El enzima clave en la ruta de los fenilpropanoides es la fenilalanina amonio-liasa (PAL; EC 4.3.1.5). En muchas especies vegetales un estrés ambiental desencadena un aumento de la actividad PAL (Keles y Oncel, 2002). Además, los daños causados por ejemplo por el cortado, fragmentación o ruptura en la lechuga aumentan la actividad PAL (Ke and Saltveit, 1989; Peiser y col., 1998). Tras la inducción de la actividad PAL provocada por un daño, continúa la acumulación de compuestos fenólicos como el ácido clorogénico, ácido isoclorogénico y ácido dicafeoil tartárico relacionados con el pardeamiento en lechuga (Tomás-

Barberán y col., 1997). Estos compuesto fenólicos son sustratos naturales de enzimas oxidativos como la polifenol oxidasa (PPO; EC 1.11.1.7) y la peroxidasa (POD; EC 1.11.1.7) que originan quinonas, las cuales polimerizan originando los pigmentos pardos que conocemos como pardeamiento (Richard-Forget y Gauillard, 1997). Uno de los mayores problemas de la lechuga IV Gama es el pardeamiento en el corte, el cual es un factor limitante de su vida útil debido a la pérdida de calidad visual (Bolin y Huxsoll, 1991; Couture y col., 1993). La susceptibilidad al pardeamiento, así como los atributos bioquímicos y fisiológicos relacionados con la calidad y la vida útil de las lechugas recién cortadas han sido previamente estudiados (Couture y col, 1993; Heimdal y col., 1994; Castañer y col., 1999; Cantos y col., 2001). En este sentido, no existe un acuerdo respecto a la contribución de las actividades enzimáticas PAL, PPO y POD en el desarrollo de pardeamiento durante la conservación. Son escasos los estudios que abordan la influencia del riego controlado (ej. déficit y exceso) a largo del cultivo en la calidad de la lechuga IV Gama.

El objetivo del presente estudio fue el conocer la influencia de 5 tratamientos de riego (el tratamiento control basado en la capacidad de campo (CC), 2 dosis de exceso (+50 % y +25 %) y 2 dosis de déficit (-25 % y -50 %) durante el cultivo de lechuga iceberg y su relación con 1) la calidad de la materia prima y la del producto IV Gama y 2) el pardeamiento relacionado con las actividades de los enzimas PPO, PAL, POD y el metabolismo fenólico del tejido vascular. Los resultados obtenidos de los 5 tratamientos correspondieron a 6 fechas de recolección diferentes, durante 3 años consecutivos, agrupados en 4 regímenes de riego R1 (0-100), R2 (101-200), R3 (201-300) y R4 (301-400) mm para minimizar la influencia de las condiciones climatológicas.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Condiciones de cultivo

La lechuga iceberg (*Lactuca sativa* L.) más empleada en la industria de IV Gama fue la seleccionada para este estudio. El manejo del cultivo lo llevó a cabo la empresa productora y procesadora Primaflor S.A.T. en Pulpí (Almería). El clima mediterráneo típico de esta zona es de inviernos suaves. Durante los ensayos, la temperatura máxima y mínima fue de 22 ºC y 11 ºC, respectivamente. El tamaño de partículas del suelo de cultivo fue de 68 % arena, 14 % de limo y 18 % de arcilla, correspondiente a un suelo franco arenoso (USDA, Textural Soil Classification, 1987).

El área total cultivada fue de 1080 m^2, 216 m^2 por tratamiento de riego. Después de 5 semanas de crecimiento en semillero, las plántulas fueron trasplantadas a suelo con una densidad de 8 cabezas por m^{-2} en camas elevadas. El agua suministrada fue proporcionada mediante riego por goteo durante todo el período de crecimiento. Los tratamientos de riego se establecieron de acuerdo a un tratamiento control basado en la capacidad de campo (CC), 2 dosis de exceso (+50 % y +25 %) y 2 dosis de déficit (-25 % y -50 %). El estado hídrico del suelo fue monitorizado con tensiómetros 10, 20, 30 y 40 cm, por debajo de la superficie de las camas. Para realizar una correcta estimación del agua aportada, se consideró el aporte por la lluvia y la eliminación por evapotranspiración del cultivo (ETc). Se estimaron distintos regímenes de agua como el tratamiento de riego (mm) + lluvia (mm) − la ETc (**Ecuación 1**). La **Figura 8.1** representa la gran variabilidad en el agua aportadas debido a las lluvias, como por ejemplo en la recolección del 10 de Marzo. Por lo tanto, los 5 tratamientos se agruparon en 4 regímenes de agua diferenciados en un rango de 100 mm como: R1 (0-100), R2 (101-200), R3 (201-300) y R4 (301-400) mm.

Régimen de riego = Tratamiento de riego + lluvia − ETc (**Ecuación 1**)

3.2. Material vegetal

En este estudio se realizaron 6 recolecciones durante 3 años consecutivos: marzo 2009, octubre 2009, marzo 2010, octubre 2010, febrero 2011 y mayo 2011. Los días de cultivo tras el transplante fueron de 61, 57, 113, 49, 100 y 62, respectivamente. Noventa cabezas de lechuga por tratamiento fueron recolectadas, evitando las cabezas de los bordes de la parcela para cada tratamiento. Se eliminaron las hojas exteriores inservibles de las cabezas simulando condiciones comerciales. Después de la recolección, las muestras se transportaron al CEBAS-CSIC (150 km) (Murcia) bajo condiciones de refrigeración. Para la caracterización de la materia prima, las cabezas se pesaron y midió la compacidad en 20 de ellas. Finalmente, se conservaron 24 h en oscuridad a 4 ºC y 70 % de HR. Al día siguiente, las cabezas se procesaron como se describe a continuación. En el producto cortado sin lavar, se midió la conductividad eléctrica y el contenido en materia seca. La heterogeneidad del tejido de lechuga (fotosintético y vascular) dificultó el diagnóstico de los efectos fisiológicos de los tratamientos de riego. Por ello, los datos presentados para la calidad y vida útil del producto IV Gama corresponden a los análisis del tejido comercial (fotosintético y vascular) y los

obtenidos del pardeamiento, enzimas oxidativos y metabolismo fenólico corresponden al tejido vascular.

3.3. Conductividad eléctrica, materia seca y textura

La conductividad eléctrica del tejido se midió siguiendo el método de Fan y Sokorai (2005) con ligeras modificaciones. Cincuenta g de tejido comercial sin lavar tomado al azar, se sumergió en 250 mL de agua MiliQ. El tejido en inmersión se autoclavó a 121 ºC durante 20 min. La conductividad eléctrica de la disolución resultante se midió a temperatura ambiente con un conductímetro (Modelo CM35, Crison, Barcelona). Los resultados corresponden a 4 réplicas por tratamiento.

Para determinar el contenido en materia seca, se empleó tejido comercial sin lavar. Se secó en una estufa de aire forzado a 65 ºC hasta peso constante. Las muestras se pesaron antes y después del secado, calculando la relación entre el peso seco y el peso fresco. Se emplearon 4 réplicas de 15 g de tejido comercial por tratamiento.

La textura se midió empleando una célula Kramer con cinco cuchillas (HDP/KS5) conectado a un analizador de textura (TA.TX.plus, Stable Micro Systems, GB) como se describe en el capítulo III. Los resultados son la media de 20 réplicas por tratamiento.

3.4. Procesado y conservación

El procesado se realizó a 4 ºC en las instalaciones del CEBAS-CSIC. Las cabezas de lechuga se cortaron en rodajas de 30 mm de ancho. El procesado se realizó como se describe en el capitulo III. Las muestras se envasaron en bolsas de plástico polipropileno (PP) (Amcor Flexibles, Bristol, GB) de 35 µm, con una permeabilidad de 529 ml al O_2 m^{-2} d^{-1} atm^{-1}, de 1981 ml m^{-2} d^{-1} atm^{-1} al CO_2 y 8.41 g m^{-2} d^{-1} al H_2O a 7 ºC y 97 % RH. Se envasaron 250 g del producto en bolsas de dimensiones 230 mm × 280 mm en atmósfera MAP activa, inyectando N_2 hasta conseguir una concentración inicial de 0.5-2 kPa O_2. Las bolsas se conservaron 3 días a 4 ºC y el resto a 7 ºC en oscuridad. La calidad de la lechuga IV Gama se evaluó inicialmente y después del procesado (día 0) y tras 8, 10 y 13 días de conservación. Dependiendo del parámetro evaluado se emplearon de 3 a 5 bolsas por tratamiento.

3.5. Tasa respiratoria y composición gaseosa del espacio de cabeza

La tasa respiratoria de la lechuga IV Gama cultivada bajo distintos regímenes de agua fue medida por el sistema propuesto por Lee y col. (1996) y el sistema cerrado de Jacxsens y col. (1999).

Los cambios en la composición gaseosa (O_2 y CO_2 kPa) fueron analizados en las bolsas individuales, usando una analizador de O_2 con una célula cerámica de detección electroquímica de óxido de circonio (CG-1000, Ametek, Thermox Instruments Co., Pittsburgh, PA, EE.UU) y un detector infrarrojo de CO_2 (Via 510, Horiba Instruments Co., Irvine, CA, EE.UU). Se inyectaron muestras de 1 ml tomadas del espacio de cabeza del envase. Para obtener la media de los resultados se emplearon 4 réplicas por régimen de riego.

3.6. Evaluación sensorial

La calidad sensorial de la lechuga iceberg IV Gama se evaluó inmediatamente tras el procesado y periódicamente por un panel entrenado constituido por un mínimo de cuatro evaluadores. Los parámetros estudiados fueron: malos olores, pardeamiento en el corte, pardeamiento en la superficie, textura, sabor y calidad visual general. Se emplearon diferentes escalas hedónicas descritas en el capítulo III. Se otorgó el máximo valor de la escala cuando el parámetro evaluado era el característico del producto, un valor intermedio cuando estaba al límite de la vida comercial y el mínimo valor cuando el producto estaba inaceptable.

3.7. Actividad enzimática

Debido a la gran variabilidad en el desarrollo de pardeamiento en la zona de corte entre el tejido fotosintético (en general ausencia) y vascular (gran pardeamiento), se empleó tejido vascular en todos los análisis relacionados con los enzimas oxidativos del pardeamiento enzimático y con el metabolismo fenólico. La influencia de los tratamientos de riego en las actividades enzimáticas relacionadas con el pardeamiento y el metabolismo fenólico se estudió en tejido vascular de 2 cm x 2 cm conservado en aire a 7 ºC.

Fenilalanina amonio-liasa (PAL). Para la extracción del enzima PAL se empleó el tampón borato a pH 8.5 siguiendo el método descrito por Ke y Salveit (1996). Una

muestra de 6 g se homogeneizó con 16 mL de tampón conteniendo 0.5 g de PVPP y 8 µL *β*-mercaptoetanol a 4 ºC. La actividad PAL se relacionó con la acumulación de ácido cinámico a 290 nm (ε=977 M^{-1} cm^{-1}) medida a 40 ºC con fenilalanina (Cantos y col., 2001). Las condiciones de conservación y preparación del tejido se llevaron a cabo siguiendo las recomendaciones de López-Gálvez y col. (1996) para evitar un aumento en la PAL.

Polifenol oxidasa (PPO). Se homogeneizaron 20 g con tampón fosfato a pH 7.0. Después se incubaron los extractos a 35 ºC durante 15 min y se filtraron. Para la medida de la actividad PPO se empleó el sobrenadante claro (Cantos y col., 2001). La actividad PPO se midió espectrofotométricamente a 25 ºC de acuerdo con el método de Espín y col. (1997) basado en la reacción de acoplamiento entre las o-quinonas generadas y el nucleófilo MBTH (3-metil-2-benzotiazolinona). El aducto formado se midió a 467 nm (ε=22300 M^{-1} cm^{-1}).

Peroxidasa (POD). La extracción de POD se realizó como se ha descrito anteriormente para la PPO. La actividad POD se determinó espectrofotométricamente a 25ºC de acuerdo con el método de Rodriguez-López y col. (2000). Se definió la actividad POD como la cantidad de enzima que produce 1µmol de radical ABTS* por minuto medido a 414nm (ε=31300 M^{-1} cm^{-1}).

Determinación de proteínas. La cantidad de proteínas se determinó empleando el método de Bradford (1976) con suero de albúmina como estándar. Todas las actividades enzimáticas fueron referidas a 1µg de proteína.

3.8. Extracción y cuantificación de compuestos fenólicos

El material congelado y posteriormente liofilizado (0.5 g) se homogeneizó con una mezcla de MeOH/agua/ácido fórmico (25:24:3, v:v:v) conteniendo NaF. El análisis por HPLC se realizó siguiendo la metodología propuesta por Llorach y col. (2008). Las muestras de 20 µL se inyectaron en un HPLC (bomba L-2130; Merck-Hitachi, Tokio, Japón), acoplado a un detector ultravioleta-visible (UV-Vis, Merk-Hitachi, L-2455) de longitud de onda variable y a un inyector (Merk-Hitachi L-2200). La columna empleada fue una C-18 de fase reversa LiChropher 100 (250 mm x 4 mm; 5µm de tamaño de partícula; LiChroCART 250-4, Damstadt, Alemania), usando como fase móvil

H_2O/ácido fórmico (95:5, v/v) (A) y MeOH (B). El rango de elución y los patrones empleados para la identificación y cuantificación de los compuestos fenólicos individuales se describen en el capítulo III. Los resultados son expresados en mg por 100g de peso fresco.

3.9. Análisis estadístico

Se comparó los diferentes regímenes de agua aportados y la conservación mediante el análisis de la varianza (ANOVA) con una significancia $P \leq 0.05$. Cuando se observaron diferencias significativas se realizó el test de Tukey´s usando el programa estadístico PASW Statistics 18 de Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, EE.UU). Las medias para el peso de cabeza y la compacidad correspondieron a 140, 200, 120 y 60 cabezas para R1, R2, R3 y R4, respectivamente. Los valores para materia seca y conductividad eléctrica correspondieron a 28, 40, 32, 12 réplicas para R1, R2, R3 y R4, respectivamente. Para la evaluación sensorial, cada valor representa la media de 35, 55, 30 y 15 réplicas por R1, R2, R3 y R4, respectivamente. Para las actividades PAL, PPO, POD y de compuestos fenólicos cada valor corresponde a la media de 21, 30, 24 y 9 réplicas por R1, R2, R3 y R4, respectivamente. Las menores diferencias significativas (LSD) se presentaron para los distintos regímenes de agua y conservación para un nivel de significancia de $P \leq 0.05$.

4. RESULTADOS

El cultivo se llevó a cabo en la misma finca experimental y bajo las mismas prácticas agrícolas para minimizar la influencia de otros factores precosecha, excepto el riego. Los datos corresponden a 6 recolecciones durante 3 años consecutivos en donde los 5 tratamientos se agruparon en 4 regímenes de agua aportada con el fin de considerar las variaciones en las condiciones climatológicas teniendo en cuenta la lluvia y la evapotranspiración (ETc) (**Figura 8.1**).

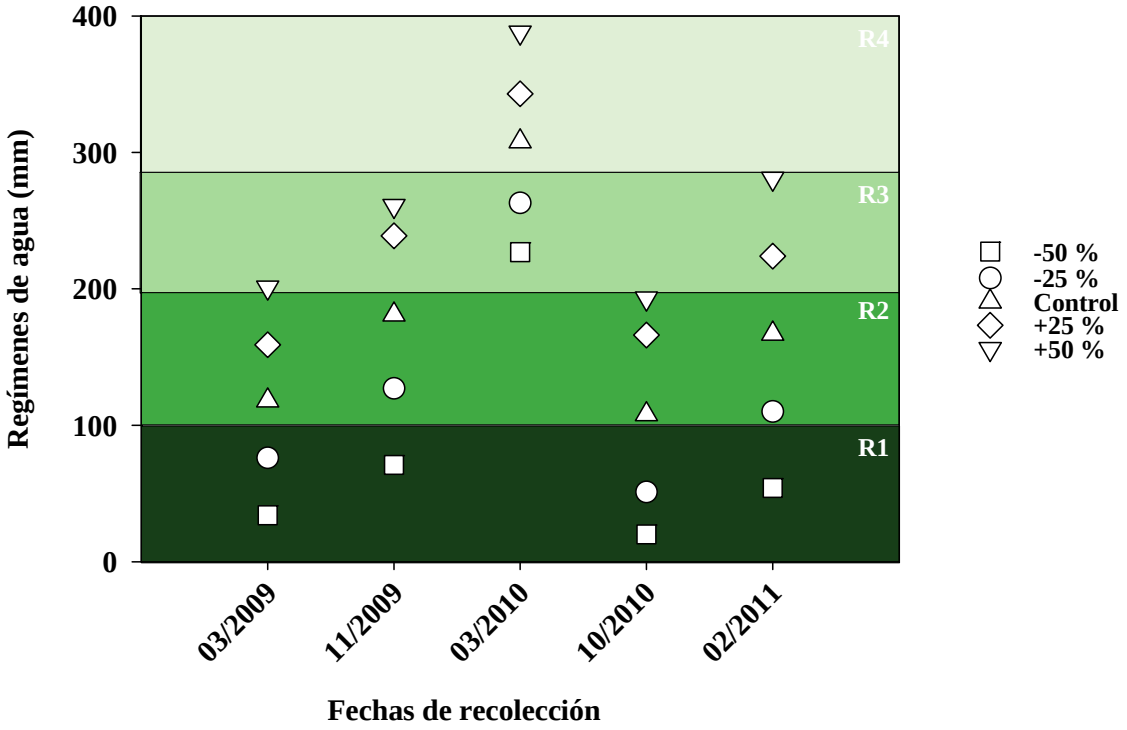


Figura 8.1. Tratamientos de riego en 6 recolecciones, durante 3 años consecutivos. Basados en un tratamiento control según la capacidad de campo (CC), 2 dosis de exceso (+50 % y +25 %) y 2 dosis de déficit (-25 % y -50 %). Se establecieron 4 regímenes de riego al considerar la lluvia y la evapotranspiración del cultivo (ETc), como R1 (0-100), R2 (101-200), R3 (201-300) y R4 (301-400) mm.

4.1. Características de calidad de la materia la prima

Se observaron diferencias significativas ($P \leq 0.001$) en el peso fresco de las cabezas entre los distintos regímenes de agua aportada. Las lechugas cultivadas con el régimen R2 presentaron mayor peso fresco que los tratamientos de exceso y déficit (**Figura 8.2A**). En contra de lo esperado, las muestras cultivadas con mayor aporte hídrico presentaron menor peso fresco. La compacidad también se vio afectada significativamente ($P \leq 0.001$) por el aporte hídrico, aumentando al incrementar el aporte de agua (**Figura 8.2B**). Como era de esperar, los regímenes de menor riego mostraron significativamente ($P \leq 0.001$) mayor conductividad eléctrica, indicando mayor concentración de solutos en aquellos regímenes de menor aporte de agua (R1 y R2> R3 y R4) (**Figura 8.2C**). Finalmente, el contenido en materia seca varió significativamente ($P \leq 0.01$) con los distintos aportes de agua, presentando menor materia seca con el mayor aporte de agua (**Figura 8.2D**).

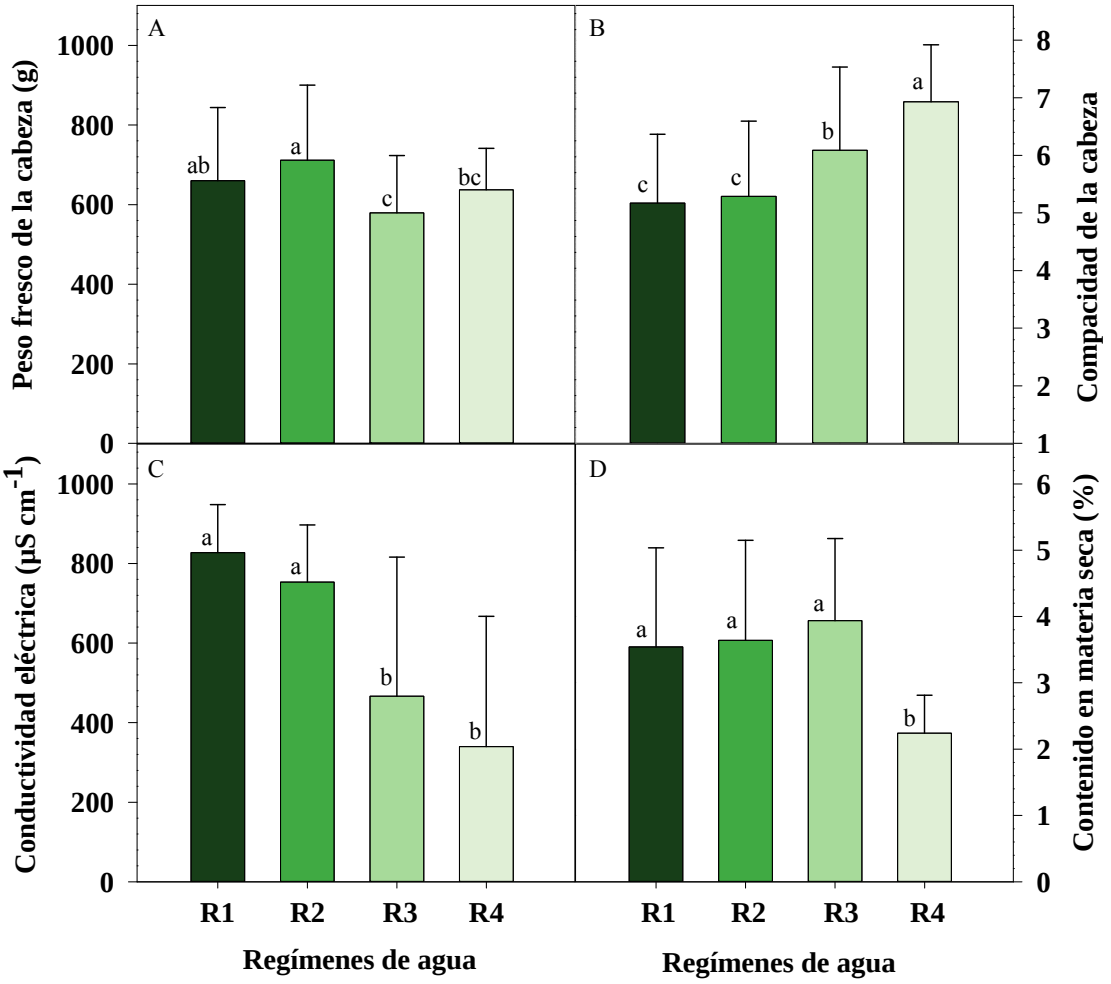


Figura 8.2. Influencia de los regímenes de agua R1 (0-100), R2 (101-200), R3 (201-300) y R4 (301-400) mm, sobre el peso de cabeza (A), la compacidad (B), la conductividad eléctrica del tejido (C) y el contenido en materia seca (D).

4.2. Calidad de la lechuga IV Gama

La calidad visual inicial entre regímenes de agua fue similar, pero se observaron diferencias significativas ($P \leq 0.001$) durante la conservación. Las lechugas cultivadas con el mayor aporte de agua (exceso de riego) fueron evaluadas con peor calidad visual que las cultivadas con menor agua aportada (**Figura 8.3A**). Después de 13 días de conservación, la calidad de la lechuga IV Gama cultivada con exceso de agua (R4) fue puntuada por debajo del límite comercial, mientras que los demás regímenes mantuvieron una calidad visual buena.

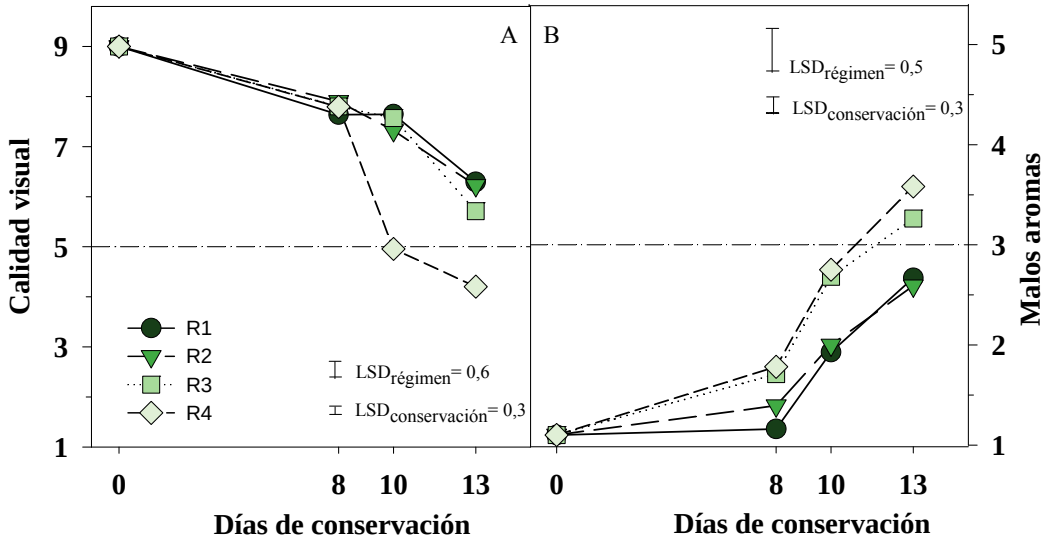


Figura 8.3. Influencia de los regímenes de agua R1 (0-100), R2 (101-200), R3 (201-300) y R4 (301-400) mm en la calidad visual (A) y los malos aromas (B) de la lechuga iceberg IV Gama conservada durante 13 días a 7 ºC.

La baja presión parcial de oxígeno (pO_2) alcanzada durante la conservación evitó el desarrollo de pardeamiento en la zona del corte. Sólo al final de la conservación se observó un ligero desarrollo de pardeamiento, sin diferencias entre los regímenes de agua (datos no mostrados). Sin embargo, durante la conservación se detectó el desarrollo de malos olores debidos a la baja pO_2 (~ 0.2 kPa) y alta presión de dióxido de carbono (pCO_2) (~ 12 kPa). Estos niveles pudieron ser los responsables del desarrollo de malos olores, estando por encima del límite de aceptabilidad en las lechugas cultivadas con los regímenes de agua más altos (R3 y R4) después de 13 días de conservación (**Figura 8.3B**).

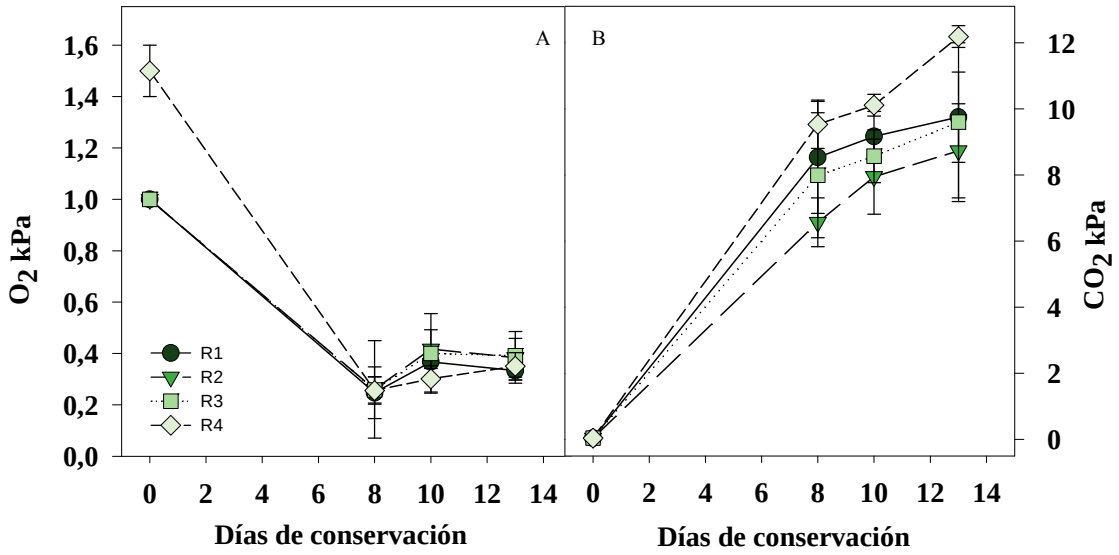


Figura 8.4. Influencia de los regímenes de agua R1 (0-100), R2 (101-200), R3 (201-300) y R4 (301-400) mm en la composición gaseosa, niveles de O_2 (A) y de CO_2 (B), en el espacio de cabeza del envase de lechuga iceberg IV Gama conservada durante 13 días a 7 ºC.

No se observaron diferencias en la tasa respiratoria entre los distintos regímenes de agua aportada medida tanto por el sistema permeable y como por el sistema cerrado. La tasa respiratoria fue de 4.5 ± 1.5 mL O_2 kg^{-1} h^{-1} a 5 kPa de O_2. Esta tasa respiratoria indica que las actividades metabólicas del producto IV Gama fueron bajas, lo que hace estimar una vida útil del producto sin deterioro de la calidad. Estos resultados confirman la similitud en la concentración de O_2 y CO_2 en todos los envases con distintos regímenes de agua. La pérdida de calidad visual en la lechuga iceberg IV Gama con el aporte R4 fue debido a la disminución de la textura y a la aparición de síntomas de deterioro. La textura, medida con la célula de cizallamiento Kramer, se expresó como la fuerza máxima, disminuyendo cuando el régimen de agua aumentó (datos no mostrados).

4.3. Pardeamiento en el borde del corte

Se observaron diferencias significativas en el desarrollo de pardeamiento del borde en el tejido vascular entre los regímenes de agua aportada a lo largo de la conservación ($P \leq 0.001$). Después de 2 días de conservación, el tejido vascular de lechuga iceberg más susceptible de pardear fue el procedente de muestras cultivadas con

exceso de agua (R4) (**Figura 8.5**). Al final de la conservación (3 y 4 días), el pardeamiento de todos los regímenes fue evaluado por encima del límite comercial, observándose sólo pequeñas diferencias entre ellos.

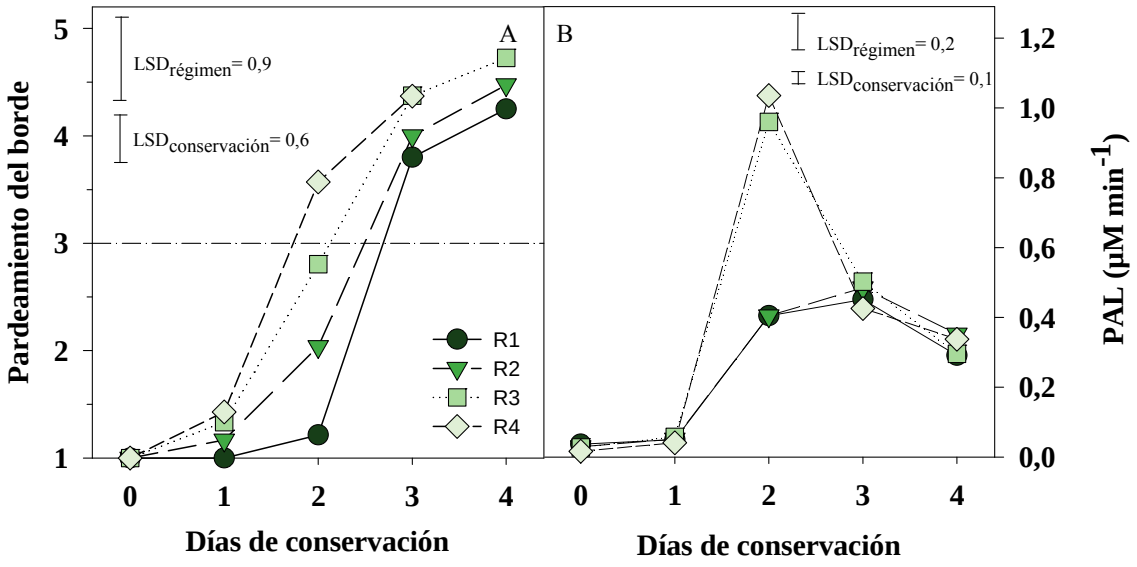


Figura 8.5. Influencia de los regímenes de agua R1 (0-100), R2 (101-200), R3 (201-300) y R4 (301-400) mm sobre el pardeamiento del borde (A) y la actividad enzimática fenilalanina amonio-liasa PAL (B), en lechuga iceberg IV Gama conservada en aire a 7º C.

4.5. Relación entre el pardeamiento y la actividad enzimática

La actividad PAL se vio influenciada por los regímenes de agua a lo largo de la conservación ($P \leq 0.001$). La inducción de la cinética inicial y el tiempo para alcanzar el nivel máximo de actividad PAL fue similar entre R1 y R2 y entre R3 y R4. Los niveles más altos de actividad PAL se observaron en los regímenes de mayor aporte de riego (R3 y R4) (**Figura 8.5**). Después de 2 días de conservación, la actividad PAL del tejido vascular se incrementó 17 veces en R3 y R4. Sin embargo, en los tratamientos con menor aporte hídrico (R1 y R2) se observó un aumento moderado y mantenido con un máximo a los 3 días de conservación, mostrando el 60 % como nivel máximo de PAL respecto a los regímenes de mayor aporte de agua.

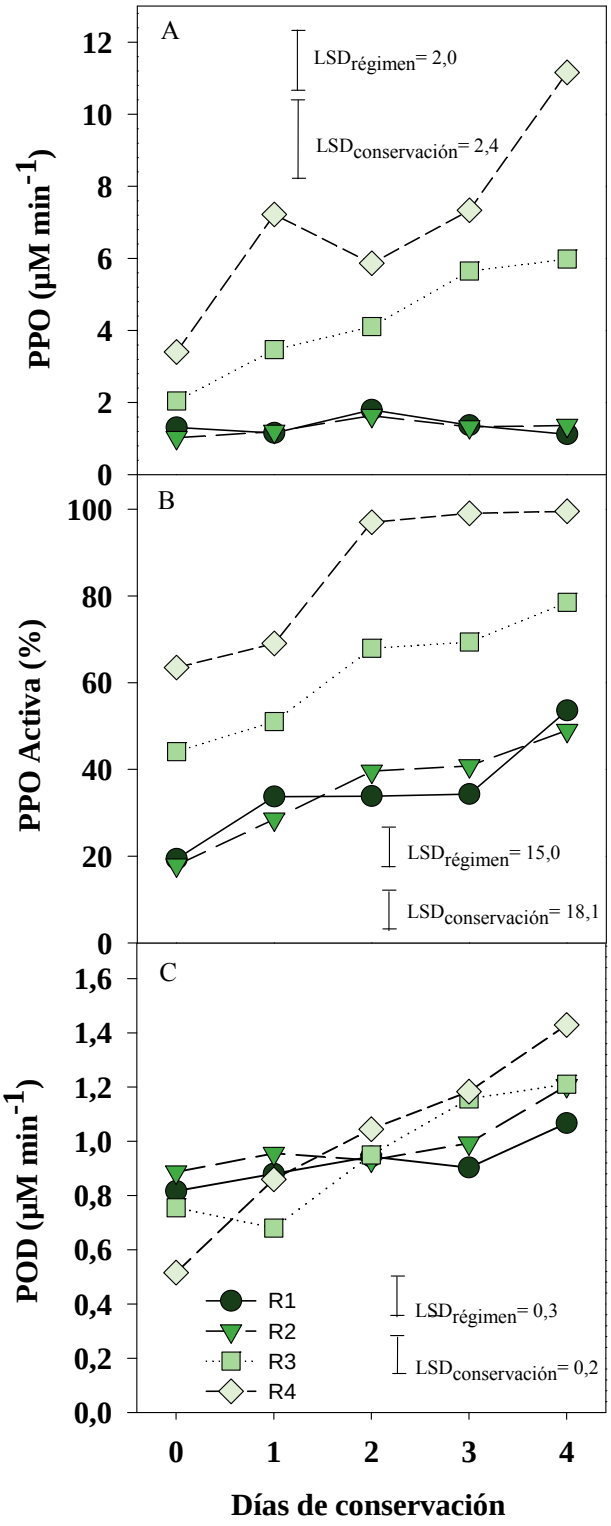


Figura 8.6. Influencia de los regímenes de agua R1 (0-100), R2 (101-200), R3 (201-300) y R4 (301-400) mm en la actividad polifenol oxidasa (PPO) (A), % de PPO activa (B) y actividad peroxidasa (POD) (C) de tejido vascular de lechuga iceberg conservado en aire a 7 ºC.

De la misma manera, la actividad PPO varió con los distintos regímenes de agua durante la conservación ($P \leq 0.01$). La actividad total PPO, considerando el % de PPO activa y latente del tejido vascular de lechuga iceberg cultivada con el régimen R4 fue la más alta (**Figura 8.6A**). Durante la conservación, la actividad PPO del R4 fue aumentando progresivamente alcanzando 3.7 veces más actividad a día 4 respecto al inicial. La actividad PPO del R3 fue ligeramente inferior que R4 pero siguió la misma tendencia durante la conservación. Por el contrario, no se observaron cambios en la actividad PPO en los regímenes R1 y R2 durante la conservación. El % de PPO activa respecto a la actividad total a día 0, inmediatamente después del corte, fue del 20 % en R1 y R2, del 43 % en R3 y del 63 % en R4 (**Figura 8.6B**). El daño causado en el tejido vascular provocó un aumento exponencial en la actividad PPO debido a los procesos de activación de la forma latente a activa. La activación total de la PPO se observó tras 2 días en R4 mientras que alcanzó el 80 % en R3 y tan solo el 50 % en R1 y R2 después de 4 días.

No se observaron diferencias en la actividad POD del tejido vascular entre los distintos regímenes Sin embargo, se observaron diferencias significativas ($P \leq 0.001$) durante la conservación (**Figura 8.6C**). Después de 4 días de conservación, la actividad POD aumentó en un 73 % respecto a la inicial.

4.6. Compuestos fenólicos

El contenido fenólico del tejido vascular varío significativamente con los regímenes de riego y la conservación ($P \leq 0.001$). Los cambios en los compuestos fenólicos individuales fueron evaluados tras el análisis por HPLC de los extractos del tejido vascular inmediatamente después del corte (día 0) y diariamente durante 4 días de conservación en aire. A día 0, el contenido fenólico total fue de 5.0-6.8 mg por 100 g sin diferencias entre los distintos regímenes (**Tabla 8.1 y Figura 8.7**). El principal grupo fenólico fue el de los derivados del ácido cafeico (75-84 %) mientras que el de los flavonoides fue el grupo minoritario (16-25 %). Después de 2 días de conservación, el contenido fenólico aumentó en todos los casos respecto a los valores iniciales, siendo 2,5 superior en R3 y R4, 3 veces en R2 y 4 veces en R1 (**Figura 8.7**). El régimen de menor aporte de agua presentó el mayor contenido fenólico comparado con los regímenes de mayor aporte (21.3, 16.1, 13.4 y 12.8 mg por 100g de peso fresco en R1, R2, R3 y R4, respectivamente). El contenido en los derivados del ácido cafeico aumentó

a día 2, particularmente el ácido *O*-cafeoiltartárico, 5-*O*-cafeoilquínico (ácido clorogénico) y el ácido di-*O*-cafeoiltartárico (ácido chicórico). Sin embargo, los flavonoides se mantuvieron más estables durante la conservación. A día 4, el contenido fenólico total disminuyó en R1 sin diferencias entre los distintos regímenes (**Figura 8.7**).

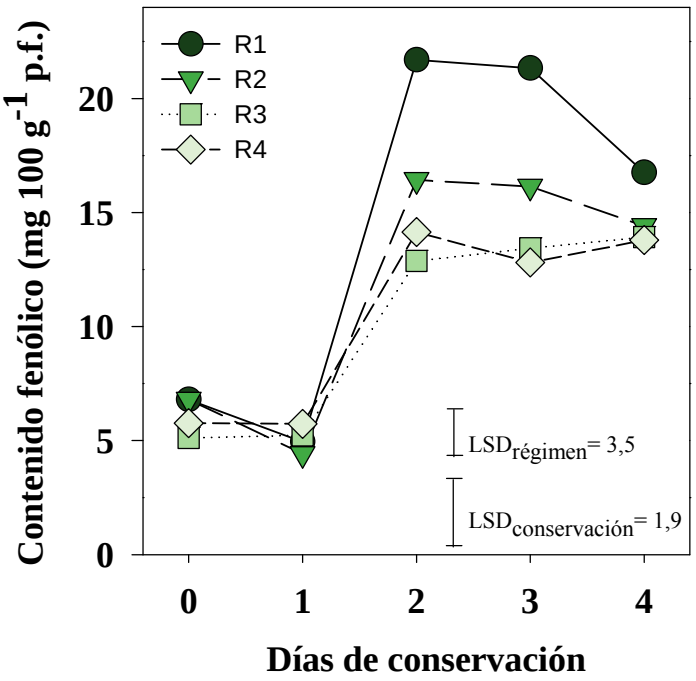


Figura 8.7. Influencia de los regímenes de agua R1 (0-100), R2 (101-200), R3 (201-300) y R4 (301-400) mm aportados sobre el contenido fenólico total en el tejido vascular de lechuga iceberg IV Gama conservado en aire a 7 ºC.

Tabla 8.1. Influencia de los regímenes de agua R1 (0-100), R2 (101-200), R3 (201-300) y R4 (301-400) mm en el contenido fenólico individual del tejido vascular de lechuga iceberg IV Gama a día 0 y tras 2 días conservado en aire a 7 ºC.

		Compuestos fenólicos individuales (µg g^{-1} peso fresco)*								
Días de conservación	**Régimen de agua**	**1**	**2**	**3**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**
Día 0										
	R1	8.9 ± 0.0	10.2 ± 0.0	1.9 ± 0.0	26.4 ± 0.1	4.4 ± 0.0	0.6 ± 0.0	3.6 ± 0.0	10.3 ± 0.0	1.7 ± 0.0
	R2	6.4 ± 0.5	7.7 ± 2.6	1.4 ± 0.0	21.1 ± 1.6	3.7 ± 0.2	0.5 ± 0.1	2.2 ± 0.2	8.7 ± 4.3	0.1 ± 0.0
	R3	8.3 ± 4.6	4.9 ± 0.9	1.5 ± 0.5	26.1 ± 12	2.8 ± 0.6	0.2 ± 0.0	1.9 ± 0.7	4.1 ± 1.8	0.8 ± 0.2
	R4	7.9 ± 1.1	3.7 ± 0.8	1.6 ± 0.4	31.6 ± 1.5	3.1 ± 0.5	0.5 ± 0.0	2.6 ± 1.0	3.8 ± 1.6	1.4 ± 0.4
Día 2										
	R1	32.2 ± 0.2	43.2 ± 0.2	19.9 ± 0.1	101.9 ± 2.0	8.3 ± 0.1	nd	4.1 ± 0.1	9.9 ± 0.1	0.8 ± 0.0
	R2	25.1 ± 6.5	28.3 ± 8.7	5.9 ± 1.1	93.7 ± 2.2	2.5 ± 0.1	nd	3.6 ± 0.0	10.4 ± 3.5	0.1 ± 0.0
	R3	14.5 ± 3.7	18.7 ± 7.0	4.1 ± 1.0	80.3 ± 8.6	3.7 ± 1.2	nd	3.9 ± 0.3	5.7 ± 1.7	0.4 ± 0.4
	R4	17.3 ± 6.5	22.7 ± 6.6	4.6 ± 2.4	84.9 ± 26.0	5.5 ± 1.7	nd	2.4 ± 1.2	3.7 ± 1.0	0.4 ± 0.4

Los valores son la media de n = 3 ± desviación estándar. *Para la identificación: 1: Ác. Cafeoiltartárico, 2: Ác. Clorogénico, 3: Ác. Cafeoilmálico, 5: Ác. Chicórico, 6: Ác. Meso-di-*O*-cafeoiltartárico, 7: Ác. Isoclorogénico, 8: Quercetina-3-*O*-glucosido, 9: Luteolina-7-glucosido, 10: Quercetina-3-*O*-(6¨-*O*-malonil)-glucosido. nd (no detectado).

5. DISCUSIÓN

En lechuga iceberg, los regímenes de riego de los tratamientos de exceso hídrico (R3 y R4) fueron los que presentaron una mayor influencia. Sutton y Merit (1993) describieron tamaños similares en el momento de la recolección cuando se cultivaron las lechugas con una capacidad de campo de + 20 % o del -20 %. En nuestro estudio, el peso fresco fue similar en los tratamientos R1 y R2. Sin embargo, en contra de lo esperado al aumentar el aporte de agua disminuyó el peso fresco debido probablemente a la asfixia radicular (Sun y col., 2006). Además, la compacidad aumentó con el aporte de agua, indicando un estado de madurez más avanzado. La madurez en el momento de la recolección es uno de los principales factores en la calidad postcosecha (Kader, 2002). El desarrollo de pardeamiento es mayor en las lechugas sobre-maduras que en las inmaduras o maduras (Gil y col., 2012). Además, la madurez dificulta las operaciones de procesado industrial e implica un coste adicional en las cabezas muy compactas que requieren una mayor mano de obra en las operaciones de separación de las hojas. Los resultados de conductividad eléctrica sugieren que el contenido en solutos fue similar entre R1 y R2 y entre R3 y R4. Las diferencias aplicadas entre los tratamientos 0-200 mm y 201-400 mm produjeron cambios en los parámetros fisiológicos como el distinto desarrollo de pardeamiento entre regímenes relacionados con las actividades enzimáticas.

El metabolismo implicado en el desarrollo de pardeamiento de lechuga está bien documentado (López-Gálvez y col., 1996; Cantos y col., 2001). Los estudios sobre este tema relacionan principalmente el pardeamiento con la actividad PAL (Peiser y col., 1998). Sin embargo, hasta ahora no existe información sobre la influencia de regímenes de agua en el desarrollo de pardeamiento de lechuga. En el caso de patata, el pardeamiento interior conocido como “brown center” aumentó al incrementar el riego (Wurr y col., 2002). En nuestro estudio, observamos cambios en el pardeamiento relacionado con las actividades enzimáticas y la acumulación de compuestos fenólicos, más evidente en tejido vascular que en el fotosintético. La composición fenólica del tejido fresco de lechuga es variable según el tipo de tejido (Castañer y col., 1999; Fukumoto y col., 2002). Se han descrito altos niveles de compuestos fenólicos en el tejido fotosintético a pesar de que el desarrollo de pardeamiento es menor (Fukumoto y col., 2002). En el caso del tejido comercial, Kim y col. (2005) observaron un ligero desarrollo de pardeamiento en la zona de corte debido a los constituyentes antioxidantes

y a la atmósfera modificada MAP, con la aparición de malos olores como defecto principal. Sin embargo, en el caso del tejido vascular, observamos un aumento del desarrollo de pardeamiento durante la conservación en aire, particularmente al aumentar el régimen de agua.

El desarrollo de pardeamiento se ha asociado íntimamente con la síntesis de fenilpropanoides por parte del enzima PAL y posterior oxidación por el enzima PPO (Ke y Salveit, 1989). En el presente estudio, la actividad PAL aumentó y posteriormente fue disminuyendo con la conservación. El máximo de actividad PAL en R3 y R4 a día 2 fue el doble que el máximo obtenido en R1 y R2 a día 3. Como era de esperar, el incremento de la actividad PAL supuso un aumento en el contenido de compuestos fenólicos, hecho más notable en los regímenes de mayor riego. Evidentemente, fueron los derivados del ácido cafeico los que aumentaron significativamente en R1 y R2. El mayor incremento de estos compuestos fenólicos y la menor actividad PPO podrían explicar el desarrollo de pardeamiento más lento en R1 y R2, mientras que en R3 y R4 el incremento fenólico se tradujo en un mayor desarrollo de pardeamiento debido a la alta actividad PPO. Cantos y col. (2001) sugirieron que el pardeamiento enzimático de lechuga fresca cortada puede ser inducido por una mínima actividad de las enzimas oxidativas PPO y POD. Además, un contenido mínimo de compuestos fenólicos sintetizado por PAL podría ser suficiente como sustratos en las reacciones de oxidación. Ke y Saltveit (1989) y Cantos y col. (2001), observaron que la herida en hojas de lechuga aumentó la actividad POD durante la conservación. De acuerdo con lo anterior, observamos un aumento de POD durante la conservación debido al procesado, sin influir sobre ella los distintos regímenes de agua. La actividad enzimática puede variar según las unidades utilizadas para expresarla. En nuestro caso, cuando expresamos los resultados de PAL en peso fresco o en base a la cantidad de proteína, observamos la misma tendencia (datos no mostrados). En el caso de PPO y POD sólo se expresaron en base a la proteína total debido al protocolo de extracción realizado. Estudios previos, intentaron correlacionar o explicar la susceptibilidad del pardeamiento de lechuga con los atributos bioquímicos y fisiológicos y la calidad y vida útil de lechuga IV Gama (Couture y col., 1993; Heimdal y col., 1994; Castañer y col., 1999; Cantos 2001). Sin embargo, no hay acuerdo en la posible contribución de las enzimas PAL, PPO y POD al pardeamiento de lechuga IV Gama. En informes anteriores se destacó una correlación entre el aumento de la actividad PPO y el proceso de pardeamiento (Couture y col.,

1993; Castañer y col., 1999), mientras que otras publicaciones indicaron la ausencia de correlación (Ke y Saltveit, 1989; Heimdal y col., 1994; Cantos 2001). Nuestros resultados, mostraron la gran contribución de las enzimas PPO y PAL al pardeamiento del tejido vascular y permiten explicar las diferencias entre los distintos regímenes de riego.

6. CONCLUSIÓNES

Este estudio permitirá a los productores de lechuga optimizar el régimen de riego como una estrategia para obtener un óptimo rendimiento y una excelente calidad, con la ventaja añadida de alargar la vida útil del producto IV Gama. El exceso de riego aceleró la velocidad del desarrollo de pardeamiento correlacionado positivamente con una mayor actividad PPO y PAL en lechuga iceberg. Se observó un considerable ahorro de agua con el tratamiento de riego de -25 % sobre el riego convencional.

CAPÍTULO IX

OPTIMIZACIÓN DE LA GESTIÓN DEL AGUA PARA CONTROLAR LA TASA DE RESPIRACIÓN Y REDUCIR EL PARDEAMIENTO Y LA CARGA MICROBIANA DE LECHUGA ROMANA EN IV GAMA

Luna, M.C., Tudela, J.A., Martínez-Sánchez, A., Allende, A., Gil, M.I., 2012. Deficit irrigation preserves microbiological quality and shelf life of fresh-cut romaine lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Postharvest Biol. Technol.*, 2012, enviado.

1. RESUMEN

En el capítulo anterior se estudió la influencia de los regímenes de riego en exceso y déficit sobre la calidad de la lechuga iceberg en IV Gama, con especial énfasis en el pardeamiento relacionado con los enzimas oxidativos y el metabolismo fenólico. Como el comportamiento puede ser diferente entre los distintos tipos de lechuga, en este capítulo estudiamos la lechuga romana por ser el segundo tipo de lechuga más importante para IV Gama, después de iceberg. Se estudió la influencia de diferentes regímenes de agua sobre la tasa respiratoria, pardeamiento enzimático y calidad microbiológica de lechuga romana IV Gama (*Lactuca sativa* L.) en 6 recolecciones durante 3 años consecutivos. La cantidad de agua aportada al cultivo se calculó teniendo en cuenta el riego y la lluvia. Se establecieron 6 regímenes de agua basados en el régimen de riego convencional (RC): -35 % RC (< 221 mm), -15 % (221-265 mm); RC (266-320 mm); +15 % RC (321-370 mm); + 35 % RC (371-430 mm) y +75 % RC (> 431 mm). Las características de calidad de las cabezas de lechugas se vieron influenciadas por los regímenes de agua. El mayor peso de cabeza se obtuvo con el aporte hídrico ≥ RC y ≤ +15 % RC. La población microbiana fue mayor en las cabezas con aporte de agua ≥ +35 % RC. Estas diferencias también se observaron en la lechuga IV Gama después del procesado (0 d). Sin embargo, después de 10 días de conservación, el recuento de bacterias aeróbicas psicrotrofas aumentó 2 log ufc g^{-1} sin diferencias significativas entre los regímenes de riego. A pesar de la alta población de *Pseudomonas* spp., 6 log ufc g^{-1} en el régimen deficitario -35 % RC y 8 log ufc g^{-1}en exceso +75 % RC, sin embargo, no se relacionaron con la pérdida de calidad del producto conservado. No se observaron diferencias en la calidad de la lechuga romana IV Gama debido a los niveles similares de gases en el espacio de cabeza de los envases. Sin embargo, cuando el tejido vascular se conservó en aire el desarrollo de pardeamiento fue menor en las muestras menos regadas, a pesar de la mayor acumulación de compuestos fenólicos. La actividad PPO aumentó con el incremento del aporte hídrico. La tasa respiratoria fue significativamente superior bajo condiciones extrema, tanto de déficit (-35 %) como de exceso hídrico (+35 %). En conclusión, son necesarias unas buenas prácticas agrícolas tanto para la sostenibilidad del medio ambiente como para asegurar la calidad del producto entero y procesado en IV Gama. Es necesaria la optimización del manejo del riego para cada tipo de lechuga debido al distinto comportamiento.

2. INTRODUCCIÓN

Es conocido que el 70 % del agua consumida se emplea en agricultura (UNESCO, 2012). Por ello, uno de los desafíos de los agricultores de la zona del Mediterráneo es optimizar las prácticas de riego para disminuir el agua empleada durante el cultivo. Las plantas dependen más de la disponibilidad de agua que de otros factores ambientales (Kramer y Boyer, 1995). La importancia fisiológica del agua se debe a sus funciones como principal constituyente de las plantas, disolvente universal, reactivo activo en reacciones hidrolíticas y fotosíntesis así como en el mantenimiento de la turgencia de las paredes celulares y de las células (Ben-Yehoshua y Robov, 2003).

La lechuga es uno de los vegetales de mayor consumo e importancia económica en el mundo (FAOSTAT, 2010). Es un cultivo de estación fría, fácilmente cultivable en suelos bien drenados, ricos en fertilizantes orgánicos y con adecuada aportación de agua. El agua es el factor limitante más importante en la producción de la lechuga (Coelho y col., 2005). Es de esperar que el riego influya en la calidad del producto durante la postcosecha porque el agua afecta a la expansión celular y al estado hídrico de la hoja. Si las plantas se encuentran bajo severos estreses en el momento del cultivo, debido a condiciones ambientales extremas o abusivas prácticas agrícolas, sufren un efecto negativo sobre la calidad postcosecha. Fonseca (2006) observó el efecto de la humedad en el momento de la recolección y su influencia en la calidad sensorial y microbiológica en la lechuga iceberg. La lechuga iceberg regada 4 días antes de la recolección presentó una carga microbiana 0.4 log ufc g^{-1} superior a las regadas 16 días antes de la recolección. Recientemente, Medina y col., (2012) demostraron que en espinacas "baby" procesada en condiciones de alta humedad relativa (HR) (con mayor contenido en agua), el recuento de psicrófilos y *Pseudomonas* era superior a las expuesta a HR medias y bajas. El agua no sólo influye en la calidad microbiológica, sino también, en la vida útil de las hortalizas en IV Gama. Otros estudios, sugieren que un estrés hídrico controlado en el último periodo de crecimiento del cultivo puede preservar la calidad durante la postcosecha (Wurr y col., 2002). Estos autores concluyen que un estrés por sequía durante la maduración de la cabeza del brócoli, aumentó los dos parámetros de calidad más importantes para su comercialización, la turgencia del tallo y el color de la cabeza. El estrés hídrico impuesto en el brócoli (*Brassica oleracea* L. var. Italica) aumentó la vida útil de 2 a 3 días alcanzando 13 días a 15 ºC. Igualmente, el estrés hídrico se ha descrito que puede mejorar la calidad postcosecha de zanahorias (*Daucus carota* L.), melón (*Cucumis melo* L.) y apio (*Apium*

graveolens L.), pero que el efecto positivo del estrés depende del momento en que se aplica a la planta (Nicola y col., 2009). Probablemente, los atributos de calidad más importantes para los productores de la lechuga IV Gama en relación a maximizar la vida útil, son la apariencia y la textura (Toivonen y Brummell, 2008). Un análisis de los diversos componentes de la calidad visual global de la lechuga mostró, que el pardeamiento del borde es el defecto que más contribuye a disminuir la calidad (López-Gálvez y col., 1996a). La calidad de la lechuga en la recolección debe ser alta, ya que las prácticas de procesado sólo pueden mantener la calidad nunca mejorarla. En el capítulo anterior, estudiamos la influencia del déficit y exceso de riego en la calidad de la lechuga iceberg IV Gama con especial énfasis en los enzimas de pardeamiento relacionados con el metabolismo fenólico. Los resultados mostraron que un déficit de riego del 25 % prolonga la vida útil de la lechuga iceberg IV Gama, debido a la disminución del pardeamiento en la zona del corte y que los efectos negativos sobre la calidad se desencadenan con los tratamientos +25 % y +50 % de riego. En este capítulo se estudió el efecto del riego en la lechuga romana, el segundo tipo más importante después de iceberg ya que puede haber diferencias debidas a las características del tipo de lechuga,. Los objetivos de este capítulo fueron el estudio del impacto de distintos regímenes de riego en la calidad de la lechuga romana IV Gama, con especial énfasis en el pardeamiento, metabolismo fenólico, calidad microbiológica y tasa respiratoria del producto de IV Gama.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

En este capítulo se estudió la lechuga romana (*Lactuca sativa* L. var. longifolia). El manejo del cultivo lo realizó Primaflor S.A.T. en la finca experimental de Pulpí (Almería). Las condiciones de cultivo fueron similares al estudio de riego de lechuga iceberg (capítulo VIII). En verano, el promedio de las temperaturas máximas y mínimas diarias fue de 22 ºC y 11 ºC, respectivamente. La textura del suelo de la finca experimental se clasificó como franco arenoso (USDA, Textura Soil Classification, 1987). El área total cultivada fue de 1080 m^2, 216 m^2 por tratamiento. El cultivo se realizó siguiendo las prácticas convencionales de cultivo de lechuga. Después de 5 semanas de crecimiento en semillero las plántulas fueron trasplantadas a suelo con una densidad de 8 cabezas por m^{-2} en camas elevadas. El agua suministrada fue proporcionada mediante riego por goteo subterráneo durante todo el período de crecimiento. Los tratamientos de riego se establecieron de acuerdo a la dosis de riego estándar (167-270 mm), 2 de déficit (-25 % y -50 % de la estándar) y 2 de exceso (+25 % y +50 % de la estándar). Debido a las precipitaciones, el

volumen de agua recibida por el cultivo durante el periodo de crecimiento difirió de las dosis de riego (**Figura 9.1**). Por ello, se establecieron 6 regímenes de riego como resultado de la suma del agua de riego (mm) y la aportada por las lluvias (mm) como: -35 % RC (<221 mm), -15 % RC (221-265 mm), RC (266-320 mm), +15 % RC (321-370 mm), +35 % RC (371-430) y +75 % de RC (> 430) mm (**Figura 9.1**).

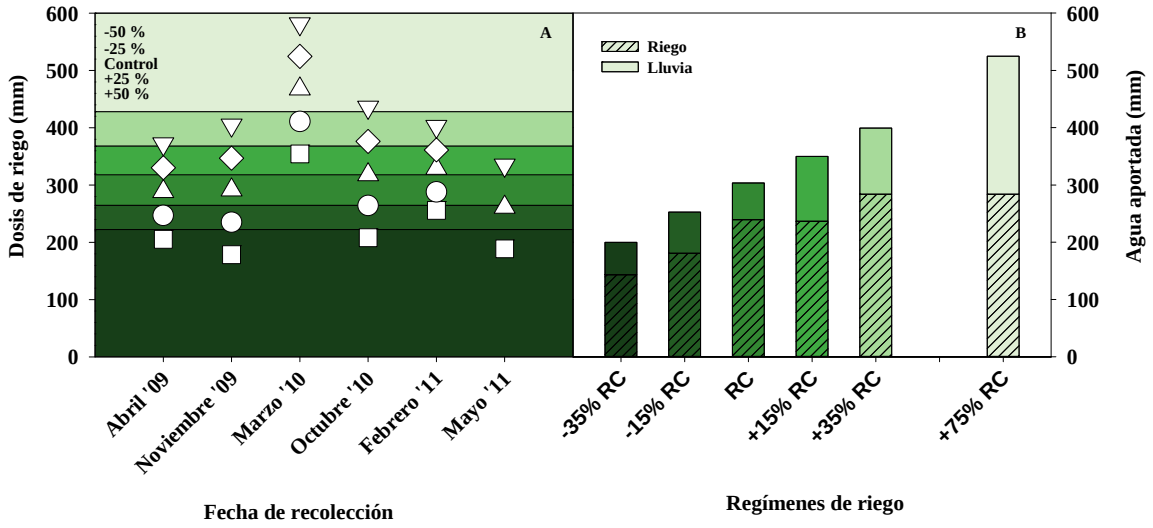


Figura 9.1. Los cinco tratamientos de riego, basados en la dosis de riego estándares, aplicados en 6 recolecciones durante 3 años consecutivos (A). Al considerar el riego y las lluvias, se establecieron 6 regímenes de riego (B).

3.1. Material vegetal

En este estudio se realizaron 6 recolecciones durante 3 años consecutivos: abril 2009, octubre 2009, marzo 2010, octubre 2010, febrero 2011 y mayo 2011. Estas recolecciones corresponden a los días de cultivo tras el trasplante de 67, 50, 102, 42, 109 y 54, respectivamente. La recolección se realizó cuando las cabezas del tratamiento control (RC) alcanzaron la madurez comercial (600 g) y la longitud del espigón (entre 50-80 mm) (descrito en el capítulo III). Se recolectaron 90 cabezas de lechuga por tratamiento evitando las cabezas de los bordes de la cama. Se eliminaron las hojas exteriores inservibles de las cabezas simulando condiciones comerciales de acondicionamiento de la materia prima. Después de la recolección, las muestras se transportaron al CEBAS-CSIC (150 km) (Murcia) bajo condiciones de refrigeración. Posteriormente, se determinó el índice de madurez (descrito en el capítulo III) y el peso de 20 cabezas por régimen de riego. Finalmente, se conservaron 24 h en oscuridad a 4 ºC y 70 % de HR. Al día siguiente,

las cabezas se procesaron siguiendo el protocolo descrito en el capítulo anterior. Después del cortado y antes del lavado, se midió la textura, el contenido en materia seca y la conductividad eléctrica del tejido.

Los datos de calidad visual durante la conservación corresponden al material comercial (fotosintético y tejido vascular) y los relacionados con el análisis de pardeamiento enzimático, enzimas oxidativos y metabolismo fenólico corresponden al tejido vascular.

3.2. Conductividad eléctrica, materia seca y textura

La conductividad eléctrica del tejido se midió siguiendo el método de Fan y Sokorai (2005) con ligeras modificaciones. Una muestra de 50 g de tejido comercial sin lavar tomada al azar se sumergió en 250 mL de agua MiliQ. El tejido en inmersión se autoclavó a 121 ºC durante 20 min. La conductividad eléctrica de la solución resultante se midió a temperatura ambiente con un conductímetro (Modelo CM35, Crison, Barcelona). Los resultados corresponden a 4 réplicas por tratamiento.

Para determinar el contenido en materia seca, se empleó tejido comercial sin lavar el cual se secó en una estufa de aire forzado a 65 ºC hasta peso constante. Las muestras se pesaron antes y después del secado y a partir de estos datos se calculó la relación del peso seco con el peso fresco. Los resultados corresponden a 4 réplicas de 15 g de tejido comercial por tratamiento.

La textura se midió empleando una célula Kramer con cinco cuchillas (HDP/KS5) conectada a un analizador de textura (TA.TX.plus, Stable Micro Systems, GB) como se describe en el capítulo III. Los resultados se obtuvieron de 20 réplicas por tratamiento.

3.3. Procesado y conservación

El procesado se realizó a 4 ºC en las instalaciones del CEBAS-CSIC. Las cabezas se cortaron en rodajas de 30 mm de ancho. El procesado se realizó como indica el capitulo III. Las muestras se envasaron en bolsas de polipropileno (PP) (Amcor Flexibles, Bristol, UK) de 35 µm, con una permeabilidad de 529 mL de O_2 m^{-2} d^{-1} atm^{-1}, 1981 mL m^{-2} d^{-1} atm^{-1} de CO_2 y 8.41 g m^{-2} d^{-1} de H_2O a 7 ºC y 97 % HR. Se envasó 175 g de producto en bolsas de 230 mm × 280 mm en atmósfera MAP activa inyectando N_2 para disminuir la

concentración inicial de O_2 entre 0.5 y 2 kPa. Las bolsas se conservaron 3 días a 4 ºC y el resto a 7 ºC en oscuridad. La calidad de las lechugas en IV Gama se evaluó inicialmente (día 0) y después de 8, 10 y 13 días de conservación. Se emplearon de 3 a 5 bolsas por tratamiento dependiendo del parámetro evaluado.

3.4. Tasa respiratoria y composición gaseosa del espacio de cabeza

La tasa respiratoria de la lechuga romana IV Gama se midió a 7 ºC en un sistema cerrado y en un sistema permeable propuesto por Fonseca y col. (2002) en las lechugas recolectadas en Octubre de 2009 y Febrero 2011, respectivamente. Muestras de 150 g de lechuga comercial se introdujeron en tarros de 1.5 L. Los tarros se cerraron con atmósfera inicial de aire. La concentración de O_2 en el espacio de cabeza se midió a distintos intervalos de tiempo hasta alcanzar el 5 % de O_2. Los niveles de O_2 se ajustaron a una ecuación de segundo grado descrita por Gong y Corey (1994). En el sistema permeable, 175 g de producto fresco se envasaron dentro de una bolsa de 35 µm de polipropileno (PP), con una permeabilidad al O_2 de 529 mL O_2 m^{-2} d^{-1} atm^{-1}, 1150 mL de volumen inicial y 0.12 m^2 de área. La concentración inicial de O_2 en el espacio de cabeza fue del 20.9 %. Los cambios producidos en los niveles de O_2 se ajustaron a una curva para determinar la tasa respiratoria siguiendo la propuesta por Lee y col. (1996). Para ambos sistemas, la tasa respiratoria se determinó empleando 4 réplicas por tratamiento de riego.

La tasa respiratoria y los cambios en la composición gaseosa del espacio de cabeza (O_2 y CO_2 kPa) fueron analizados en los envases individuales, empleando un analizador de O_2 con una célula cerámica de detección electroquímica de óxido de circonio (CG-1000, Ametek, Thermox Instruments Co., Pittsburgh, PA, EE.UU) y un detector infrarrojo de CO_2 (Via 510, Horiba Instruments Co., Irvine, CA, EE.UU). Diariamente se analizaron 0.25 mL del espacio de cabeza por envase. Los resultados corresponden a 4 réplicas por tratamiento.

3.5. Evaluación sensorial

La calidad sensorial de la lechuga romana IV Gama se evaluó inmediatamente tras el procesado (día 0) y periódicamente por un panel entrenado constituido por un mínimo de 4 evaluadores. Los parámetros estudiados fueron: malos olores, pardeamiento en el corte, pardeamiento en la superficie, textura, sabor y calidad general global. Se emplearon diferentes escalas hedónicas explicadas en el capítulo III de esta tesis doctoral. Se otorgó el

máximo valor de la escala cuando el parámetro evaluado era el característico del producto, un valor intermedio cuando estaba al límite de la vida comercial y el mínimo cuando el producto se encontraba degradado.

3.6. Actividad enzimática

Debido a la gran variabilidad en el desarrollo de pardeamiento de la zona de corte entre el tejido fotosintético y el vascular, se estudió el tejido vascular para correlacionarlo con los enzimas relacionados con el pardeamiento enzimático y el metabolismo fenólico. La influencia de los tratamientos de riego en las actividades enzimáticas relacionadas con el pardeamiento y el metabolismo fenólico se estudió en el tejido vascular de 2 x 2 cm conservado en aire a 7 ºC.

Fenilalanina amonio-liasa (PAL). Para la extracción del enzima PAL se empleó tampón borato a pH 8.5 siguiendo el método descrito por Ke y Salveit, (1996). Se homogeneizaron 6 g de tejido vascular en 16 mL de tampón conteniendo 0.5 g de PVPP y 8 µL β-mercaptoetanol a 4 ºC. La actividad PAL se relacionó con la acumulación de ácido cinámico a 290 nm (ε=977 M^{-1} cm^{-1}) medida a 40 ºC, usando fenilalanina (Cantos y col., 2001). Las condiciones de conservación y preparación del tejido se llevaron a cabo siguiendo las recomendaciones de López-Gálvez y col. (1996) para evitar un aumento de la PAL.

Polifenol oxidasa (PPO). Se homogeneizaron 20 g de tejido vascular con tampón fosfato a pH 7.0 y posteriormente se incubaron a 35 ºC durante 15 min y filtraron. Para la medida de la actividad PPO se empleó el sobrenadante claro (Cantos y col., 2001). La actividad PPO se midió espectrofotométricamente a 25 ºC de acuerdo con el método de Espín y col. (1997) basado en la reacción de acoplamiento entre las *o*-quinonas generadas y el nucleófilo MBTH (3-metil-2-benzotiazolinona). El aducto formado se midió a 467 nm (ε=22300 M^{-1} cm^{-1}).

Peroxidasa (POD). La extracción del enzima POD se realizó como se descrito anteriormente en PPO. La actividad POD se determinó espectrofotométricamente a 25 ºC de acuerdo con el método de Rodríguez-López y col. (2000). Se definió un actividad POD como la cantidad de enzima que produce 1µmol de radical ABTS* por minuto, medido a 414 nm (ε=31300 M^{-1} cm^{-1}).

Determinación de proteínas. La cantidad de proteínas se determinó empleando el método de Bradford (1976) con suero de albúmina como estándar. Todas las actividades enzimáticas fueron referidas a 1 µg de proteína.

3.7. Extracción y cuantificación de compuestos fenólicos

El material congelado y posteriormente liofilizado (0.5 g) se homogeneizó con una mezcla de MeOH/agua/ácido fórmico (25:24:3, v:v:v) conteniendo NaF. El análisis por HPLC se realizó siguiendo la metodología de Llorach y col. (2008). Las muestras de 20 µL se analizaron en un HPLC (bomba L-2130; Merck-Hitachi, Tokio, Japón), acoplado a un detector ultravioleta-visible (UV-Vis, Merk-Hitachi, L-2455) de longitud de onda variable y a un inyector (Merk-Hitachi l-2200). La columna empleada fue una C-18 de fase reversa LiChropher 100 (250 mm x 4 mm; 5µm de tamaño de partícula; LiChroCART 250-4, Damstadt, Alemania), usando como fase móvil agua/ácido fórmico (95:5, v/v) (A) y metanol (B). El rango de elución se explica en el capítulo III, además de los patrones empleados para la detección de los compuestos fenólicos individuales. Los resultados fueron expresados en mg por 100 g de peso fresco y corresponden a las media de 3 réplicas.

3.8. Análisis microbiológico

Las muestras se analizaron después del corte y antes del lavado (recuento microbiológico de las cabezas de lechuga) y después del procesado (recuento microbiológico del producto IV Gama a día 0). Se homogeneizaron muestras de 30 g en 2 ciclos de 60 s con 0.1 % de agua de peptona tamponada estéril (BWP) (AES Laboratoire, Combourg, Francia) (1:10 dilución) (López-Gálvez y col., 2010). Para el recuento de la población de bacterias psicrotrofas se empleó agar de recuento en placa (PCA) (Scharlau Chemie S.A., Barcelona) a 22 ºC durante 48-72 h. El recuento de *Pseudomonas spp*. se realizó en agar de *Pseudomonas* (Oxoid, Ltd., Basingstoke, Hampshire, GB) a 30 ºC durante 24-48 h. Los coliformes se aislaron en Chromocult agar (Oxoid) a 37 ºC durante 24 h. Los resultados fueron expresados en log ufc g^{-1}de tejido y corresponden a 3 réplicas, cada una por duplicado.

3.9. Anatomía del tejido de lechuga

Las muestras de histología se tomaron de la zona ecuatorial de la hoja de lechuga. Se estudiaron 6 trozos de tejido fotosintético 3 x 3 mm^2 por tratamiento y por día de

conservación. Se fijaron durante 2.5 h a 4 ºC en tampón 0.1 M de fosfato sódico (pH 7.2) con 2.5 % de glutaraldehído y 4 % de paraformaldehído (Morales y col., 2001). Posteriormente, el tejido se fijó con tetróxido de osmio al 1 % durante 2 h. Las muestras se deshidrataron empleando una serie de concentraciones ascendentes de alcohol y se introdujeron en resina Spurr (Spurr, 1969). Los bloques se seccionaron con un microsistema (Ultracut Leica, Mikrosysteme, Hernalser Hauptstraße, Viena, Austria). Una sección de 0.5 µm se tiñó con azul de toluidina 0.5 % en tampón borato. Se capturaron micrografías de cada sección mediante un microscopio (Leica DMR, Wetzlar, Alemania), utilizando un objetivo de 10x y posteriormente las imágenes fueron procesadas (Leica QWin Pro V3, Wetzlar, Alemania).

3.10. Análisis estadístico

El análisis de la varianza (ANOVA) se realizó comparando los diferentes regímenes de riego durante la conservación con un nivel de significancia de $P < 0.05$. Cuando se observaron diferencias significativas, se realizó el test de Tukey´s usando el programa estadístico PASW Statistics 18 de Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). En la **Tabla 9.1** se encuentran las réplicas empleadas para obtener la media de los valores de cada uno de los parámetros analizados.

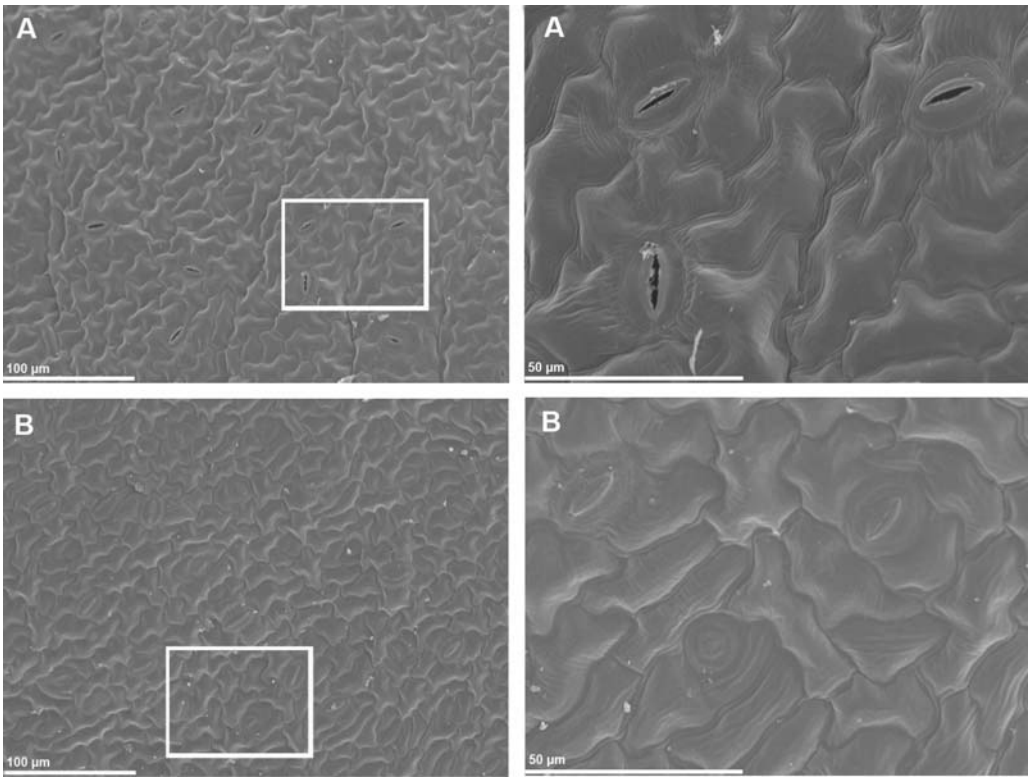
Tabla 9.1. Número de réplicas empleadas por parámetro y régimen de riego

	-35 % RC	**-15 % RC**	**RC**	**+15 % RC**	**+35 % RC**	**+75 % RC**
Peso de cabeza, índice de madurez y textura	80	100	100	140	80	60
Contenido en materia seca y conductividad eléctrica del tejido	16	20	20	28	16	12
Tasa de respiración y evaluación sensorial	20	25	35	20	15	-
PAL, PPO y compuestos fenólicos	12	15	15	21	12	9
Recuento microbiológico	12	12	9	18	9	9

4. RESULTADOS

4.1. Características de calidad de las cabezas de lechuga romana

El peso fresco de cabeza, la longitud del tallo, la textura y la materia seca fueron afectados significativamente por los regímenes de riego (**Figura 9.2**). Las lechugas romanas cultivadas con déficit -35 % RC y de exceso +75 % RC presentaron el menor peso de cabeza (500 g); las cultivadas con los regímenes -15 % RC y +35 % RC mostraron valores intermedios (550 g) mientras que las lechugas cultivadas bajo el régimen de +15 % RC alcanzaron el mayor peso (600 g) (**Figura 9.2A**). La longitud del tallo disminuyó significativamente cuando se incrementó el aporte de agua (RC ≥ +35 %), mientras que aumentó cuando se cultivaron con regímenes ≤ RC (**Figura 9.2B**). La textura y el contenido en materia seca disminuyó significativamente cuando la lechuga se cultivó con el régimen de mayor aporte hídrico (+75 % RC) (**Figura 9.2CD**). Como era de esperar, la conductividad eléctrica del tejido disminuyó cuando se incrementó el régimen de riego, presentando diferencias significativas entre el exceso y el déficit extremo (datos no mostrados). Cuando se comparó la anatomía de la hoja, observamos claras diferencias en la turgencia de las células entre los regímenes de mayor déficit (-35 % RC) y exceso (+75 % RC) **(Fotografía 9.1**).



Fotografía 9.1. Micrografías de hojas de lechuga romana sometidas a -35 % RC (A) y +75 % RC (B).

Después de la recolección, la población de bacterias aerobias psicrotrofas en las cabezas de lechuga fue significativamente afectada por los regímenes de riego ($P \leq 0.001$). El recuento de bacterias psicrotrofas fue mayor en las cabezas cultivadas con exceso de agua (+75 % RC) (**Tabla 9.2**). Además, la lechuga cultivada con el régimen de agua +75 % RC mostró la mayor población de *Pseudomonas* spp. ($P \leq 0.001$) mientras que no se observaron diferencias en el recuento de coliformes totales entre los distintos regímenes (**Tabla 9.2**).

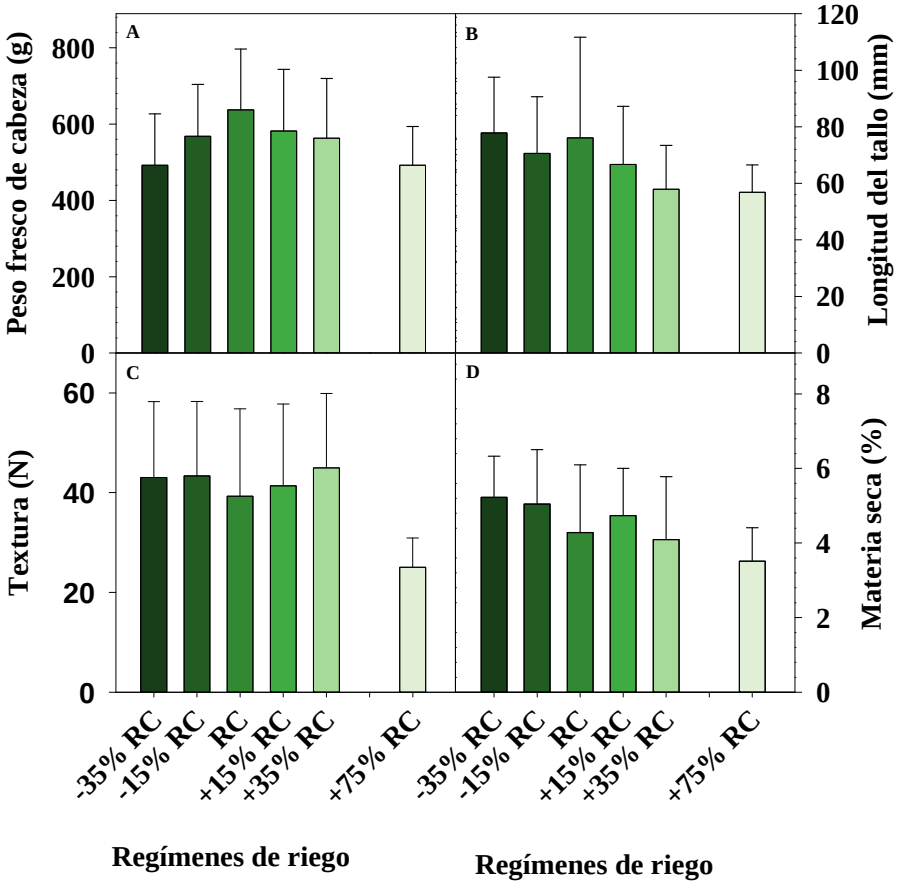


Figura 9.2. Influencia de los regímenes de riego en el peso de cabeza (A), longitud del tallo (B), textura (C) y materia seca (D).

Tabla 9.2. Influencia de los regímenes de riego (-35 % RC, -15 % RC, RC, +15 % RC, +35 % RC y +75 % RC) en la población de bacterias psicrotrofas, *Pseudomonas* spp. y coliformes totales de lechuga romana después de la recolección.

Tratamientos	Psicrotrofas (log ufc g^{-1})	Pseudomonas (log ufc g^{-1})	Coliformes (log ufc g^{-1})
-35 % RC	4.9 ± 0.1 ab	4.6 ± 0.2 b	3.6 ± 0.1
-15 % RC	4.6 ± 0.3 b	4.4 ± 0.4 b	3.6 ± 0.6
RC	3.9 ± 0.2 b	4.4 ± 0.9 b	3.5 ± 1.3
+15 % RC	4.6 ± 1.10b	4.4 ± 1.0b	3.4 ± 0.9
+35 % RC	5.2 ± 1.2 ab	5.2 ± 1.1 ab	3.9 ± 1.2
+75 % RC	6.2 ± 0.2 a	6.1 ± 0.1 a	3.0 ± 0.5
Significancia	***	***	ns

La separación de las medias se realizó mediante el test de Tukey's HSD a $P \leq 0.05$. ns, *, ** y ***, diferencias no significativas o significativas a $P \leq 0.05$, 0.01 y 0.001, respectivamente.

4.2. Tasa respiratoria de lechuga romana IV Gama

La tasa respiratoria analizada mediante el sistema cerrado y el sistema permeable mostró resultados similares. La tasa respiratoria de la lechuga romana IV Gama varió significativamente entre los regímenes de riego (**Figura 9.3**). La lechuga romana IV Gama cultivada bajo los regímenes de riego extremos (-35 % y +35 % RC) mostraron la mayor tasa respiratoria comparado con el RC.

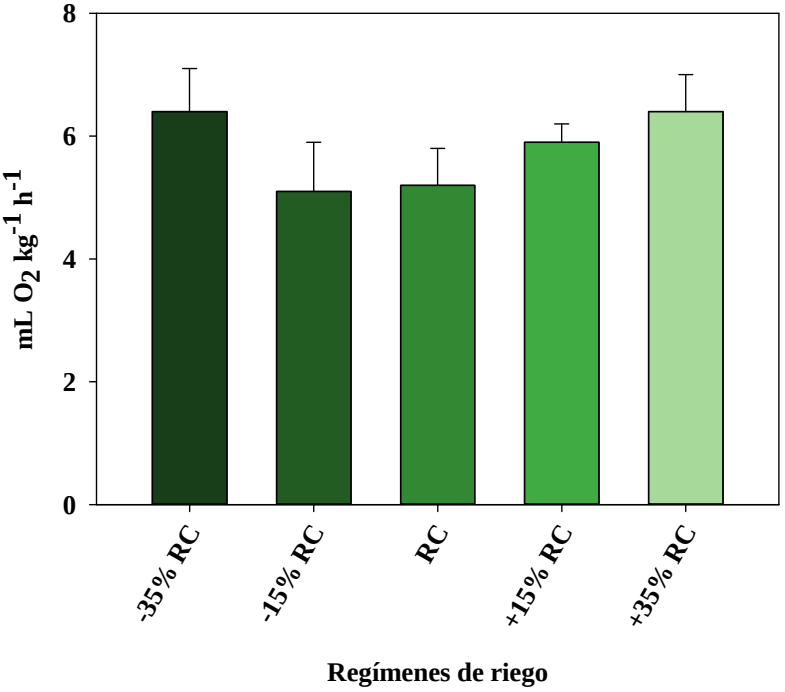


Figura 9.3. Influencia de los regímenes de riego en la tasa respiratoria de la lechuga romana IV Gama conservada a 7 ºC y con un 5 % de O_2.

4.3. Calidad sensorial de la lechuga IV Gama

La concentración gaseosa inicial del espacio de cabeza fue aproximadamente de 1.0 ± 0.4 kPa de O_2 y 0 kPa de CO_2. El O_2 disminuyó durante la conservación alcanzando aproximadamente 0.5 kPa O_2 después de 9 días. La acumulación de CO_2 en los envases aumentó hasta situarse aproximadamente al 11 kPa CO_2 después de 9 días de conservación. No se observaron diferencias en las concentraciones gaseosas del espacio de cabeza (O_2 y CO_2) entre los regímenes de riego (datos no mostrados).

Después del procesado (0 d), la calidad visual de la lechuga romana IV Gama fue excelente sin diferencias entre los regímenes de riego (**Figura 9.4**). Como era de esperar, la calidad visual disminuyó significativamente durante la conservación ($P \leq 0.05$). Después de 13 días, la calidad visual de la lechuga romana IV Gama tratada con RC estuvo por encima del límite comercial sin observarse diferencias significativas entre regímenes. El desarrollo de pardeamiento se controló debido a la baja concentración de O_2 durante la conservación, no observándose diferencias entre los regímenes de riego (datos no mostrados). Por ello, la influencia de los regímenes de

riego en el desarrollo de pardeamiento fue evaluado en el tejido vascular en atmósfera de aire.

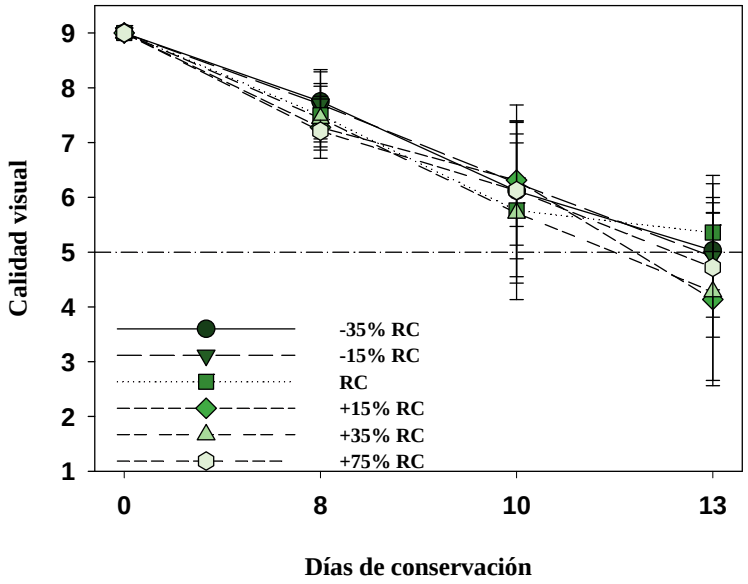


Figura 9.4. Influencia de los regímenes de riego en la calidad de la lechuga romana IV Gama conservada 3 días a 4 ºC y el resto a 7 ºC en atmósfera activa.

4.4. Pardeamiento de la lechuga romana IV Gama

Cuando se conservó el tejido vascular en aire, se observaron diferencias significativas entre los regímenes de riego y la conservación ($P \leq 0.05$) (**Figura 9.5A**). Después de la conservación, el desarrollo de pardeamiento aumentó progresivamente al aumentar el agua aportada. Después de 2 días, el pardeamiento del régimen de riego mayor (+75 % RC) sobrepasó el límite comercial y fue rechazado. Después de 3 días, el tejido vascular procedente de lechugas cultivadas bajo déficit hídrico (≤ -15 % RC) mostró un pardeamiento moderado, y el de mayor régimen presentó un pardeamiento severo. El contenido fenólico del tejido vascular fue afectado significativamente por los regímenes de riego ($P \leq 0.05$) y la conservación ($P \leq 0.001$). Después de 3 días, el contenido de compuestos fenólicos aumentó 2.5 veces en todos los regímenes de riego comparado con el contenido inicial, excepto en el tejido vascular del mayor régimen de riego (+75 % RC) que se mantuvo durante la conservación (**Figura 9.5B**). El contenido fenólico más alto lo presentaron las lechugas cultivadas bajo el RC. Además, la actividad PAL fue influenciada significativamente por los regímenes de riego y tiempo de conservación ($P \leq 0.05$). Como era de esperar, la actividad PAL aumentó durante la

conservación alcanzando su máximo a día 2, en particular, el tejido vascular del RC. Después la actividad PAL disminuyó en todos los regímenes de riego (**Figura 9.5C**). Además, la actividad PPO se influenció significativamente por los regímenes de riego y la conservación ($P \leq 0.001$). Después de 2 días, el tejido vascular de +75 % RC presentó la mayor actividad PPO. Sin embargo, no observamos diferencias en la actividad POD entre los distintos regímenes de riego (datos no mostrados).

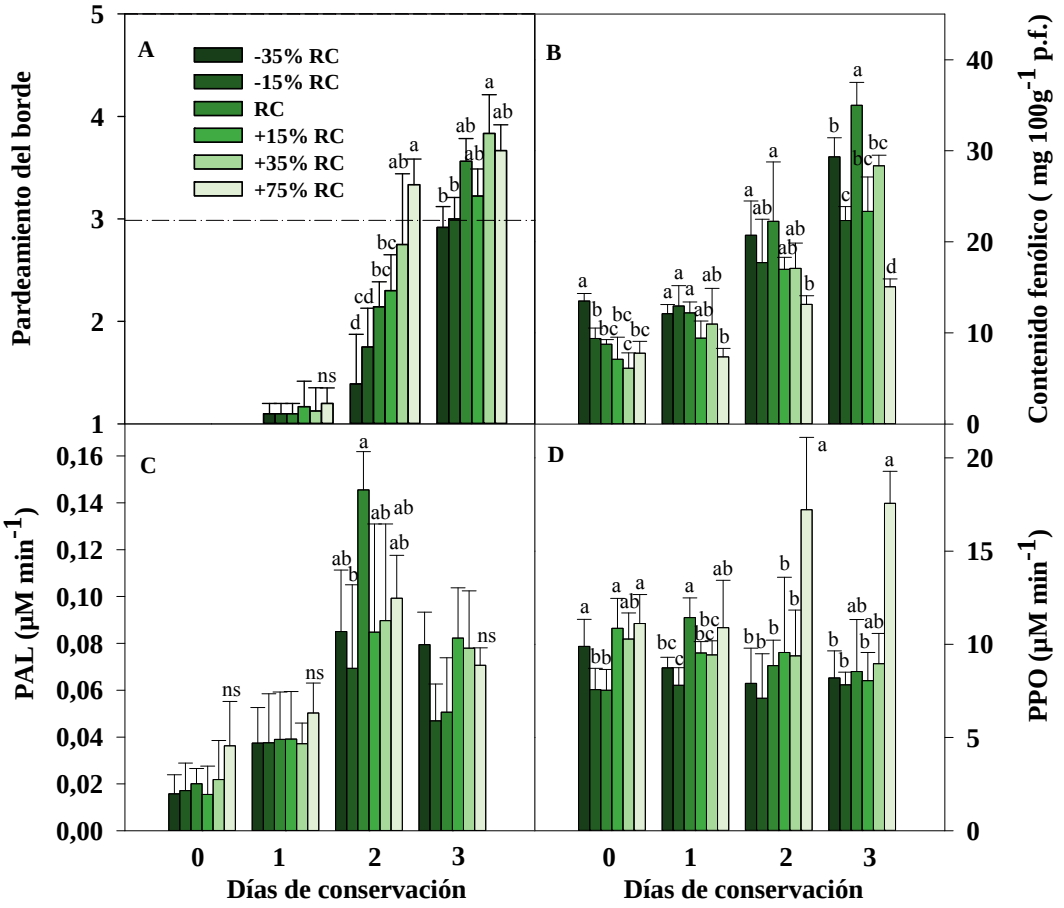


Figura 9.5. Influencia de los regímenes de riego en el pardeamiento del borde (A), contenido fenólico (B), actividad fenilalanina amonio-liasa (PAL) (C) y polifenoloxidasa (POD) (D) del tejido vascular de lechuga romana en IV Gama conservado en aire a 7 ºC.

4.5. Calidad microbiológica de la lechuga romana IV Gama

La influencia de los regímenes de riego y de la conservación en el recuento de bacterias aerobias psicrotrofas en lechuga romana IV Gama se muestra en la **Figura 9.6A**. No se observaron diferencias significativas en el recuento de bacterias

psicrotrofas entre los distintos regímenes de riego durante la conservación. Inmediatamente finalizado el procesado (día 0), el recuento de bacterias psicrotrofas mayor se observó en la lechuga cultivada bajo el régimen de riego más extremo (+75 % RC), mientras que el régimen de déficit más severo (-35 % RC) presentó el menor recuento (**Figura 9.6A**). Durante la conservación, la población de bacterias psicrotrofas aumentó en más de 2 unidades log sin diferencias entre los regímenes de riego. La población microbiana más importante en la lechuga fue *Pseudomonas* spp. A día 0, presentaron el mismo comportamiento que las bacterias psicrotrofas. La población de *Pseudomonas* spp. aumentó con la conservación, particularmente con el mayor exceso de agua (+75 % RC) (**Figura 9.6B**). Por otra parte, los regímenes de riego no afectaron a la población de coliformes totales después del procesado. Durante la conservación, los coliformes totales aumentaron significativamente ($P \leq 0.001$) sin observarse diferencias entre los regímenes de riego (**Figura 9.6C**).

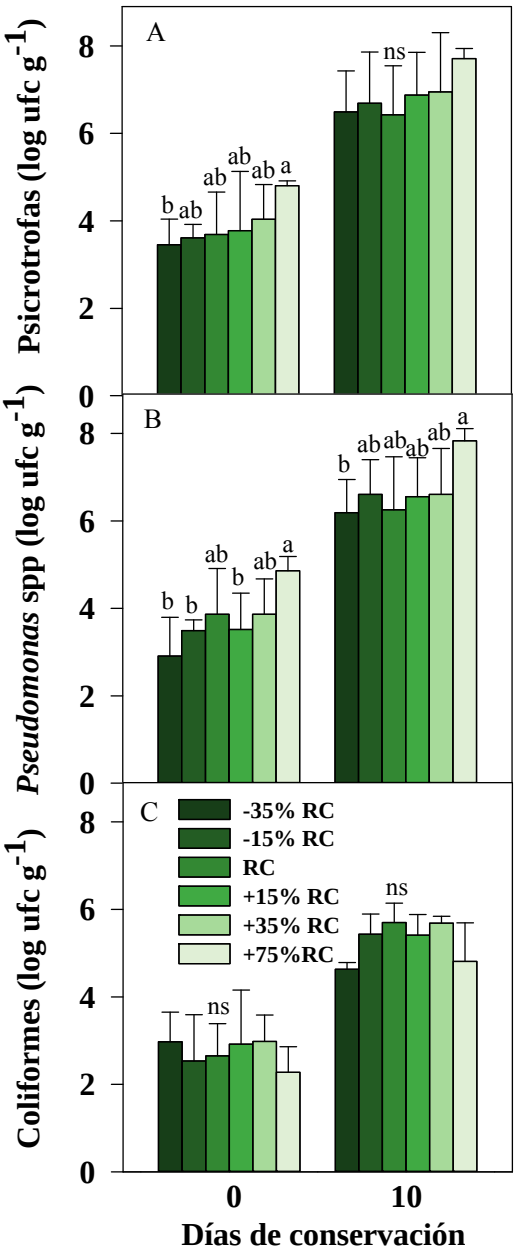


Figura 9.6. Influencia de los regímenes de riego en la población de bacterias psicrotrofas (A), *Pseudomonas* spp. (B) y coliformes (C) de lechuga romana IV Gama después del procesado (día 0) y después de la conservación 3 días a 4 ºC y el resto a 7 ºC.

5. DISCUSIÓN

Hasta ahora son pocas las publicaciones que describen el efecto de los factores precosecha en la tasa respiratoria de los productos vegetales en IV Gama. Este capítulo aporta, por primera vez, la información del efecto de los regímenes de riego sobre la tasa respiratoria de lechuga IV Gama. En este estudio se observó que la tasa respiratoria de la lechuga romana IV Gama fue afectada significativamente por los regímenes de

riego. Las lechugas cultivadas bajo el déficit hídrico más severo (-35 % RC) y de exceso (+35 % RC) presentaron la mayor tasa respiratoria. Sin embargo, a pesar de las diferencias en la tasa respiratoria, la composición gaseosa del espacio de cabeza de los envases no difirió entre los regímenes de riego. Una posible razón es que el bajo nivel de O_2 alcanzado en MAP (0.5 kPa) disminuyó la tasa respiratoria, reduciendo las diferencias entre los regímenes de riego. Watada y Qi (1999) observaron que con el aumento en la tasa respiratoria se acelera el deterioro, originando la reducción en la vida útil del producto IV Gama. La lechuga es una de las especies vegetales más estudiadas en las que el corte desencadena reacciones que originan pardeamiento en la zona del corte (Saltveit, 2000). En el capítulo anterior, observamos que la lechuga iceberg sometidas a un riego ligeramente deficitario la calidad durante la conservación del producto de IV Gama era superior. En el caso de la lechuga romana, la calidad visual disminuyó sin diferencias entre los regímenes de riego. Por lo general, las atmósferas de conservación bajas en O_2 y altas en CO_2 retardan la senescencia y el pardeamiento oxidativo en lechuga IV Gama (Smyth y col., 1998; Kim y col, 2005). Para el control del pardeamiento en lechuga romana IV Gama la concentración de O_2 debería ser inferior a 0.6 kPa a 7 ºC (Martínez-Sánchez y col., 2011). La evidencia de pardeamiento en el corte fue escasa, incluso después de 13 días de conservación. Sin embargo, cuando el tejido vascular se conservó en aire el desarrollo de pardeamiento aumentó con el incremento de los regímenes de riego, en particular después de 2 días de conservación. Se ha asumido que las reacciones de pardeamiento son consecuencia de la acción de la PPO sobre los compuestos fenólicos (Tomás-Barberán y Espín, 2001). Después de 2 días de conservación, los compuestos fenólicos aumentaron, en especial los derivados del ácido cafeico, aunque el aumento fue mayor en las muestras menos regadas debido a la baja actividad PPO y por tanto, al menor consumo de fenoles como sustrato de PPO. Antes de la aparición de pardeamiento se ha descrito el aumento de la actividad PAL en lechuga IV Gama (Couture y col., 1993; López-Gálvez y col., 1996b). En estudios anteriores, en lechuga iceberg, la actividad PAL aumentó al aumentar el régimen de riego (capítulo VIII). Sin embargo, en lechuga romana, la actividad PAL aumentó de forma independiente a los regímenes de riego. Los diferentes resultados en la actividad PAL podrían ser debidos a las características de los distintos tipos de lechuga. La actividad PAL fue menor en la lechuga romana que en iceberg, a pesar de estar expuestas a condiciones similares de riego, prácticas agronómicas y climatológicas. En este sentido, estudios previos describieron que la lechuga iceberg presentó menor

actividad PAL que la romana (López-Gálvez y col., 1996b), en contraposición con nuestros resultados. Se ha descrito que, un aumento de la síntesis de compuestos fenólicos se produce tras la inducción de la actividad PAL (Ke y Saltveit, 1989), confirmándolo con estos resultados. También se ha descrito que la ruta de biosíntesis de flavonoides parece ser estimulada por la escasez de agua en las hojas inmaduras de pak choi (Stefanelli y col., 2010). Sin embargo, un hecho no descrito hasta ahora es que, a pesar de la acumulación de compuestos fenólicos en el tejido vascular menos regado el desarrollo de pardeamiento fue menor. Aunque parece contradictorio, la mayor producción de compuestos fenólicos se observó en las lechugas menos oxidadas, tanto en este estudio como en el descrito en el capítulo anterior, pero la contribución de las actividades enzimáticas de PPO y PAL al pardeamiento enzimático fue trascendental. Por lo tanto, los compuestos fenólicos en lechuga iceberg y romana no son un factor limitante en el desarrollo de pardeamiento. Además, los altos aportes de riego conducen a una mayor actividad enzimática relacionada con el deterioro y la susceptibilidad al pardeamiento y a las reacciones de ablandamiento (Fonseca y col., 2009).

El deterioro de los vegetales de hoja es autocatalítico debido al incremento de la respiración y las actividades enzimáticas después de la postcosecha y el procesado, aunque también es de origen microbiológico, debido a la proliferación de microorganismos de deterioro (Nguyen- the y Carlin, 1994: Jacxsens y col, 2003). El exceso de riego podría estar asociado con una mayor fragilidad de la membrana celular, resultando un escenario ideal para la aceleración del crecimiento de microrganismos y el deterioro general del tejido (Zagory, 1999). En este capítulo, las lechugas cultivadas con el mayor aporte hídrico (+75 % RC) desarrollaron mayores recuentos microbiológicos que las cultivadas con el déficit hídrico más severo (-35 % RC). Como se ha descrito, la microflora predominante de las hortalizas de hoja verde son *Pseudomonas* y *Erwinia* spp (Willocx y col., 1994). El recuento inicial en las muestras menos regadas (-35 % RC) fue de 4.2 log ufc g^{-1} y para las más regadas (+75 % RC) de 6.2 log ufc g^{-1}. La mayor disponibilidad de agua en el suelo podría ser la causante de la mayor población microbiana en las muestras más regadas, ya que aumenta la humedad del suelo, produciendo cambios en las características biológicas, mejora la biomasa microbiana del suelo, el ciclo de nutrientes y proporciona un hábitat más estable para los microorganismos (Li y col., 2004; Ponce y col., 2008). Los resultados descritos por Fonseca (2006) revelan el impacto significativo de la humedad sobre la población

microbiana en la recolección de lechuga. De acuerdo con esto, nuestros resultados mostraron que la población microbiana en la lechuga romana aumentó con el aumento en el agua aportada. El lavado de la lechuga romana IV Gama redujo la población microbiana en 1-2 log ufc g^{-1} debido a la eliminación de los microorganismos de la superficie de la hoja, de acuerdo con estudios anteriores (Allende y col., 2008). Sin embargo, después de 10 días de conservación, la carga microbiana de la lechuga romana IV Gama fue similar a pesar de las diferencias en los regímenes de riego. Como se ha descrito anteriormente, los microorganismos epífitos de lechuga IV Gama durante la conservación crecen rápidamente durante la conservación, alcanzando valores similares o superiores a la lechuga sin lavar antes del procesado (Allende y col., 2008). Estudios previos han descrito que durante la conservación de lechuga IV Gama, las cepas pectinolíticas de *Pseudomonas* spp. son las responsables de la podredumbre bacteriana blanda (Willocx y col., 1994). Al final de la conservación, la lechuga romana IV Gama sometida al mayor exceso de agua (+75 % RC) mostró mayor recuento de *Pseudomonas* spp. que las de déficit de riego más extremo (-35 % RC). Estos resultados están de acuerdo con lo publicado en espinaca "baby" conservada a alta HR donde las bacterias psicrófilas y los recuentos *de Pseudomonas* spp. fueron 1 unidad log mayor que las expuestas a HR baja o media (Medina y col., 2012). Este estudio pone de manifiesto la importancia del contenido de agua en el crecimiento bacteriano del tejido vegetal. Además, se ha demostrado que ni el recuento total ni el nivel de microrganismos responsables del deterioro influyen directamente en la calidad sensorial del producto (Jacxsens y col., 2002). De acuerdo con esto, a pesar de la alta carga de bacterias psicrotrofas en lechuga romana IV Gama (6-8 log ufc g^{-1}), no observamos ninguna relación con la pérdida de calidad durante la conservación.

Las cabezas de lechuga romana cultivadas con el déficit más severo (-35 % RC) y con el mayor exceso (+75 % RC) presentaron sorprendentemente el menor peso. Fonseca (2006) observó que el exceso de riego cercano a la recolección no está relacionado con un mayor rendimiento, en consonancia con nuestros resultados. La madurez en la recolección es uno de los principales factores que determinan la calidad y la velocidad de deterioro durante la postcosecha (Kader, 2002). El exceso de riego produjo una reducción en la longitud del tallo mientras que el déficit provocó un aumento. A pesar de la influencia de los regímenes de riego en la madurez de la lechuga romana, todas las cabezas de lechuga se encontraron dentro del rango de madurez

comercial (capítulo IV). Hilton y col. (2009) observaron que el aumento en la madurez de las cabezas incrementa el pardeamiento de la lechuga cortada. En nuestro caso observamos que la madurez afecta al procesado y a la vida útil de la lechuga IV Gama.

6. CONCLUSIONES

Los factores precosecha como el riego tienen gran influencia en la calidad y vida útil de la lechuga IV Gama. El exceso de agua aceleró el pardeamiento y el crecimiento microbiológico, mientras que el déficit redujo el rendimiento. Basándonos en estos resultados, se pone de manifiesto la importancia de la optimización de las prácticas de riego para mejorar la calidad de las materias primas y extender la vida útil del producto procesado en IV Gama. La gestión del agua se puede mejorar mediante el uso de sondas que midan la humedad del suelo para ajustar las dosis de riego, ya que es necesario adoptar prácticas agrícolas que reduzcan el riego pero que mantengan la calidad y el rendimiento. Además, con el empleando de la cantidad óptima de agua para cada tipo de lechuga, mejoraremos la sostenibilidad del medio ambiente sin comprometer la calidad del producto.

CAPÍTULO X

INFLUENCIA DE LA EXPOSICIÓN A LA LUZ DURANTE LA CONSERVACIÓN EN LA CALIDAD DE LA LECHUGA ROMANA EN IV GAMA

Martínez-Sánchez, A., Tudela, J.A., **Luna, M.C.**, Allende, A., Gil, M.I., 2011. Low oxygen levels and light exposure affect quality of fresh-cut Romaine lettuce. *Postharvest Biol. Technol.,* 59, 34-42**.**

1. RESUMEN

La atmósfera modificada (MAP) permite extender la vida útil de la lechuga IV Gama, principalmente porque limita los procesos de oxidación. Sin embargo, la exposición a la luz puede causar desarrollo de pardeamiento y pérdida de calidad. En este capítulo, estudiamos la influencia de la exposición a la luz durante la conservación de lechuga romana IV Gama. El producto se expuso a diferentes condiciones lumínicas durante su conservación: luz (24 h), fotoperiodo (12 h luz + 12 h de oscuridad) y oscuridad (24 h). Se evaluaron los cambios en la tasa respiratoria, la composición gaseosa, la calidad sensorial, el color, la pérdida de electrolitos de los tejidos, la apertura de estomas, la materia seca, la textura y el contenido en constituyentes relacionados con el pardeamiento como son el contenido en vitamina C y en compuestos fenólicos individuales y totales. Se envasaron diferentes masas de producto (75-275 g) en bolsas con una atmósfera inicial de O_2 del 0.5-2.0 kPa mediante la inyección de N_2, alcanzándose en el equilibrio concentraciones de O_2 del 0.1 a 1.5 kPa. Las atmósferas con bajo O_2 (0.2-0.5) preservaron la calidad debido al control del pardeamiento y la prevención de malos olores y sabores. La exposición lumínica influyó positivamente en la apertura de estomas (74 % en luz frente a 24 % en oscuridad) contribuyendo a una pérdida ligera de peso. La concentración de O_2 fueron diferentes significativamente dependiendo de las condiciones de luz (10.6 ± 7.0, 18.3 ± 3.5 y 25.8 ± 8.6 nmol O_2 kg s^{-1}, con luz frente a fotoperiodo y oscuridad, respectivamente). Los envases expuestos a luz mostraron mayores niveles de O_2 que los conservados en oscuridad, mientras que los de fotoperiodo obtuvieron valores intermedios. Además, la localización del envase en la estantería influyó en la composición gaseosa del espacio de cabeza, aumentando más la concentración de O_2 en las bolsas delanteras que en las traseras. Sin embargo, las condiciones lumínicas no afectaron al contenido en vitamina C y en compuestos fenólicos. El presente estudio demuestra que bajo condiciones lumínicas la actividad respiratoria se compensa con la fotosíntesis, aumentando la concentración de O_2, comparado con las condiciones de fotoperiodo y oscuridad. Por tanto, el pardeamiento de lechuga romana IV Gama es promovido por la exposición a la luz al aumentar la concentración de O_2 en el envase.

2. INTRODUCCIÓN

La lechuga romana es uno de los tipos más demandados por los consumidores debido a su textura, apariencia, aroma y sabor característico de frescura. Además, es una de las lechugas más ricas en compuestos fitoquímicos, en concreto en compuestos fenólicos

(Llorach y col., 2008). Por otra parte, las operaciones de cortado, lavado y envasado producen daño en los tejidos, aumentando la respiración, favoreciendo el deterioro y acortando la vida útil (Varoquaux yWiley, 1994). Una de las mayores causas de la pérdida de calidad en lechuga IV Gama es el pardeamiento, principal problema en lechuga romana tras el corte de los tejidos, principalmente en el tejido vascular o midrib (López-Gálvez y col., 1996). El pardeamiento ocurre más rápidamente y con menos posibilidad de control que en otros tipos de lechuga como iceberg. Son muchos los estudios de pardeamiento en lechuga IV Gama que tienen como finalidad controlar el metabolismo fenólico y retrasar la aparición de pardeamiento. La mayoría aplica tratamientos químicos como son los agentes reductores, los inhibidores enzimáticos, los acidulantes y los agentes complejantes. Sin embargo, la toxicidad de algunos de ellos hace que estén excluidos en lechuga IV Gama (Tomás-Barberán y col., 1997a; Peiser y col., 1998; Altunkaya y Gökmen, 2008). Por ello, la industria de la IV Gama necesita estrategias que eviten el pardeamiento y mantengan la calidad y aceptabilidad por parte del consumidor sin el uso de productos químicos.

Las atmósferas modificadas (MAP) alargan la vida útil de la lechuga IV Gama, proporcionando bajas concentraciones de O_2 que retrasen el pardeamiento (Smyth y col., 1998). Krahn (1977) señaló que el pardeamiento podía ser prevenido durante la conservación con MAP con niveles de O_2 < 2 kPa. A su vez Ballantyne y col. (1988) indicaron que los niveles de O_2 debían estar entre 1-3 kPa. Sin embargo, McDonald y col. (1990) observaron la aparición de pardeamiento, particularmente en los bordes de los cortes, con niveles superiores a 3 kPa. En particular, en lechuga romana para la prevenir el pardeamiento en los tejidos se ha sido recomendado una concentración de O_2 inicial de 0.2-3.0 kPa (Gorny, 2001). Sin embargo, este rango es muy amplio ya que cuando el nivel de O_2 es < 0.5 kPa se pueden desarrollar malos olores y sabores (McDonald y col., 1990), o la aparición de pardeamiento cuando es > 3 kPa (Ballantyne y col., 1988; Heimdal y col., 1995; Smyth y col., 1998). La atmósfera modificada depende de la interacción entre la tasa respiratoria del producto y la permeabilidad del plástico para una determinada masa y área del envase (Kader y col., 1989; Maján y col., 2006). En diferentes estudios se ha demostrado la influencia del envasado en MAP y el contenido en constituyentes relacionados con el pardeamiento de lechuga IV Gama (Gil y col., 1998; Smyth y col., 1998; Beltrán y col., 2005) a distintas temperaturas (Cantwell, 1996). Sin embargo, son pocos los estudios que relacionan la concentración de O_2 con el pardeamiento y los malos olores en lechuga romana IV Gama.

Entre los factores medioambientales que más afectan al contenido fitoquímico se encuentra la luz (Li y Kubota, 2009; Zhou y col., 2009). En estudios actuales se describe la influencia de la luz y su relación con la calidad de diferentes vegetales. Lester y Markus (2010) observaron que hojas de espinaca expuestas a la luz durante la conservación presentaron mejor calidad nutricional que las expuestas a oscuridad permanente. Se ha señalado que la luz fluorescente favorece la pérdida de peso y mantiene el contenido en vitamina C en acelgas chinas durante la conservación (Noichinda y col., 2007). Sin embargo, también se han observado efectos negativos por ejemplo en espárragos expuestos a la luz al aumentar su actividad fisiológica (Sanz y col., 2009). Algunos estudios han sugerido que la exposición a la luz desencadena respuestas fisiológicas diferentes dependiendo de la pigmentación del vegetal, afectando por lo tanto, a la composición gaseosa dentro del envase (Sanz y col., 2007; Olarte y col., 2009). Otros autores señalaron que la iluminación causa un aumento en la tasa respiratoria debido a la actividad fotosintética de vegetales verdes en IV Gama, la cual acelera el pardeamiento de la zona del corte como es el caso del puerro (Ayala y col., 2009), o la pérdida de clorofila en brócoli, o la alta transpiración y fermentación en coliflor (Olarte y col., 2009). De acuerdo con la información descrita anteriormente, la exposición de los envases a condiciones lumínicas incontroladas, durante la distribución en la venta al por menor, puede afectar a la concentración de O_2 del espacio de cabeza del envase y originar una alta variabilidad en las características de calidad de la lechuga IV Gama, desencadenando principalmente pardeamiento y reducción de la vida útil. Por esta razón, los objetivos de este estudio fueron la evaluación (1) del efecto del bajo O_2 y (2) el impacto de la exposición a distintas condiciones lumínicas en la vida útil de la lechuga romana IV Gama. Para ello, se han evaluado la tasa respiratoria, la composición del espacio de cabeza del envase, la calidad sensorial, el color, la pérdida de electrolitos a través de la membrana, la apertura estomática, la pérdida de agua, la textura y el contenido de vitamina C y de compuestos fenólicos.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Material vegetal

Las lechugas cultivadas en Torre Pacheco (Murcia) por la empresa Syngenta Seeds S.A. siguiendo condiciones comerciales, se recolectaron de diciembre a mayo. El material se transportó al laboratorio CEBAS-CSIC en condiciones refrigeradas y se conservó a 4ºC en oscuridad durante 24 h.

3.2. Condiciones de procesado, envasado y conservación

Las condiciones de procesado fueron las estudiadas en el capítulo III. Para el estudio de la influencia de las diferentes concentraciones de O_2 sobre la calidad del producto envasado, se empleó un plástico (Amcor Flexibles, Bristol, GB) con una permeabilidad al O_2 de 9.365 E^{-17}mol m m^{-2} s^{-1} Pa^{-1} (504 mL O_2 25 μm/m^2 d atm) y de 3,166 E^{-16}mol m m^{-2} s^{-1} Pa^{-1} para el CO_2 (2507 mL O_2 25μm/m^2 d atm) a 7 ºC y 95 % HR. Distintos pesos de lechuga romana IV Gama (de 75 a 275 g) se envasaron en envases de 230 mm x 280 mm en una envasadora vertical (modelo Etna 280-X, Ulma, Oñati). La atmósfera MAP fue creada por inyección de N_2 para reducir la concentración de O_2 del 21 al 0.5-5.0 kPa, aproximadamente. Las muestras se conservaron diariamente en condiciones de fotoperiodo, ciclos de 12 h de luz y 12 h de oscuridad durante tres días a 4 ºC y el resto a 7 ºC, simulando condiciones similares a las comerciales durante la distribución. Las concentraciones deseadas de O_2 y CO_2 dentro del envase se establecieron en el equilibrio.

Para el estudiar el efecto de la exposición de la luz, se envasaron 175 g de lechuga IV Gama, en las condiciones descritas anteriormente. Los envases se distribuyeron aleatoriamente en tres bloques en función de las condiciones lumínicas: (1) oscuridad 24 h al día, (2) fotoperiodo (12 h luz y 12 h oscuridad) y (3) luz 24 h al día. La radiación fotosintética activa en las estanterías fue de 6 ± 1 μmol m^{-2} s^{-1} obtenido por luz fluorescente (Philips Ibérica S.A., Madrid) de 58 W, en condiciones similares a la venta al por menor. La conservación se llevó a cabo 3 d a 4 ºC y el resto a 7 ºC. Las evaluaciones se llevaron a cabo los días 0, 8 y 10.

La caracterización de las muestras se realizó el día del procesado. Para ello, se midió el peso fresco de cabeza, la longitud de la cabeza y la longitud del espigón. Para determinar el contenido en materia seca, se empleó tejido comercial sin lavar, secándose en una estufa de aire forzado a 65 ºC hasta peso constante. Las muestras se pesaron antes y después del secado, calculando la relación del peso seco con el peso fresco. Se emplearon 4 réplicas de 15 g de tejido comercial por condición lumínica.

La textura se midió empleando una célula Kramer con cinco cuchillas (HDP/KS5) conectada a un analizador de textura (TA.TX.plus, Stable Micro Systems, GB) como se describe en el capítulo III. Los resultados corresponden a 20 réplicas por tratamiento.

3.3. Análisis del espacio de cabeza

La tasa respiratoría se midió siguiendo el método de Jacxsens y col. (1999) del sistema cerrado. Para medir la tasa respiratoría, las cabezas de lechuga romana se conservaron a 4 ºC en oscuridad antes del procesado. Después del procesado, 150 g de lechuga IV Gama se envasaron en tarros de cristal (1484 mL). La concentración de O_2 inicial varió entre 1 y 3 kPa alcanzándose tras la inyección de un flujo de N_2 de un generador (Witt-Gasetechnik, modelo KM100-3M, Carburos Metálicos, S.A., Barcelona). La tasa respiratoria se expresó en nmol CO_2 kg^{-1} s^{-1} a 7ºC. Se emplearon 4 réplicas por tratamiento y las medidas se realizaron diariamente durante 5 días.

La tasa respiratoria y los niveles de O_2 y CO_2 del espacio de cabeza fueron analizados tras la inyección de 0.25 mL en un analizador de O_2 con una célula cerámica de detección electroquímica de óxido de circonio (CG-1000, Ametek, Thermox Instruments Co., Pittsburgh, PA, EE.UU) y un detector infrarrojo de CO_2 (Via 510, Horiba Instruments Co., Irvine, CA, EE.UU). Los resultados corresponden a 3 bolsas por condición lumínica y las medidas se realizaron por duplicado en cada bolsa.

3.4. Medida de color

La medida del color se realizó en el tejido fotosintético (120 muestras) para cada condición lumínica el día de procesado (L_0^*, a_0^*, b_0^*) y durante los días de conservación 8 y 10 días (L^*, a^*, b^*). Las diferencias de color se expresaron como:

$$\Delta\epsilon^* = \left[\left(L_0^* - L^*\right)^2 + \left(a_0^* - a^*\right)^2 + \left(b_0^* - b^*\right)^2\right]^{1/2}$$

Este índice fue descrito en lechuga romana baby para detectar los cambios de color de forma semejante a los que percibe el ojo humano (Chisari y col., 2010). Estas medidas se llevaron a cabo con un colorímetro (Minolta CR-300, Ramsey, NJ, EE.UU) con una apertura de 8 mm de campo de visualización.

3.5. Pérdida de electrolitos

La medida de la integridad de la membrana se determinó siguiendo la metodología de Kim y col. (2005) con ligeras modificaciones. Se emplearon 5 discos de 5 mm de tejido fotosintético tomados de una muestra de 150 g de lechuga por réplica. Estos discos se

introdujeron en 10 ml de manitol 0.4 M. La conductividad eléctrica se midió a las 3 h con un conductímetro (Modelo CM35, Crison, Barcelona). La conductividad total se midió después de la congelación a -20 ºC durante 24 h y posterior descongelación. La pérdida de electrolitos se expresó como % de los electrolitos totales.

3.6. Microscopía electrónico de barrido

Después de 10 días de conservación, se tomaron muestras de 3 cm del tejido fotosintético conservados en distintas condiciones lumínicas. Las muestras se fijaron en formaldehído (10%) para su observación en el microscopio electrónico de barrido (SEM). Posteriormente, las muestras se lavaron 3 veces en tampón cacodilato (0.1M) (cacodilato de sodio trihidratado, EMS, Hatfield, PA, EE.UU), seguido por la fijación con tetraóxido de osmio (EMS) al 1% en tampón fosfato 0.1M durante 1h. Después, las muestras se lavaron con tampón fosfato salino (PBS) durante 24 h, seguido de la deshidrataron por inmersión en etanol (30, 50, 70, 90 y 100 %). A continuación, las preparaciones se llevaron al punto crítico de CO_2 (Balzers CPD 020, Balzers, Wiesbaden, Alemania). Las muestras desecadas se colocaron en soportes de aluminio especialmente diseñados para el SEM y se montaron en placas de carbono con cintas adhesivas etiquetadas (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, EE.UU.). Finalmente, las muestras se recubrieron con un metal conductor, en este caso el oro (Target Old, Quorum Emitech, Kent, EE.UU). Las muestras se observaron en un SEM (JEOL-JSM 6100, SEM JEOL, Inc., GB), con un voltaje de aceleración de 20 kV en el modo de detección de electrones secundarios. El número de estomas abiertos y cerrados se determinó en un área de 0.42 mm x 0.57 mm de la superficie axial de la hoja. Se analizaron un total de 10 muestras por condición lumínica.

3.7. Extracción y cuantificación de vitamina C

El contenido en vitamina C se determinó como suma del ácido ascórbico (AA) y del ácido dehidroascórbico (ADHA) según describió Gil y col., 1998b, 1999) con algunas modificaciones (Llorach y col., 2008). Muestras de 20 µL fueron analizadas por HPLC (Merck-Hitachi, Tokio, Japón). La separación del DFQ y AA se llevó a cabo empleando una columna C-18 (250 mm x 4 mm x 5 µm de tamaño de partícula, Barcelona). Las soluciones patrones, fase móvil, velocidad de flujo y longitudes de onda empleadas se describen en el capítulo III. Los resultados fueron expresados en mg por 100 g de peso fresco.

3.8. Extracción y cuantificación de compuestos fenólicos

El material congelado y posteriormente liofilizado (0.5 g) se homogeneizó con una mezcla de MeOH/agua/ácido fórmico (25:24:3, v:v:v) conteniendo NaF. El análisis por HPLC se realizó siguiendo la metodología de Llorach y col. (2008). Las muestras de 20 µL se analizaron en un HPLC (bomba L-2130, Merck-Hitachi, Tokio, Japón), acoplado a un detector ultravioleta-visible (UV-Vis, L-2455, Merk-Hitachi) de longitud de onda variable y un inyector (L-2200, Merk-Hitachi). La columna empleada fue una C-18 de fase reversa LiChropher 100 (250 mm x 4 mm; 5 µm de tamaño de partícula; LiChroCART 250-4, Damstadt, Alemania), usando como fase móvil agua/ácido fórmico (95:5, v/v) (A) y metanol (B). El rango de elución se describe en el capítulo III, además de los patrones empleados para la detección de los compuestos fenólicos individuales. Los resultados fueron expresados en mg por 100 g de peso fresco.

3.9. Análisis estadístico

El análisis de la varianza se realizó con un nivel de significancia de $P < 0.05$ y cuando se observaron diferencias significativas, se realizó el test de Tukey´s usando el programa estadístico PASW Statistics 18 de Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)

4. RESULTADOS

4.1. Efecto de la baja concentración de O_2 en la calidad sensorial

El consumo de O_2 y la producción de CO_2 fueron mayores en las bolsas de mayor masa (275 g), alcanzando el nivel mínimo de O_2 (0.1 kPa) y el máximo de CO_2 (14.7 kPa). El aumento en la concentración de CO_2 en el espacio de cabeza ocurrió cuando la concentración de O_2 disminuyó por debajo del 0.2 kPa (**Figura 10.1**). La lechuga IV Gama perdió su sabor característico cuando la O_2 fue inferior al 0.2 kPa, dando lugar a anaerobiosis, la cual fue detectada por la presencia de malos olores y sabores (**Figura 10.2A y B**). Los malos olores fueron máximos cuando la concentración de O_2 fue del 0.1 kPa, sin embargo, el sabor anómalo ya alcanzó su máximo al 0.5 kPa. Además, observamos un incremento del pardeamiento cuando la concentración de O_2 aumentó de 0.5 kPa (**Figura 10.2C**). La reducción del nivel de O_2 de 0.6 a 0.4 kPa disminuyó el pardeamiento, haciéndolo inexistente en valores inferiores a 0.4 kPa.

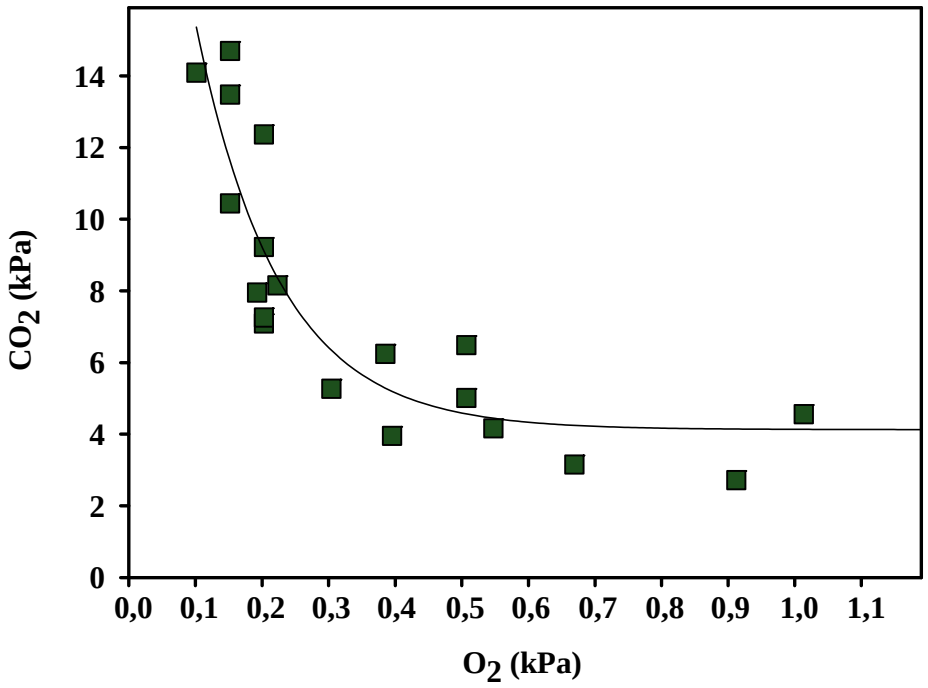


Figura 10.1. Concentración de O_2 y CO_2 en el espacio de cabeza de lechuga romana IV Gama.

Ç

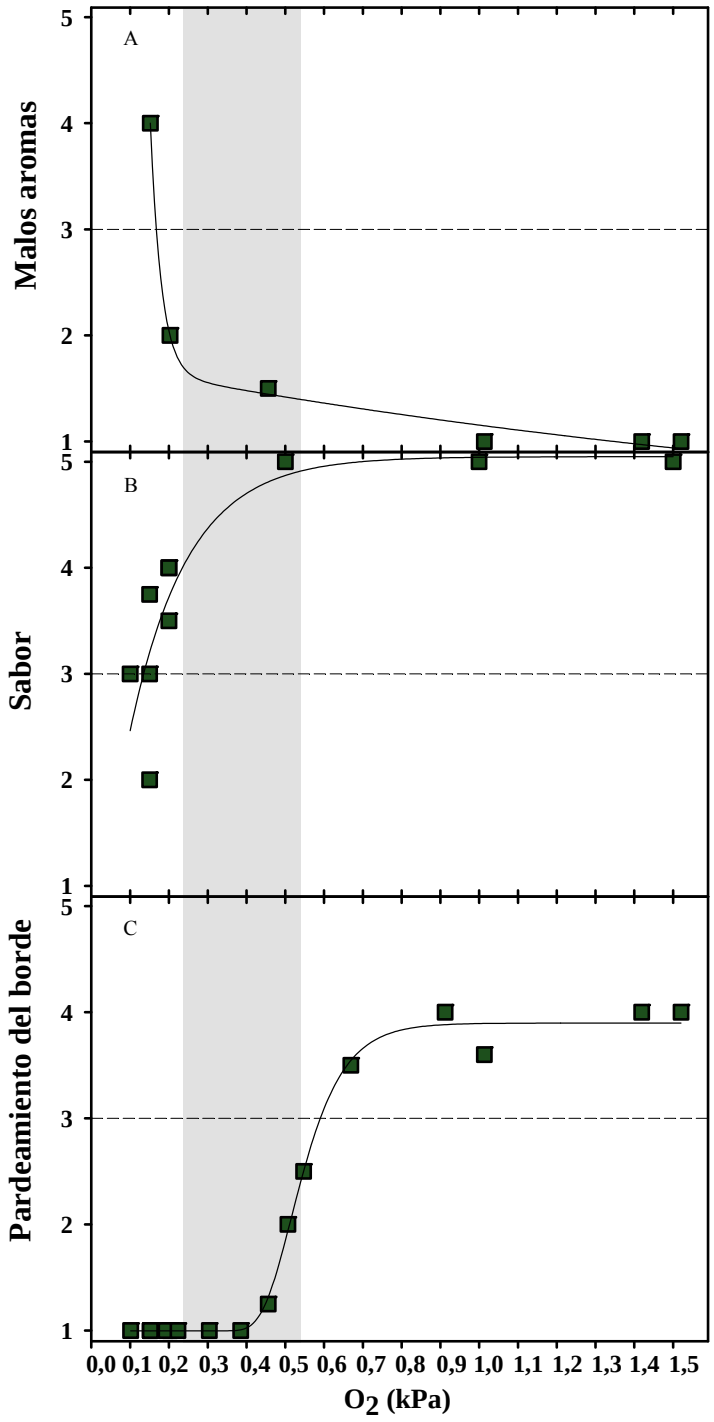


Figura 10.2. Influencia de la concentración de O_2 en los malos olores, sabor y pardeamiento de lechuga romana IV Gama conservada a 7 ºC durante 10 d.

4.2. Efecto de las condiciones de luz en la tasa de respiración y en la composición gaseosa del espacio de cabeza

Basándose en los cambios de consumo de O_2 y producción de CO_2 en los tarros herméticos de lechuga romana IV Gama, la tasa respiratoria se calculó a una concentración

de O_2 del 0.3 kPa como nivel habitual alcanzado en los envases comerciales. Se observaron diferencias significativas en la concentración de O_2 de las muestras expuestas a luz, fotoperiodo y oscuridad (10.6 ± 7.0, 18.3 ± 3.5 y 25.8 ± 8.6 nmol O_2 kg^{-1} s^{-1}, respectivamente).

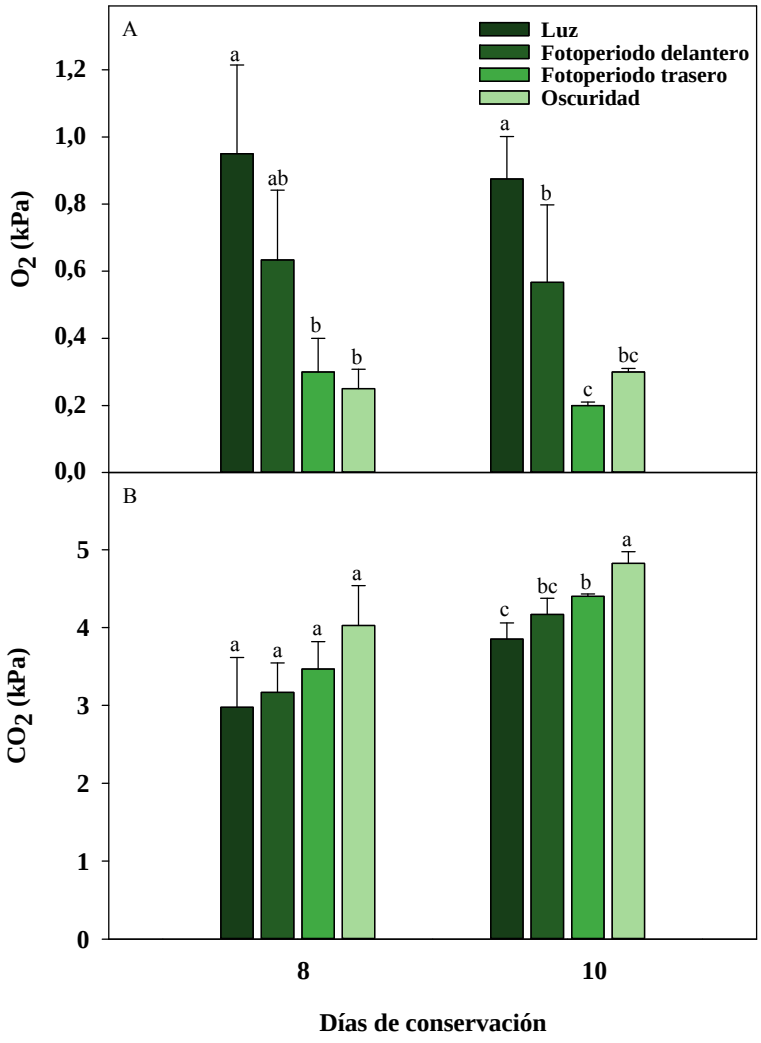


Figura 10.3. Cambios de las concentraciones de O_2 y CO_2 en el espacio de cabeza de los envases de lechuga romana IV Gama conservados en luz (24 h), oscuridad (24 h) y fotoperiodo (12 h de luz + 12 h de oscuridad) en la zona frontal de la estantería (fotoperiodo frontal) y en la zona trasera de la estantería (fotoperiodo trasero) durante 3 d a 4 ºC y el resto a 7 ºC.

A día 0, la composición gaseosa dentro del envase fue la misma en todas las muestras (0.5-2.0 kPa de O_2 y 0.0 kPa de CO_2). Las concentraciones de O_2 y CO_2 en el espacio de cabeza fueron diferentes en cada momento dependiendo de las condiciones

lumínicas (**Figura 10.3**). A los 8 días, las muestras conservadas en oscuridad mostraron una concentración de O_2 de 0.2 kPa, mientras que las expuestas a luz mantuvieron valores similares a los iniciales (0.9 kPa). A los 10 días, las diferencias en la concentración de O_2 entre los tratamientos se mantuvieron, pero el CO_2 aumentó siendo los envases en oscuridad los que alcanzaron niveles máximos (**Figura 10.3B**). Por otra parte, los envases localizados delante en la estantería mostraron mayor nivel de O_2 (0.6 kPa) que los localizados detrás (0.3 kPa) (**Figura 10.3A**).

4.3. Efecto de las condiciones lumínicas en la calidad sensorial

Las muestras conservadas en oscuridad mostraron mejor calidad visual que las conservadas debajo condiciones lumínicas. Después de 8 días de conservación, la calidad visual de la lechuga romana IV Gama conservada en luz así como la de los envases situados en la parte delantera de la estantería en condiciones de fotoperiodo fue peor que la calidad del producto conservado en oscuridad o la de los situados en la parte de detrás de la estantería bajo condiciones de fotoperiodo (**Figura 10.4A**). A los 10 días de conservación, la calidad visual de las muestras expuesta a luz mostraron valores por debajo del límite de aceptabilidad, mientras que las conservadas en oscuridad mantuvieron buena calidad visual (**Figura 10.4A**). La alta concentración de O_2 alcanzada durante la conservación cuando los envases fueron expuestos a la luz no previno el pardeamiento en lechuga romana IV Gama, como se observa en la **Figura 10.4B**. Cuando se evaluó el pardeamiento tras 8 días de conservación, las muestras expuestas a luz y las localizadas en la parte de delante de la estantería con fotoperiodo, mostraron significativamente mayor pardeamiento que las expuestas a oscuridad y las de la parte trasera del estante (**Figura 10.4B**). A los 10 días de conservación, la lechuga romana IV Gama conservada en luz mostró un pardeamiento severo, mientras que las conservadas en oscuridad controlaron mejor el pardeamiento. Además, el pardeamiento superficial fue mayor en las lechugas conservadas en luz (datos no mostrados).

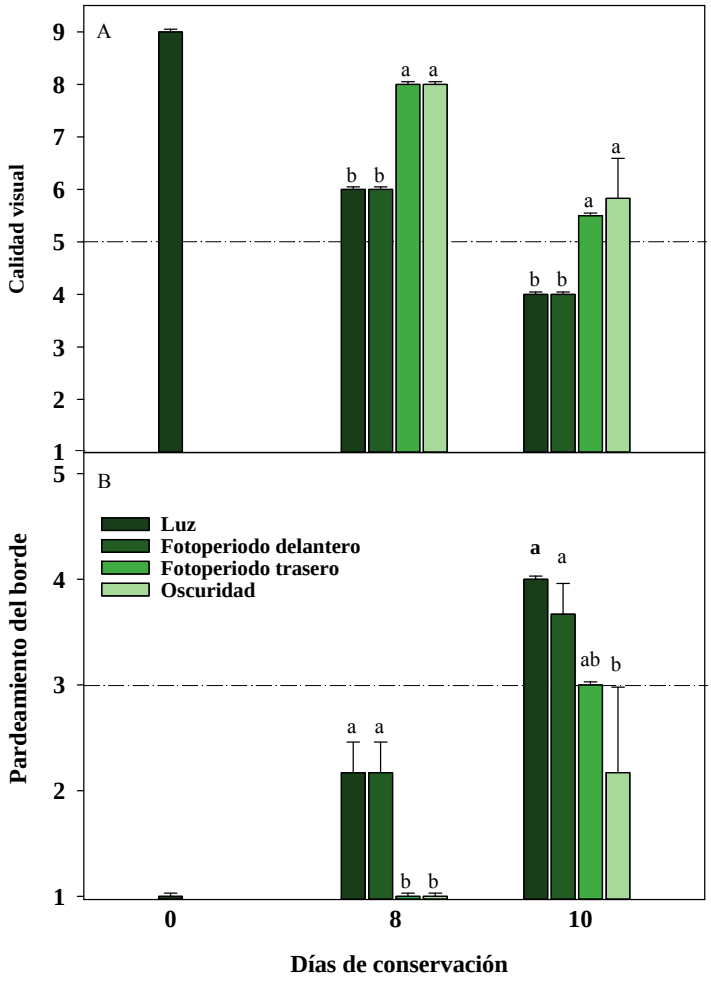


Figura 10.4. Efecto de las condiciones lumínicas en la calidad visual (A) y pardeamiento del borde (B) en lechuga romana IV Gama conservada a 3d a 4 ºC y el resto a 7 ºC bajo las condiciones lumínicas descritas anteriormente.

4.4. Efecto de las condiciones lumínicas en el color, la pérdida de electrolitos a través de la membrana y en la textura

El color de la lechuga romana IV Gama fue afectado por la exposición a la luz (**Figura 10.5**). Después de la conservación, se observó un cambio importante en el color de la lechuga romana expuesta a luz y fotoperiodo con una variación evidente de ΔE^* (80) comparado con las muestras conservadas en oscuridad (ΔE^*=18). Esta variación en el color fue debida principalmente a los cambios en los valores verde-rojo (a^*) y amarillo-azul (b^*).

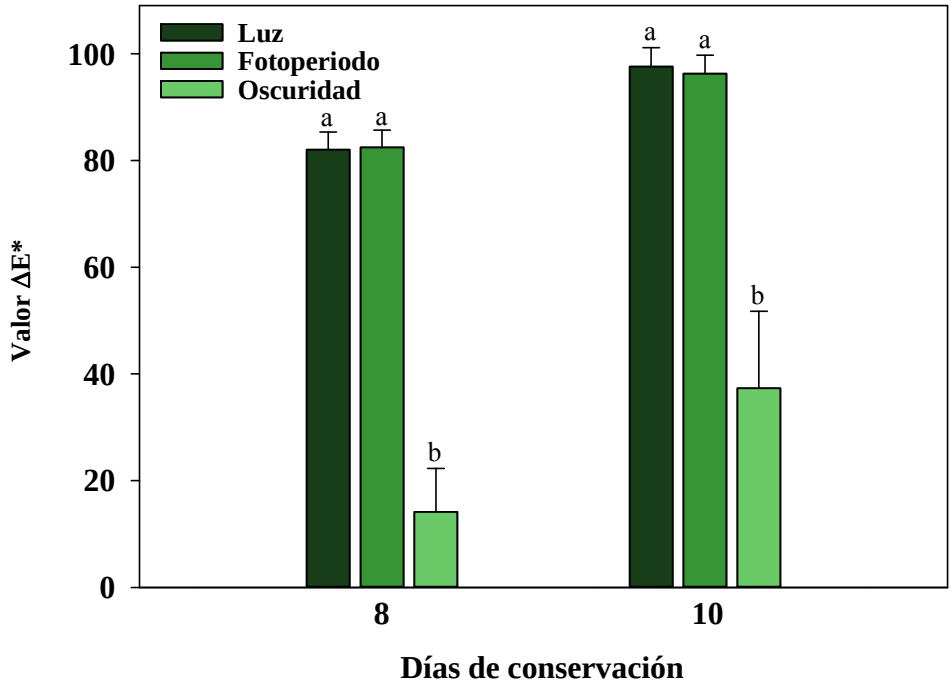


Figura 10.5. Efecto de las condiciones lumínicas en el color (ΔE^*) de lechuga romana IV Gama conservada 3d a 4 ºC y el resto a 7 ºC bajo las condiciones lumínicas descritas anterior

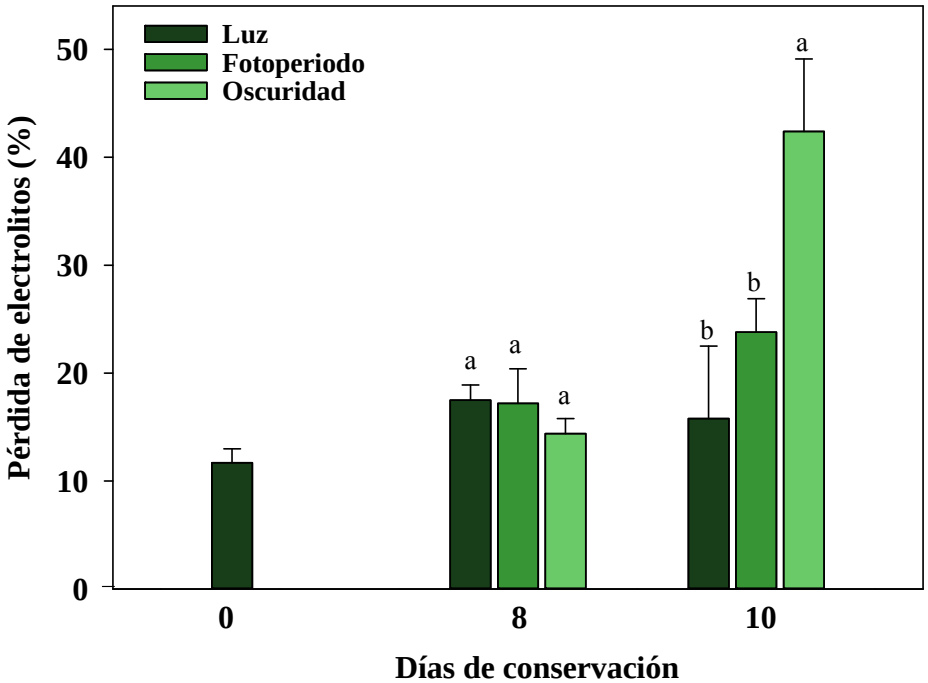


Figura 10.6. Efecto de las condiciones lumínicas sobre la pérdida de electrolitos de lechuga romana IV Gama conservada 3 d a 4 ºC y el resto a 7 ºC bajo las condiciones lumínicas descritas anteriormente.

Por otra parte, la pérdida de electrolitos a través de la membrana aumentó levemente durante los primeros 8 días de conservación sin embargo, no se observaron diferencias entre las distintas condiciones lumínicas (**Figura 10.6**). Después de 10 días, las muestras conservadas en oscuridad mostraron mayor pérdida de electrolitos que las expuestas a la luz permanente y al fotoperiodo.

El coeficiente de "crispiness" inicial en lechuga romana IV Gama fue de 0.89 ± 0.07. Después de 10 días de conservación, las muestras conservadas en oscuridad presentaron igual textura que las expuestas en luz (0.83 ± 0.11 y 0.89 ± 0.06). El panel sensorial observó menor textura en las muestras conservadas 10 días respecto a los 8 días de conservación.

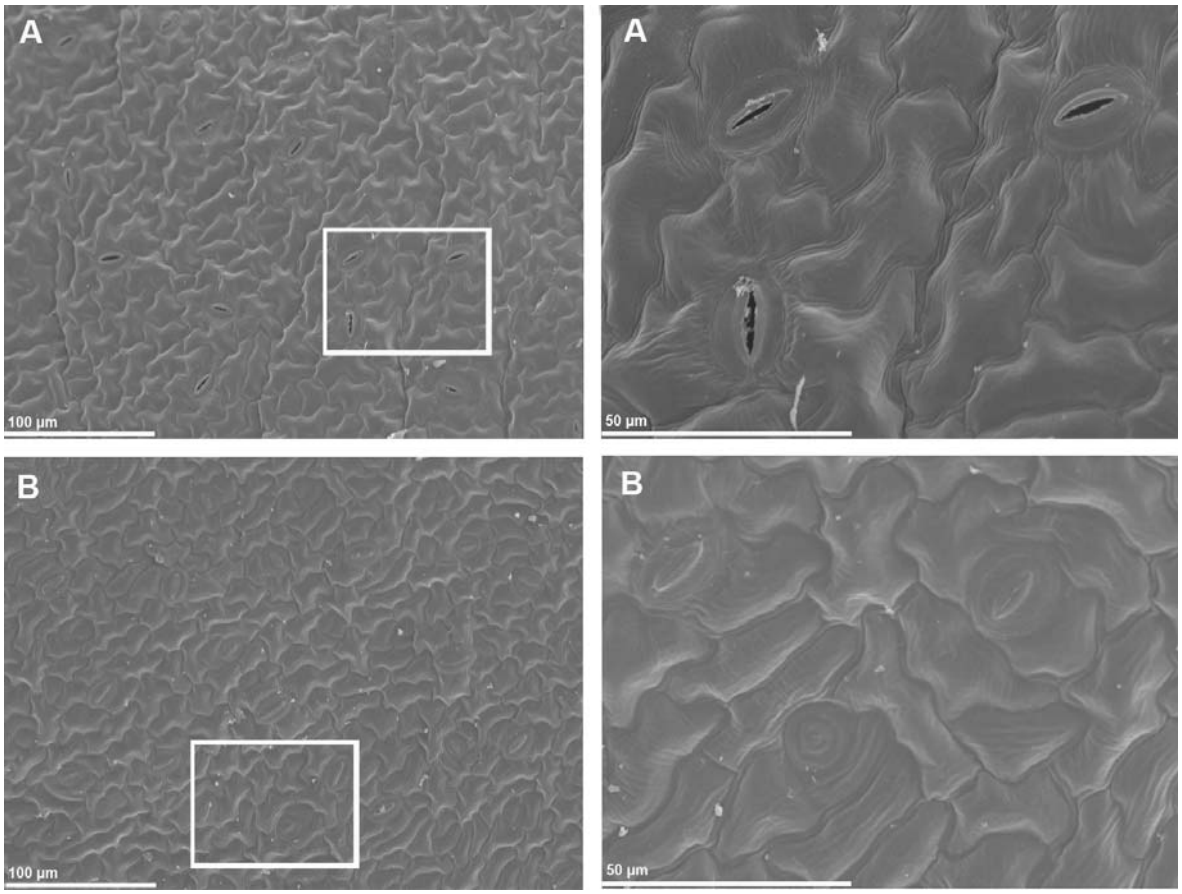
4.5. Efecto de las condiciones lumínicas en la pérdida de agua y en la apertura estomática

Después de 5 días de conservación, las pérdidas de peso fueron de 0.4 ± 0.0 %, 0.8 ± 0.1% y 0.7 ± 0.1% en oscuridad, luz y fotoperiodo, respectivamente. En la **Fotografía 10.1** se muestra como las hojas expuestas a luz presentaron de forma continua sus estomas prácticamente abiertos. Después de 10 de conservación, el porcentaje de apertura estomática en lechuga romana IV Gama conservada en luz fue aproximadamente del 75 %. Datos similares se obtuvieron en el porcentaje de estomas cerrados en lechuga conservada en oscuridad (**Tabla 10.1**). También se estudió el efecto de las distintas condiciones lumínicas sobre la materia seca, sin observarse diferencias significativas entre ellas (5 %, aproximadamente).

Tabla 10.1. Porcentaje de estomas abiertos y cerrados en lechuga romana IV Gama conservada 3d a 4 ºC y el resto a 7 ºC bajo luz y oscuridad.

Condiciones de conservación	Abierto (%)	Cerrados (%)
Luz	74.2 ± 11.0	25.8 ± 11.0
Oscuridad	25.1 ± 27.1	74.9 ± 27.1

Los valores representan una media de n=10 ± S.D.



Fotografía 10.1. Microscopía electrónica de la superficie de la hoja de romana expuesta a la luz (A) y a la oscuridad (B) a 100 µm y 50 µm.

4.6. Efecto de las condiciones lumínicas en el contenido de vitamina C y de compuestos fenólico

Los valores obtenidos en el contenido en vitamina C (como ácido ascórbico (AA) y ácido dehidroascórbico (ADHA) de lechuga romana IV Gama variaron entre 5 y 7 mg 100 g^{-1}. El contenido de vitamina C después de 8 y 10 días de conservación se muestra en la **Figura 10.7**. Durante la conservación, no se observó mayor degradación del contenido de vitamina C en las muestras expuestas a luz ya que no hubo diferencias significativas entre las diferentes condiciones lumínicas (**Figura 10.7**).

El contenido inicial de compuestos fenoles en las muestras de lechuga fue de 104 mg 100 g^{-1} aumentando ligeramente durante la conservación, principalmente en las muestras conservadas más de 10 días en oscuridad (170 mg 100 g^{-1}). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre las diferentes condiciones lumínicas (**Figura 10.8**). El contenido de cada uno de los compuestos fenólicos individuales como los ácidos clorogénico, isoclorogénico, monocafeoiltartárico y dicafeoiltartárico, no se vio influenciado por las condiciones lumínicas (datos no mostrados).

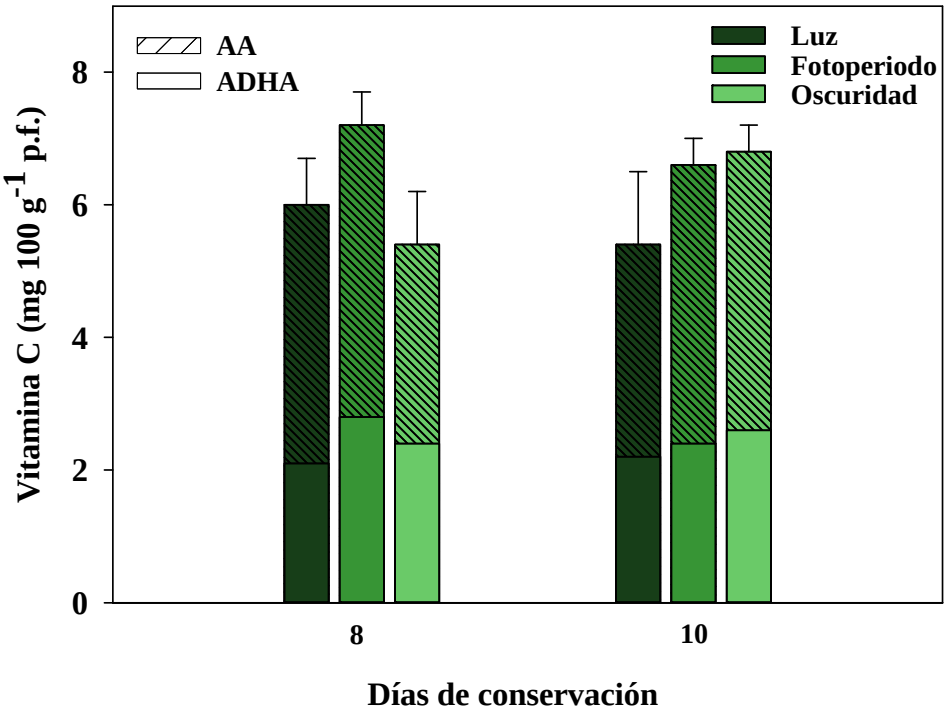


Figura 10.7. Efecto de las condiciones lumínicas en el contenido de vitamina C (ácido ascórbico (AA) y ácido dehidroascórbico (ADHA) en lechuga romana IV Gama conservada 3 d a 4 ºC y el resto a 7 ºC bajo las condiciones lumínicas descritas anteriormente.

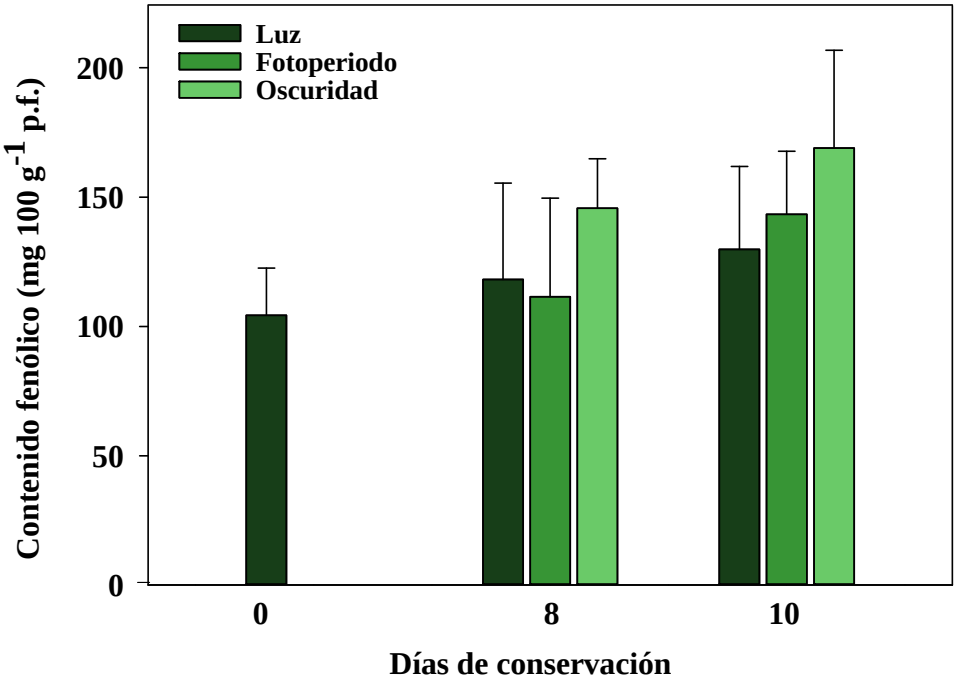


Figura 10.8. Efecto de las condiciones lumínicas en los compuestos fenólicos totales de la lechuga romana IV Gama conservada 3 d a 4 ºC y el resto a 7 ºC bajo las condiciones lumínicas descritas anteriormente.

5. DISCUSIÓN

En el estado de equilibrio se puede determinar el límite más bajo de O_2, pero asegurando una respiración aeróbica y el más alto, pero evitando el pardeamiento (Joles y col., 1994; Cameron y col., 1995). La concentración de O_2 alcanzada estuvo influenciada por la tasa respiratoria del producto, la cual dependió de la masa y del tipo de producto, de los métodos de preparación, de la permeabilidad de la película plástica y de las dimensiones de la bolsa. En nuestro caso, las bolsas empleadas fueron similares para facilitar la realización del estudio. Smyth y col., (1998) describieron que la oxidación es un proceso continuo, por lo que puede existir un umbral para la detección visual de los productos oxidados. Esta hipótesis es razonable, puesto que observamos el comienzo de oxidación a 0.5 kPa de O_2 y aumentó al incrementar la concentración de O_2, causando cambios visibles en el pardeamiento de la zona de corte. Sin embargo, Hamza y col., (1996) señalaron que una disminución de la concentración de O_2 al 1% y de CO_2 al 10% redujo el pardeamiento en tejidos de lechuga romana IV Gama, pero que una concentración del 0.5% de O_2 aumentó el pardeamiento por el desarrollo de anaerobiosis. De acuerdo con estos autores, la intensidad del pardeamiento y el desarrollo de anaerobiosis en lechuga romana conservada con 0.5% de O_2, sugirieron que valores por debajo de 1% de O_2

reducen los efectos beneficiosos del bajo O_2. Por lo tanto, el rango de O_2 capaz de mantener la calidad visual en el límite de aceptación comercial para lechuga romana IV Gama fue entre 0.2 y 0.5 kPa. Este es un rango muy estrecho que hace que el control de las condiciones de conservación, fundamentalmente la temperatura, sea crítico. Actualmente, hay una preocupación en el sector de la IV Gama por la mejora de las condiciones óptimas de conservación, en el cual apenas existe información de la influencia de las condiciones lumínicas en la tasa respiratoria del producto IV Gama. Los resultados mostrados en este estudio del consumo de O_2 indican la gran influencia de las condiciones lumínicas en la tasa respiratoria de la lechuga IV Gama. Las diferencias en la composición gaseosa del espacio de cabeza entre los envases conservados en luz y oscuridad se deben al efecto de la luz sobre la actividad fisiológica de los tejidos. Olarte y col., (2009) observaron que el material vegetal pigmentado presentaba una actividad fotosintética en presencia de luz. El consumo de O_2 debido a la actividad respiratoria en condiciones lumínicas está compensado por la producción durante el proceso de fotosíntesis. Por otra parte, los envases conservados en fotoperiodo mostraron concentraciones de O_2 y CO_2 intermedias entre las condiciones de luz y oscuridad. La exposición a la luz prolonga el intercambio gaseoso entre el tejido y la atmósfera dentro del envase en proporción al número de horas de exposición (Sanz y col., 2007). Esto nos llevó al estudio de la posición de los envases en las estanterías, influyendo la ubicación de los mismos en la composición gaseosa del envase. El pardeamiento es la principal causa que limita la vida útil (Ballantyne y col., 1988). En distintos estudios se describe el efecto negativo de la exposición a luz en la calidad sensorial de coliflor, puerros y espárragos (Sanz y col., 2007, 2009; Ayala y col., 2009). Sanz y col., (2007) observaron que en presencia de luz se aceleró el desarrollo de pardeamiento en la zona de corte en coliflor IV Gama. Por otra parte, las muestras conservadas en oscuridad mostraron ligeros malos olores y sabores a día 10 de conservación, debido al bajo O_2 alcanzado dentro del envase, aunque dentro de los límites comerciales. Se ha descrito la estabilidad del color en los envases con niveles de $O_2 < 1$ kPa (Smyth y col., 1998) de acuerdo con nuestros resultados.

Las condiciones lumínicas afectaron a otros parámetros físico-químicos como la pérdida de electrolitos a través de la membrana, la cual es considerada como una medida indirecta de la integridad de las membranas. Se ha descrito que el daño provoca la pérdida de la integridad de las membranas resultando en un aumento en la pérdida iónica (Jiang y col., 2001). Este parámetro ha sido empleado por algunos autores para evaluar la influencia

de la concentración inicial de O_2 y de la tasa respiratoria en la calidad de la lechuga romana IV Gama (Kim y col., 2005). Se ha descrito que la concentración de O_2 > 2.5 kPa disminuye la pérdida de electrolitos en lechuga romana IV Gama, independientemente de la concentración de O_2 inicial (0.0 ó 1.5 kPa) (Kim y col., 2005). La acumulación de productos del metabolismo anaerobio conlleva a la desorganización celular y favorece la pérdida de integridad de los tejidos (Hamza y col., 1996). De acuerdo con esto, los resultados obtenidos indican que a la concentración de O_2 por debajo de la óptima se activa el metabolismo anaeróbico en los envases conservados en oscuridad aumentando la pérdida de electrolitos. Además, debido al metabolismo anaeróbico se desarrollaron malos olores. Olarte y col., (2009) observaron que estas condiciones pueden tener efecto sobre la textura. El coeficiente de "crispiness" de lechuga romana IV Gama fue afectado por la conservación. Sin embargo, Ayala y col. (2009) observaron un aumento en textura de puerros IV Gama expuestos a luz durante la conservación, atribuyendo estos cambios a la pérdida de humedad seguido de un aumento del grado de lignificación. Estudios anteriores, observaron que la pérdida de humedad estaba relacionada directamente con el número de horas de exposición a la luz (Sanz y col., 2007). De acuerdo con nuestros resultados, Noichinda y col. (2007) señalaron que tras 10 días de conservación, la pérdida de agua del brócoli chino fue de 1.8 % en oscuridad y 3.9 % en luz. Sin embargo, en nuestro estudio, la pérdida de peso fue muy baja debido a la alta HR dentro de los envases y la exposición de luz durante la conservación (5d). Otros estudios, observaron la pérdida de peso después de 15 días de conservación en acelgas (Sanz y col., 2007) y después de 25 días en coliflor y brócoli (Olarte y col., 2009).

En el caso de las hortalizas de hoja, la regulación de la transpiración es bien conocida (Ben-Yehoshua y Rodov, 2003). En las hojas maduras después de la recolección, los estomas se cierran y aumenta el papel de la transpiración cuticular. La apertura estomática contribuye considerablemente a la conductividad del agua en la hoja (Kerstiens, 1996). Noichinda y col., (2007) observaron que los estomas en brócoli chino se cerraban con 1 día de conservación en oscuridad y se mantenían abiertos en condiciones de luz. Varios estudios han afirmado que la exposición a la luz estimula la apertura estomática y facilita el intercambio de gases entre los tejidos y la atmósfera gaseosa dentro del envase pero ninguna de estas publicaciones han examinado la superficie por microscopía electrónica de barrido (Sanz y col., 2007, 2008; Ayala y col., 2009; Olarte y col., 2009). Estas publicaciones midieron los cambios en la composición gaseosa del espacio de cabeza

y las pérdidas de peso, y con estos datos hipotetizaron que la luz causó un aumento en la apertura estomática y en la tasa respiratoria, ero nunca realizaron pruebas específicos para su detección. Nuestros datos mostraron claramente que la exposición a luz aumentó el número de estomas abiertos y las pérdidas de peso se correlacionó con este hecho. El cierre de los estomas en condiciones de oscuridad podría explicar la alta resistencia a la transferencia gaseosa de los órganos de las plantas recolectadas (Ben-Yehoshua y Rodov, 2003), mientras que la apertura estomática explicaría el alto intercambio gaseoso de la respiración y las actividades fotosintéticas en aquellos tejidos expuestos a luz.

Además, las condiciones lumínicas también pueden afectar al contenido de compuestos antioxidantes en lechuga para IV Gama. Los resultados obtenidos de vitamina C están de acuerdo con los valores descritos en lechuga (Llorach y col., 2008). La principal forma de vitamina C es AA aunque el ADHA se presentó en gran proporción (60 % y 40 %, respectivamente) comparado con otras hortalizas de hoja verde como mizuna, berro, rúcula salvaje y rúcula cultivada, cuya proporción de AA fue mucho mayor (83 %, 78 %, 71 % y 65 %, respectivamente) (Martínez-Sanchéz y col., 2008). Estudios anteriores mostraron que el contenido de AA en espinaca y brócoli chino disminuyó durante la conservación en oscuridad (Toledo y col., 2003; Noichinda y col., 2007). Noichinda y col. (2007) relacionaron los altos niveles de AA en presencia de luz con el contenido de hexosas el cual aumentó durante la conservación cuando el brócoli chino se expuso a luz, confirmando que el proceso de fotosíntesis todavía continúa. Toledo y col. (2003) señalaron el alto contenido de AA en espinaca conservada en luz por la actividad fotosintética de las hojas, aumentando la disponibilidad de los carbohidratos solubles, especialmente glucosa, que contribuye al control del AA. Estos resultados fueron confirmados por Lester y Markus (2010) ya que observaron que el contenido de vitamina C en espinaca expuesta a luz se mantuvo durante 9 días de conservación. En nuestro estudio, aunque el contenido en vitamina C en lechuga romana es bajo, se conservó bien en todas las condiciones lumínicas.

Otros compuestos antioxidantes que pueden verse afectados por las condiciones lumínicas son los compuestos fenólicos. Nuestros resultados corroboran el aumento en el contenido fenólico durante la conservación, observado en estudios anteriores en lechuga roja (Gil y col., 1998) y en iceberg IV Gama (Beltrán y col., 2005). Este aumento puede ser explicado por el daño inducido durante el corte. La vía de los fenilpropanoides

(mencionada en el capítulo I) desamina el aminoácido L-fenilalanina a trans cinámico mediante el enzima PAL (PAL, EC 4.3.1.5) realizando otras reacciones posteriores que sintetizan nuevos compuestos como el ácido 5-dicafeoilquínico o ácido clorogénico, el ácido 3,5-dicafeoilquínico, el ácido cafeoiltartárico y el ácido dicafeoiltartárico (Tomás-Barberán y col., 1997 a, b). En nuestro estudio, observamos que el pardeamiento estimuló la vía de los fenilpropanoides, aumentando la producción de los principales compuestos fenólicos y sintetizando otros nuevos. Sin embargo, la exposición a la luz no estimuló esta vía puesto que no se observaron diferencias en el contenido fenólico individual entre muestras expuesta a luz y oscuridad. Los resultados de Zhou y col (2009) demostraron que altos niveles de luz causaron un aumento en la excitación energética y en la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en plantas de lechuga sugiriendo la posibilidad de un mecanismo fotoprotector que podría aumentar los compuestos fitoquímicos antioxidantes. En nuestro estudio, aunque el contenido fenólico no varió entre las condiciones lumínicas, las muestras conservadas en oscuridad presentaron valores mayores, debido al desarrollo de pardeamiento en las lechugas conservadas con luz, lo que provocó la reducción del contenido fenólico.

6. CONCLUSIONES

La concentración de O_2 fue un factor crítico en lechuga romana IV Gama para el desarrollo de pardeamiento que ocurrió cuando el nivel de O_2 fue mayor al 0.5 kPa y la generación de una fermentación anaeróbica a concentración inferior al 0.2 kPa. En condiciones lumínicas, la actividad respiratoria fue compensada por la fotosíntesis resultando valores más altos de O_2. Este aumento en la concentración de O_2 afectó a la calidad sensorial de la lechuga romana IV Gama, reduciendo la vida útil tras el corte debido al desarrollo de pardeamiento en la zona del corte. Se seleccionó una película de envasado con una permeabilidad al O_2 adecuada teniendo en cuenta la mayor tasa respiratoria en condiciones de luz. Ya que los envases pueden ser conservados en condiciones lumínicas, la tasa respiratoria puede verse afectada, y por eso, es importante la selección adecuada de la película plástica. De hecho, las condiciones lumínicas incontroladas durante la conservación y distribución comercial pueden contribuir a inducir pardeamiento y rechazo del producto por parte del consumidor, particularmente en los tipos de lechuga más susceptibles al pardeamiento como el tipo romana. Teniendo en cuenta estos factores, los productores de IV Gama pueden ofrecer un producto de calidad más uniforme.

CAPÍTULO XI

CONCLUSIONES

I. El estado de madurez en hortalizas de hoja afecta a la calidad y vida útil del producto entero y en IV Gama. En lechuga, la materia prima inmadura aumenta la tasa respiratoria del producto IV Gama, provocando desarrollo de malos aromas y daño en el tejido. Por el contrario, la lechuga sobremadura desarrolla sabores amargos y pardeamiento pudiendo provocar el rechazo de los consumidores.

II. Se recomienda el desarrollo de variedades de minihojas tipo “multi” y “baby” por las excelentes características sensoriales y nutricionales del producto procesado. Dichas variedades reúnen los requerimientos para su procesado en IV Gama respecto a la excelente calidad visual, baja carga microbiana y alto contenido en compuestos fitoquímicos.

III. Las soluciones nutritivas aplicadas al cultivo sin suelo de lechuga no afectó a las características de calidad de la materia prima, aunque dependió del genotipo. Los genotipos rojos fueron más adecuados para este sistema de producción, bajo la solución nutritiva intermedia. El ajuste de nutrientes en el cultivo sin suelo es crucial teniendo en cuenta que las condiciones climatológicas y el genotipo tienen una gran influencia en la calidad del producto IV Gama.

IV. El cultivo sin suelo de lechuga disminuyó el pardeamiento del borde del producto de IV Gama e incrementó el contenido en compuestos bioactivos respecto al cultivo en suelo. La elección del genotipo influyó en la calidad del producto IV Gama. Las variedades rojas presentaron mejor calidad en cultivo sin suelo. Este estudio pone de manifiesto la gran relevancia del empleo del sistema de cultivo y de las variedades adecuadas para garantizar la calidad del producto de IV Gama.

V. El agua aportada durante el cultivo de lechuga iceberg y romana influyó en la calidad del producto de IV Gama. El exceso de riego aceleró el desarrollo de pardeamiento correlacionado con la mayor actividad de los enzimas PPO y PAL favoreciendo el desarrollo de pardeamiento y el crecimiento microbiológico. Los resultados demuestran la importancia de establecer estrategias de riego optimizadas que permitan mejorar el rendimiento y la calidad de la materia prima y del producto IV Gama, además de repercutir positivamente sobre el medioambiente.

VI. Las condiciones lumínicas durante la conservación de lechuga IV Gama aumentan la concentración de O_2 reduciendo la vida útil debido al desarrollo de pardeamiento. Los niveles de O_2 entre los que la calidad visual de la lechuga romana IV Gama se mantiene están entre el 0.2 y 0.5 kPa. Este rango es muy estrecho y hace que las condiciones lumínicas incontroladas durante la conservación y distribución comercial puedan contribuir a la inducción de pardeamiento y al rechazo del producto por parte del consumidor.

CAPÍTULO XII

BIBLIOGRAFÍA

Abu-Hamdeh, N.H., Abo-Qudais, S.A., Othman, A.M., 2006. Effect of soil aggregate size on infiltration and erosion characteristics. *Eur. J. Soil Sci.,* 57, 609–616.

Acedo, A.L., 2010. Postharvest technology for leafy vegetables. AVRDC-ADB Postharvest Projects RETA 6208/6378. AVRDC Publication No. 10-7333. AVRDC –The world Vegetable Center, Taiwan. p. 67 htttp://libnts.avrdc.org.tw/fulltext-pdf/EB/2001-2010/eb0129.pdf (Acceso 11 Marzo 2012).

Ackers, M.L., Mahon, B.E., Leahy, E., Goode, B., Damrow, T., Hayes, P.S., Bibb, W.F., Agar, I.T., Streif, J., Bangerth, F., 1997. Effect of high CO_2 and controlled atmosphere (CA) on the ascorbic and dehydroascorbic acid content of some berry fruits. *Postharvest Biol. Technol.,* 43, 245–254.

AFHORLA, 2010. http://www.afhorla.com/noticias_ver.php?noticia=17

Agüero, M.V., Barg, MV., Yommi, A., Camelo, A., Roura, S.I., 2008. Postharvest Changes in Water Status and Chlorophyll Content of Lettuce (*Lactuca Sativa* L.) and their Relationship with Overall Visual Quality. *J. Food Sci.,* 73, 47–55.

Agüero, M.V., Ponce, A.G., Moreira, M.R., Poura, S.I., 2011. Lettuce quality loss under conditions that favor the wilting phenomenon. . *Postharvest Biol. Technol.*, 59, 124–131.

Aherne, S.A., O´Brien, N.M., 2002. Dietary flavonols: Chemistry, food content, and metabolism. *Nutrition,* 18, 75–81.

Ahn, H.J, Kim, J. H., Kim, J.K., Kim, D.H., Yook, H.S., Byun, M.W., 2005. Combined effects of irradiation and modified atmosphere packaging on minimally processed Chinese cabbage (Brassica rapa L.). *Food Chem.,* 89, 589–597.

Aist, J.R., Gold, R.E., 1987. Prevention of fungal ingress: the role of papillae and calcium. En: Nishimura, S., Vance, C.P., Doke, N. (Eds.), Molecular Determinants of Plant Disease, Japan Scientific Societies Press, Tokio, pp. 47–59.

Alippi, A.M., López, A C., Rollan, M.C., Ronco, L., Aguilar, O.M., 2002. Fluorescent Pseudomonas species causing post-harvest decay of endives in Argentina. *Rev. Argent. Microbiol.* 34, 193–198.

Allende, A., Selma, M.V., López-Gálvez, F., Villaescusa, R., Gil, M.I., 2008. Role of commercial sanitizers and washing systems on epiphytic microorganisms and sensory quality of fresh-cut escarole and lettuce. *Postharvest Biol. Technol.* 49, 55–163.

Alonso, P., 2007. Situación de la IV Gama en España. *Horticultura Internacional,* 58, 54–59.

Altunkaya, A., Gökmen, V., 2008. Effect of various inhibitors on enzymatic browning, antioxidant activity and total phenol content of fresh lettuce (*Lactuca sativa*). *Food Chem.* 107, 1173–1179.

Altunkaya, A., Gökmen, V., 2011. Purification and characterization of polyphenol oxidase, peroxidase and lipoxygenase from freshly cut lettuce (*L. sativa*). *Food Technol. Biotech.,* 49, 249–256.

Amiot, M.J.; Tacchini, M.; Aubert, S.; Nicolas, J, 1992. Phenolic composition and browning susceptibility of various apple cultivars at maturity. *J. Food Sci.,* 57, 958–962.

Arvanitoyannis, I.S., Bouletis, A.D., Papa, E.A., Gkagtzis, D.C., Hadjichristodoulou, C., Papaloucas, C., 2011. Microbial and sensory quality of "Lollo verde" and rocket salad stored under active atmosphere packaging. *Anaerobe,* 17, 307–309.

Ayala, F., Echávarri, J.F., Olarte, C., Sanz, S., 2009. Quality characteristics of minimally processed leek packaged using different films and stored in lighting conditions. *Int. J. Food Sci. Tech.,* 44, 1333–1343.

Babic, I., Roy, S., Watada, A.E., Wergin, W.P., 1996. Changes in microbial populations on fresh cut spinach. *Int. J. Food Microbiol.,* 31, 107–119.

Ballantyne, A., Stark, R., Selman, J.D., 1988. Modified atmosphere packaging of shredded lettuce. *Int. J. Food Sci. Tech.,* 23, 267–274.

Barg, M., Agüero, M.V., Yommi, A., Roura, S.I., 2008. Evolution of plant water status indices during butterhead lettuce growth and its impact on post-storage quality. *J. Sci. Food Agric.,* 89, 422–429.

Baur, S., Klaiber, R.G., Koblo, A., Carle, R., 2004. Effect of different washing procedures on phenolic metabolism of shredded, packaged iceberg lettuce during storage. *J. Agric. Food Chem.,* 52, 7017–7025.

Beltrán, D., Selma, M.V., Marín, A., Gil, M.I., 2005. Ozonated water extends the shelf life of fresh-cut lettuce. *J. Agric. Food Chem*. 53, 5654–5663.

Bennett, R.N., Rosa, E.A.S., Mellon, F.A., Kroon, P.A., 2006. Ontogenic profiling of glucosinolats, flavonoids, and other secondary metabolites in *Eruca sativa* (salad rocket), *Diplotaxis erucoides* (wall rocket), *diplotaxis tenuifolia* (wild rocket), and *Bunias orienta*lis (Turkish rocket). *J. Agric. Food Chem.,* 54, 4005–4015.

Ben-Yehoshua, S., Rodov, V., 2003. Transpiration and water stress. En: Bartz, J.A., Brecht, J.K. (Eds), Postharvest Physiology and Pathology of Vegetables, Marcel Dekker, New York, pp. 119–135.

Bergmüller, E., Porfirova, S., Dörmann, P., 2003. Characterization of an Arabidopsis mutant deficient in ɣ-tocopherol methyltransferase. *Plant Mol. Biol.,* 52, 1181–1190.

Bestwick, C.S., Brown, I.R., Mansfield, W., 1998. Localized changes in peroxidase activity accompany hydrogen generation during the development of a nonhost hypersensitive reaction in lettuce. *Plant Physiol.,* 118, 1067–1078.

Beuchat, L.R., 2002. Ecological factors influencing survival and growth of human pathogens on raw fruits and vegetables. *Microbes Infect.,* 4, 413–423.

Beuchat, L.R., 2006. Vectors and condition for pre-harvest contamination of fruits and vegetables with pathogens capable of causing enteric diseases. *Brit. Food J.* 108, 38–53.

Biolari, H., 1982. The effect of partial wetting of the root zone on yield and water use efficiency in a drip and sprinkler-irrigated mature grapefruit grove. *Irrig. Sci.,* 3, 89–100.

Blancard, D., Lot, H., Maisonneuve, B., 2005. Anomalías, alteraciones de las hojas y del cogollo. En: Blancard, D., Lot, H., Maisonneuve, B. (Eds.), Enfermedades de las Lechugas. Identificar, Conocer, Controlar, Mundi-prensa, Madrid, pp. 27–117.

Blancard, D., Lot, H., Maisonneuve, B., 2005. Diagnóstico de las enfermedades parasitarias y no parasitarias de las lechugas. En: Blancard, D., Lot, H., Maisonneuve, B. (Eds.), Enfermedades de las Lechugas. Identificar, Conocer, Controlar, Mundi-prensa, Madrid, pp. 20–27.

Bolin, H.R., Huxsoll, C.C., 1991. Effect of preparation procedures and storage parameters on quality retention of salad-cut lettuce. *J. Food Sci.* 56, 60–67.

Bonilla I., 2008. Introducción a la nutrición mineral de las plantas. Los elementos minerales. En: Azcón-Bieto, J., Talón, M. (Eds.), Fundamentos de Fisiología Vegetal, McGrawHill, Madrid, pp. 103–121.

Boo, H.O., Heo, B.G., Gorinstein, S., Chon, S.U., 2011. Positive effects of temperature and growth conditions on enzymatic and antioxidant status in lettuce plants. *Plant Sci.,* 181, 479–484.

Bouwens, E.C., Trivedi, K., Vliet, C., Winkel, C., 1999. Method for enhancing colour in a tea-based foodstuff. US Patent 5879730.

Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.,* 210, 727–735.

Brandl, M.T., Amundson, R., 2008. Leaf age as a risk factor in contamination of lettuce with *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica. Appl. Environ. Microbiol.,* 74, 2298–2306.

Brisson, L.F., tenhanken, R., Lamb, C.J., 1994. Function of oxidative cross-linking of cell wall structural proteins in plant disease resistance. *Plant Cell,* 6, 1703–1712.

Brouillard, R., 1982. Chemical structure of anthocyanins. En: Markakis, P. (Ed.), Anthocyanins is Food Color, Academic Press, New York, pp. 1–40.

Burns, I.G., Durnford, J., Lynn, J., McClement, S., Hand, P., Pink, D., 2012. The influence of genetic variation and nitrogen source on nitrate accumulation and iso-osmotic regulation by lettuce. *Plant soil,* 352, 321–339.

Calderon-Lopez, B., Bartsch, J. A., Less, C.Y., Watkins, C.B., 2005. Cultivar effects on quality of fresh-cut apple slices from 1-methylcyclopropene (1-MCP) treated apple fruit. *J. Food Sci.,* 70, 221–227.

Cameron, A.C., Talasila, P.C., Joles, D.W., 1995. Predicting film permeability needs for modified-atmosphere packaging of lightly processed fruits and vegetables. *HortScience,* 30, 25–34.

Campos-Vargas, R., Nonogaki, H., Suslow, T., Salveit, M.E., 2004. Isolation and characterization of a wound inducible phenylalanine ammonia-lyase gene (LsPAL1) from romaine lettuce leaves. *Physiol. Plant.,* 121, 429–438.

Campos-Vargas, R., Nonogaki, H., Suslow, T., Salveit, M.E., 2005. Heat shock treatments delay the increase in wound-induced phenylalanine ammonia –lyase activity by altering its expression, not its induction in romaine lettuce (*Lactuca sativa*) tissue. *Physiol. Plant.,* 123, 82–91.

Campos-Vargas, R., Salveit, M. E., 2002. Involvement of putative chemical wound signals in the induction of phenolic metabolism in wounded lettuce. *Physiol. Plant.,* 114, 73–84.

Cantos E., Espín J.C., Tomás-Barberán F.A., 2001. Effect of wounding on phenolic enzymes in six minimally processed lettuce cultivars upon storage. *J. Agric. Food Chem*., 49, 322–330.

Cantwell M and Ermen H., 2006. Causes of quality and postharvest losses. http://postharvest.ucdavis.edu/datastorefiles/234–688.pdf.

Cantwell M and Suslow T., 1999. Radicchio. Recommendations for Maintaining Postharvest Quality. http://postharvest.ucdavis.edu/pfvegetable/Radicchio/ (Accessed January 18, 2012).

Cantwell M and Suslow T., 2001a. Lettuce, Romaine. Recommendations for Maintaining Postharvest Quality. http://postharvest.ucdavis.edu/pfvegetable/LettuceRomaine/ (Accessed January 18, 2012).

Cantwell M and Suslow T., 2001b. Belgian endive. Recommendations for Maintaining Postharvest Quality. http://postharvest.ucdavis.edu/pfvegetable/BelgianEndive/ (Accessed January 18, 2012).

Cantwell M and Suslow T., 2001c. Cabbage (Round & Chinese types). Recommendations for Maintaining Postharvest Quality. http://postharvest.ucdavis.edu/pfvegetable/Cabbage/ (Accessed January 18, 2012).

Cantwell M and Suslow T., 2002. Lettuce, Crisphead. Recommendations for Maintaining Postharvest Quality. http://postharvest.ucdavis.edu/pfvegetable/LettuceCrisphead/ (Accessed January 18, 2012).

Cantwell, M., 1996. Comparing commercial salad products. *Fresh-cut* 4, 8–9.

Cantwell, M., 1996. Fresh-cut biology and requirements. En: Fresh-cut Products: Maintaining Quality and Safety. Postharvest Horticulture Series; Postharvest Outreach Program, vol. 10. Department of Pomology, University of California, Davis, pp. 7.2–7.7.

Cantwell, M., 2004. Evaluating the quality of fresh-cut products. En: Fresh-cut Products: Maintaining quality and safety. Postharvest Horticultural Series No. 10. University of California, Davis, CA.

Cantwell, M., Rovelo, J., Nie, X., Rubatzky, V., 1998. Specialty salad greens: postharvest physiology and shelf-life. *Acta Hortic.* 467, 371–377.

Cantwell, M., Suslow, T., 2004. Fresh-cut fruits and vegetables: aspects of physiology, preparation and handling that affect quality. En: Fresh-cut Products: Maintaining quality and safety. University of California, Davis, Section 4B.

Cantwell, M.I., Kasmire, R.F., 2002. Posharvest handling systems: Flower, leafy and stem vegetables. En: Kader A.A. (Ed.), Postharvest Technology of Horticultural Crops, University of California, Agriculture and Natural Resources, Davis, pp. 475–486.

Cantwell, M.I., Kasmire, R.F., 2002. Postharvest handling systems: fruit vegetables. En: Kader A.A. (Ed.), Postharvest Technology of Horticultural Crops, University of California, Agriculture and Natural Resources, Davis, pp. 407–21.

Cantwell, M.I., Suslow, T., 2002. Posharvest handling systems: fresh-cut fruits and vegetables. En: Kader A.A. (Ed.), Postharvest Technology of Horticultural Crops, University of California, Agriculture and Natural Resources, Davis, pp. 497–517.

Castañer, M., Gil, M.I., Ruiz, M.V., Artés, F., 1999. Browning susceptibility of minimally processed Baby and Romaine lettuces. *Eur. Food Res. Technol.* 209, 52–56.

Chappell, J., Hahlbrock, K., 1984. Transcription of plant defence genes in response to UV light or fungal elicitior. *Nature,* 311, 76–78.

Chiesa A., Mayorga I., Leon A., 2009. Quality of fresh cut lettuce (*Lactuca sativa* L.) as affected by lettuce genotype, nitrogen fertilisation and crop season. *Adv. Hort. Sci.,* 23,143–149.

Chisari M., Todaro A., Barbagallo R.N., Spagna G., 2010. Salinity effect on enzymatic browning and antioxidant capacity of fresh-cut baby Romaine lettuce (*Lactuca sativa* L. cv. Duende). *Food Chem.,* 119, 1502–1506.

Christie, P.J., Alfenito, M.R., Walbot, V., 1994. Impact of low temperature stress on general phenylpropanoid and anthocyanin pathways. *Planta,* 194, 541–549.

Clifford, M.N., 2000. Chlorogenic acids and other cinnamates-nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism. *J. Sci. Food Agric.,* 80, 1033–1043.

Coelho, A.F., Gomes, E.P., Sousa, A.P., Gloria, M.B.A., 2005. Effect of irrigation level on yield and bioactive amine content of American lettuce. *J. Sci. Food Agric*., 85, 1026–32.

Conklin, P.L., Pallanca, J.E., Last, R.L., Smirnoff, N., 1997. L-Ascorbic acid metabolism in the ascorbate-deficient Arabidopsis mutant vtcl. *Plant Physiol.,* 115, 1277–1285.

Coria-Cayupán, Y.S., Sánchez de Pinto, M.I., Nazareno, M.A., 2009. Variations in bioactive substance contents and crop yields of lettuce (*Lactuca sativa* L.) cultivated in soils with different fertilization treatments *J. Agric. Food Chem.,* 57, 10122–10129.

Cottle, W., Kolattukudy, P.E., 1982. Abscisic acid stimulation of suberization. *Plant Physol.,* 70, 775–780.

Couture, R., Cantwell, M.I., Ke, D., Saltveit, M.E., 1993. Physiological attributes and storage life of minimally processed lettuce. *HortScience,* 28, 723–725.

Crisosto, C.H., Mitchell, J.P., 2002. Preharvest factors affecting fruit and vegetable quality. En: Kader A.A. (Ed.), Postharvest Technology of Horticultural Crops, University of California, Agriculture and Natural Resources, Davis, pp. 49–54.

Crosby, K., Jifon, J., Leskovar, D., 2008. Agronomy and the nutritional quality of vegetables, En: Tomás-Barberán, F.A., Gil, M.I. (Eds.), Improving the Health-Promoting Properties of Fruit and Vegetable Products, CRC, Woodhead Publishing Limited, Cambridge, pp. 393–411.

Cuppett S.L., McCluskey M., Paparozzi E.T., Parkhurst A.,1999. Nitrogen and sulfur effects on leaf lettuce quality. *J. Food Quality,* 22, 363–373.

Cuppett, S.L., McCluskey, M., Paparozzi, E.T., Parkhurst, A., 1999. Nitrogen and sulfur effects on leaf lettuce quality. *J. Food Quality,* 22, 363–373.

D'Antuono L.F., Neri R., 2001. The evaluation of nitrogen effect on lettuce quality by means of descriptive sensory profiling. *Act Horticul.,* 563,217–222.

Davey, M.W., Gilot, C., Persiau, G., Ostergaard, J., Han, Y., Bauw, G.C., Van Montagu, M.C., 1999. Ascorbate biosynthesis in Arabidopsis cell suspension culture. *Plant Physiol.,* 121, 535–543.

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

Dawley, R.M., Flurkey, W.H., 1993. Differentiation of tyrosinase and laccase using 4-hexyl-resorcinol, a tyrosinase inhibitor. *Phytochemitry,* 33, 281–284.

Debevere, J., 1996. Criteria en praktische methoden voor de bepaling van de houdsbaarheidsdatum in de etikettering. Etikettering houdsbaarheid en bewaring (voedingsmiddelen en recht 2). *Die Keure, Brugge, Belgium, pp.* 37–64.

Degl´Innocenti E., Guidi L., Pardossi S., Tognoni F., 2005. Biochemical study of leaf browning in minimally processed leaves of lettuce (*Lactuca sativa* L. Var. Acephala*). J. Agric. Food Chem.,* 53, 9980–9984.

Degl'Innocenti, E., Pardossi, A., Tognoni, F., Guidi, L., 2007. Physiological basis of sensitivity to enzymatic browning in 'lettuce', 'escarole' and 'rocket salad' when stored as fresh-cut products. *Food Chem.,* 104, 209–215.

Dela D., Or E.; Ovadia R., nissim-Levi A.; Weiss D. and Oren-Shamir M., 2003. Changes in anthocyanin concentration and composition in "Jaguar" rose flowers due to transient high-temperature conditions. *Plant Sci.,* 164, 333–340.

Delaquis, P., Stewart, S., Toivonen, P., 1999. Effect of warm, chlorinated water on the microbial flora of shredded iceberg lettuce. *Food Res. Int.,* 32, 7–14.

Deza-durand, K.M., D., Petersen, M.A., 2011. The effect of cutting direction on aroma compounds and respiration rate of fresh-cut iceberg lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Postharvest Biol. Tecnol.,* 61, 83–90.

Dincer, B., Çolak, A., Aydin, N., Kadioglu, A., Güner, S., 2002. Characterization of polyphenoloxidase from medlar fruits (*Mespilus germanica* L. Rosaceae). *Food Chem.,* 77, 1–7.

Dixon, R.A., Paiva, N.L., 1995. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell,* 7, 1085–1097.

Doyle, M.P., Erickson, M.C., 2008. Summer meeting 2007–the problems with fresh produce: an overview. *J. Appl. Microbiol.,* 105, 317–330.

Drews, M., Schonhof, I., Krumbein, A., 1997. Content of minerals, vitamins, and sugars in iceberg lettuce grown in the greenhouse dependent on cultivar and development stage. *Gartenbauwissenschaft,* 62, 65–72.

Dufault R.J., Ward B., Hassell R.L., 2006. Planting date and romaine lettuce cultivar affect quality and productivity. *HortScience,* 41, 640–645.

Dupont, M.S., Mondin, Z., Williamson, G., Price, K.R., 2000. Effect of variety, processing, and storage on the flavonoid glycoside content and composition of lettuce and endive. *J. Agric. Food Chem.,* 48, 3957–3964.

DuPont, M.S., Mondin, Z., Williamson, G., Price, K.R., 2000. Effect of variety, processing, and storage on the flavonoid glycoside content and composition of lettuce and endive. *J. Agric. Food Chem.* 48, 3957–3964.

El-Nemr, M.A., Abdel-Mawgoud, A.M.R., Abd El-Baky, M.M.H., Mettawee, E.S., Salman, S.R., 2012. Responses of yield and leaf nitrate content of two lettuce cultivars to different sources of nitrogen in NFT system. *J. Appl. Sci. Res.,* 8, 2050–2056.

Espín, J.C., García-Ruiz, P.A., Tudela, J., Varón, R., García-Cánoxas, F., 1998. Monophenolase and diphenolase reaction mechanism of apple and pear polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem.,* 46, 2968–2975.

Espín, J.C., Morales, M., García-Ruiz, P.A., Tudela, J., García-Cánovas, F., 1997. Improvement of a continuous spectrophotometric method for determining the monophenolase and diphenolase activities of mushroom polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem.,* 45, 1084–1090.

Esteve, M.J., Farré, R., Frígola, A., 1995. Changes in ascorbic acid content in green asparagus during the harvesting period and storage. *J. Agric. Food Chem.,* 43, 2058–2061.

Fallovo, C., Rouphael, Y., Rea, E., Battistelli, A., Colla, G., 2009. Nutrient solution concentration and growing season affect yield and quality of *Lactuca sativa* L. var. acephala in floating raft culture. *J. Sci. Food Agric.,* 89, 1682–1689.

Fan, X., Sokorai, K.J.B., 2005. Assessment of radiation sensitivity of fresh-cut vegetables using electrolyte leakage measurement. *Postharvest Biol. Tecnol.,* 36, 191–197.

FAO/WHO, 2008. Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization. Microbiological harzards in fresh leafy vegetables and herbs. Meeting Report. Microbial Risk Assessment Series No. 14. Roma, 151.

FAOSTAT, 2010. Export value for vegetables 2010. http://faostat3.fao.org/home/index.html (accessed online 25 September 2012).

Fasakin, C.F., Chibuike, C.U., Rotimi E.A., 2011. Antioxidant properties of chlorophyll-enriched and chlorophyll-depleted polyphenolic fractions from leaves of Vernonia amygdalina and Gongronema latifolium. *Food Res. Int.,* 44, 2435–2441.

FDA, 1998. Guide to minimize the microbial food safety hazards for fresh fruits and vegetables. Guidance for Industry. Center for Food Safety and Applied Nutrition. FDA, Washington DC 20204. Available at: www.fda.gov/downloads/Food/../UCM169112.pdf.

Ferreres, F., Gil, M.I., Castañer, M., Tomás-Barberán, F.A., 1997. Phenolic metabolites in red pigmented lettuce (Lactuca sativa). Changes with minimally processing and cold storage. *J. Agric. Food Chem.* 45, 4249–4254.

Floristán, J.M., 2009. La evolución de las hortalizas en la IV Gama. *Horticultura,* 213, *Agosto, pp.* 22–25.

Fonseca, J.M., 2006. Postharvest quality and microbial population of head lettuce as affected by moisture at harvest. *J. Food Sci.,* 71, 45–49.

Fonseca, J.M., Kim, H.J., Kline, W.L., Wyenandt, C.A., Hoque, M., Ajwa, H., French, N., 2009. Effect of preharvest application of a second-generation harpin protein on microbial quality, antioxidants, and shelf life of fresh-cut lettuce. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.,* 134, 141–147.

Fonseca, S.C., Oliveira, F.A.R., Brecht, J.K., 2002. Modelling respiration rate of fresh fruits and vegetables for modified atmosphere packages: a review. *J. Food Eng.,* 52, 99–119.

Fontana E., Nicola S, Hoeberechts J., Saglietti D., 2003. Soilless culture systems produce ready-to-eat corn salad (*Valerianella olitoria* L.) of high quality. *Acta Hortic.,* 604, 505–509.

Fontana E., Nicola S., 2008. Producing garden cress (*Lepidium sativum* L.) for the fresh-cut chain using a soilless culture system. *J. Hortic. Sci. Biotech.,* 83, 23–32.

Fontes P.C.R., Pereira P.R.G., Conde R.M., 1997. Critical chlorophyll, total nitrogen and nitrate nitrogen in leaves associated to maximum lettuce yield. *J. Plant Nutr.,* 20, 1061–1068.

Franz, E., Semenov, A.V., van Bruggen, A.H.C., 2008. Modelling the contamination of lettuce with Escherichia coli O157:H7 from manure-amended soil and the effect of intervention strategies. *J. Appl. Microbiol.,* 105, 1569–1584.

Fukumoto, L.R., Toivonen P.M A., Delaquis, P.J., 2002. Effect of wash wáter temperatura and chlorination on phenolic metabolism and browning of stored iceberg lettuce photosynthetic and vascular tissues. *J. Agric. Food Chem.,* 50, 4503–4511.

Gallardo, M., Jackson, L.E., Schulbach, K., Snyder, R.L., Thompson, R.B., Whyland, L.J., 1996. Production and water use in lettuce under variable water supply. *Irrig. Sci.,* 16, 125–137.

Galvis-Sanchez, A.C., Fonseca, S.C., Morais, A.M.M.B., Malcata, F.X., 2004. Effects of preharvest , harvest and postharvest factor on the quality of pear (cv "Rocha") stored under controlles atmosphere conditions. *J. Food Eng.,* 64, 161–172.

Gil M.I., Ferreres F., Tomás-Barberán F.A.,1999. Effect of postharvest storage and processing on the antioxidant constituents (flavonoids and vitamin C) of fresh-cut spinach. *J. Agric. Food Chem.,* 47, 2213–2217.

Gil, M.I., Castañer, M., Ferreres, F., Artés, F., Tomás-Barberán, F.A., 1998. Modified atmosphere packaging of minimally processed "Lollo Rosso" (*Lactuca sativa*) phenolic metabolites and quality changes. *Z. Lebensm. Unters. Forsch*. 206, 350–354.

Gil, M.I., Tudela, J.A., Martínez-Sánchez, A., Luna, M.C., 2012. Harvest maturity indicators of leafy vegetables. *Steward Posthar. Rev., 1, 1–9.*

Gomes Soares, A., Trugo, L.C., Botrel, N., Silva Souza, L.F., 2005. Reduction of internal browning of pineapple fruit by preharvest soil application of potassium. *Postharvest Biol. Tec.,* 35, 201-207.

Gong, S., Corey, K.A., 1994. Predicting steady-state oxygen concentrations in modified-atmosphere packages of tomatoes. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.,* 119, 546–550.

Gorny, J.R., 2001. A summary of CA and MA requirements and recommendations for fresh-cut (minimally processed) fruits and vegetables. En: Postharvest Horticulture Series No. 22A. University of California, Davis, pp. 95–145.

Grncarevic, M., Hawker, J.J., 1971. Browning of Sultana grapes berries during drying. *J. Sci. Food Agric.,* 22, 270–272.

Haas, D., Défago, G., 2005. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonds. *Nat. Rev. Microbiol.,* 3, 307–319.

Hamza, F., Castaigne, F., Willemot, C., Doyon, G., Makhlouf, J., 1996. Storage of minimally processed romaine lettuce under controlled atmosphere. *J. Food Quality,* 19, 177–188.

Harbone, 1993. The flavonoids: Asvances in research since 1986. Harbone, J. B. Ed. Chaoman & Hall, London.

Harbone, J. B., Baxter, H., 1999. The Handbook of natural Flavonoids. Harborne, J. B. y Baxter, H. Eds., Wiley J. e hijos. Chichester, U. K., pp.889.

Hardenburg R.E., Watada A.E., Wang C.Y.,1986. The commercial storage of fruits, vegetables, and florist and nursery stocks. USDA Agric. Handbook No. 66, pp. 136.

Harris, L.J., Zagory, D., Gorny, J.R., 2002. Safety factors. En: Kader, A.A. (Ed.), Postharvest Technology of Horticultural Crops. University of California, Agriculture and Natural Resources, Davis, pp. 301–314.

Havsteen, B.H., 2002. The biochemistry and medicinal significance of the flavonoids. *Pharmacol. Ther.,* 96, 67–202.

Hayes, R.J., Liu, Y-B., 2008. Genetic variation for shelf-life of salad-cut lettuce in modified-atmosphere environments. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.,* 133, 228–233.

Heimdal, H., Bro, R., Larsen, L.M., Poll, L., 1997. Prediction of polyphenol oxidase activity in model solutions containing various combinations of chlorogenic acid, (-)-Epicatechin, O_2, CO_2, Temperature and pH by multiway data analysis. J. *Agric. Food Chem.,* 45, 2399–2406.

Heimdal, H., Kühn, B.F., Poll, L., Larsen, L.M., 1995. Biochemical changes and sensory quality of shredded and MA-packaged iceberg lettuce. *J. Food Sci,.* 60, 1265–1268.

Heimdal, H., Larsen, L.L., Poll, L., 1994. Characterization of polyphenol oxidase from phosynthetic and vascular tissues (*Lactuca sativa*). *J. Agric. Food Chem,.* 42, 1428–1433.

Helser, T.L., 1995. Improving a microscale vitamin C laboratory. *J. Chem. Educ.,* 72, 10–11.

Hewajulige, I.G.N., Wijeratnam, S.W., Wijesundera, R.L.C., 2006. Pre-harvest application of calcium to control black heart disorder in Mauritius pineapples during low-temperature storage. *J. Sci. Food Agric.,* 86, 420–424.

Hilborn, E.D., Mermin, J.H., Mshar, P.A., Hadler, J.L., Voetsch, A., Wojtkunski, C., Swartz, M., Mshar, R., 1999. A multistate outbreak of *Escherichia coli* 0157:H7 infections associated with consumption of mesclum lettuce. *Arch. Intern. Med.,* 159, 1758–1764.

Hilton H.W., Clifford S.C., Wurr D.C.E., Burton K.S., 2009. The influence of agronomic factors on the visual quality of field-grown, minimally-processed lettuce. *J. Hortic. Sci. Biotech.,* 84, 193–198.

Hodges D.M., Toivonen P.M.A., 2008. Quality of fresh-cut fruits and vegetables as affected by exposure to abiotic stress. *Postharvest Biol. Tecnol.,* 48, 155–162.

Hohl, U., Neubert, B., Pforte, H., Schonhof Böhm, H., 2001. Flavonoid concentrations in the inner leaves of head lettuce genotypes. *Eur. Food Res. Technol.,* 213, 205–211.

Hollman, P.C.H., Arts, I.C.W., 2000. Flavonols, flavones and flavonols. Nature, occurrence and dietary burden. *J. Sci. Food Agric.,* 80, 1081–1093.

Hoque M.M., Ajwa H., Othman M., Smith R., Cahn M., 2010. Yield and postharvest quality of lettuce in response to nitrogen, phosphorus, and potassium fertilizers. *HortScience,* 45, 1539–1544.

Howard, L.A., Wong, A.D., Perry, A.K., Klein, B.P., 1995. β-Carotene and Ascorbic Acid Retention in Fresh and Processed Vegetables. *J. Food Sci.,* 64, 929–936.

Howard, L.R. and Griffin, L.E., 1993. Lignin formation and surface discoloration of minimally processed carrot sticks. *J. Food Sci.,* 58, 1065–1067.

Hutzler, P., 1998. Tissue localization of phenolic compounds in plants by confocal laser sacning microscopy. *J. Exp. Bot.,* 49, 953–965.

Hyodo, H., Yang, S.F., 1978. Ethylene-enhanced synthesis of phenylalanine ammonia-lyase in pea seedlings. *Plant Physiol.,* 47, 765–770.

Infoagro. Acceso 7 de noviembre 2012. http://www.infoagro.com/hortalizas/lechuga.htm.

Inglese, P., Barone, E., Gullo, G., 1996. The effect of complementary irrigation on fruit growth, ripening pattern and oil characteristics of olive (*olea europea* L.) cv. Carolea. *J. Hortic. Sci.,* 71, 257–263.

Jacxens, L., Devlieghere, F., ragaert, P., Vanneste, E., Debevere, J., 2003. Relation between microbiological quality, metabolite production and sensory quality of equilibrium modified atmosphere packaged fresh-cut produce. *Int. J. Food Microbiol.,* 83, 263–280.

Jacxsens, L., Devlieghere, F., Debevere, J., 1999. Validation of a systematic approach to design equilibrium modified atmosphere packages for fresh-cut produce. *LWT-Food Sci. Technol.,* 32, 425–432.

Jacxsens, L., Devlieghere, F., Debevere, J., 2002. Temperature dependence of shelf-life as affected by microbial proliferation and sensory quality of equilibrium modified atmosphere packaged fresh produce. *Postharvest Biol. Technol.,* 26, 59–73.

Jacxsens, L., Devlieghere, F., Ragaert, P., Vanneste, E., Debevere, J., 2003. Relation between microbiological quality, metabolite production and sensory quality of equilibrium modified atmosphere packaged fresh-cut produce. *Int. J. Food Microbiol.,* 83, 263–280.

Jenkins, J.M.J., 1959. Brown rib of lettuce. *Proc. Amer. Soc. Hortic. Sci.,* 74, 587–590.

Jenni S., de Koeyer D., Emery G., 2008. Rib discoloration in F2 populations of crisphead lettuce in relation to head maturity. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.,* 133, 249–254.

Jenni S., Yan W., 2009. Genotype by environment interactions of heat stress disorder resistance in crisphead lettuce. *Plant Breed. ,* 128, 374–380.

Jenni, S., 2005. Rib discoloration: a physiological disorder induced by heat stress in crisphead lettuce. *HortScience,* 40, 2031–2035.

Jiang, Y., Shina, T., Nakamura, N., Nakahara, A., 2001. Electrical conductivity evaluation of postharvest strawberry damage. *J. Food Sci.,* 66, 1392–1395.

Johnson, H., 2008. Soilless Culture of Greenhouse Vegetables. Vegetable Research and Information Center, Cooperative Extension, University of California, USA. URL cited May 2008. Available at: http://vric.ucdavis.edu/veginfo/topics/ hydroponics/hydroponics.pdf.

Joles, D.W., Cameron, A.C., Shirazi, A., Petracek, P.D., 1994. Modified-atmosphere packaging of 'Heritage' red raspberry fruit: respiratory response to reduced oxygen, enhanced carbon dioxide, and temperature. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.,* 119, 540–545.

Kader A.A., 2002a. Quality and safety factors: Definition and evaluation of fresh horticultural crops. En: Kader A.A. (Ed.), Postharvest Technology of Horticultural Crops, University of California, Agriculture and Natural Resources, pp. 279–285.

Kader A.A., 2002c. Standardization and inspection of fresh fruits and vegetables. En: Kader A.A. (Ed), Postharvest Technology of Horticultural Crops, University of California, Agriculture and Natural Resources, pp. 287–299.

Kader A.A., Cantwell M. 2010. Produce quality rating scales and color charts, second edition. Postharvest Horticulture Series #23, Postharvest Technology Center, University of California, Davis.

Kader A.A., Lipton W.J., Morris L., 1973. Systems for scoring quality of harvested lettuce. *HortScience,* 8, 408–409.

Kader, A.A., 2002b. Quality parameters of fresh-cut fruit and vegetable products. En: Lamikanra O. (ed.), Fresh-Cut Fruits and Vegetables: Science, Technology, and Market, CRC press, Florida, pp 12–19.

Kader, A.A., Cantwell, M., 2010. Produce quality rating scales and color charts, second edition. Postharvest Horticulture Series #23, Postharvest Technology Center, University of California, Davis, California, USA.

Kader, A.A., Lyons, J.M., Morris, L.L., 1974. Postharvest responses of vegetables to preharvest field temperature. *HortScience.* 9, 523–527.

Kader, A.A., Zagory, D., Kerbel, E.L., 1989. Modified atmosphere packaging on fruits and vegetables. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 42, 1542–1551.

Kang Y.J., Choi J.H., Jeong M.C., Kim D.M., 2008. Effect of maturity at harvest on the quality of head lettuce during storage. *Korean J. Hortic. Sci. Technol.,* 26, 272–276.

Kays S.J., 1999. Preharvest factors affecting appearance. *Postharvest Biol. Technol.,* 15, 233−247.

Ke, D., Saltveit, M.E., 1986. Effects of calcium and auxin on russet spotting and phenylalanine ammonia-lyase activity in iceberg lettuce. *HortScience.,* 21, 1169–1171.

Ke, D., Saltveit, M.E., 1989. Wound-induced ethylene production, phenolic metabolism and susceptibility to russet spotting in iceberg lettuce. *Physiol. Plant,* 76, 412–418.

Keles, Y., Öncel, I., 2002. Response of antioxidative defence system to temperature and water stress combinations in wheat seedlings. *Plant Sci.,* 163, 783–790.

Kerstiens, G., 1996. Plant Cuticles: An Integrated Functional Approach. BIOS Scientific, Oxford, UK. pp 212–234

Kiba, A., Sangawa, Y., Ohnishi, K., Yan, N., Park, P., Nakayashiki, H., Tosa, Y., Hikichi, Y., 2006. Induction of apoptotic cell death leads to the development of bacterial rot caused by Pseudomonas cichorii. *Biosci. Mol. Plant Micr. Inter.* 19, 112–122.

Kim, H.-J., Fonseca, J. M., Choi, J.-H., Kubota, C., Kwon, D. Y., 2008. Salt in irrigation water affects the nutritional and visual properties of romaine lettuce (*Lactuca sativa* L.). *J. Agric. Food Chem.,* 56, 3772–3776.

Kim, J.G., Luo, Y., Tao, Y., Saftner, R.A., Gross, K.C., 2005. Effect of initial oxygen concentration and film oxygen transmission rate on the quality of fresh-cut romaine lettuce. *J. Sci. Food Agric.* 85, 1622–1630.

Kondo, S., Masuda, E., Inoue, K., 1998. Relation between ABA application and fruit quality of "Pionnier grape (*Vitis sp*.). *Acta Hortic.,* 464, 35–40.

Korus, A., 2011. Level of vitamin C, polyphenols, and antioxidant and enzymatic activity in three varieties of kale (*Brassica oleracea* L. var acephala) at different stages of maturity. Intern. *J. Food Properties,* 14, 1069–1080.

Krahn, T.R., 1977. Improving the keeping quality of cut head lettuce. *Acta Hortic.* 62, 79–92.

Kramer, P.J., Boyer, J.S., 1995. Water relations of plants and soils. Academic Press, San Diego, CA.

Krizek, D. T., Britz, S. J., Mirecki, R. M., 1998. Inhibitory effects of ambient levels of solar UV-A and UV-B radiation on growth of cv. New Red Fire lettuce. *Physiol. Plant.,* 103, 1–7.

Lee S.K., Kader A.A., 2000. Preharvest and postharvest factors influencing vitamin C content of horticultural crops. *Postharvest Biol. Technol.,* 20, 207–220.

Lee, C.Y., 1990. Enzymatic browning in relation to phenolic-compounds and polyphenoloxidase activity among various peach cultivars. *J. Agric. Food Chem.,* 38, 99–101.

Lee, D.S., Song, Y., Yam, K.L., 1996. Application of an enzyme kinetics based respiration model to permeable system experiment of fresh produce. *J. Food Eng.,* 27, 297–310.

Lee, S.K., Kadel A.A., 2000. Preharvest and postharvest factors influencing vitamin C content of horticultural crops. *Posharvest Biol. Technol.,* 20, 207–220.

León, J., Rojo, E., Sánchez-Serrano, J.J., 2001. Wound signaling in plants. *J. Exp. Bot.,* 52, 1–9.

Lester, G.E., Makus, D.J., 2010. Relationship between fresh-packaged spinach leaves exposed to continuous light or dark and bioactive contents: effects of cultivar, leaf size, and storage duration. *J. Agric. Food Chem.* 58, 2980–2987.

Li Z., Zhao X., Sandhu A.K., Gu L., 2010. Effects of exogenous abscisic acid on yield, antioxidant capacities, and phytochemical contents of greenhouse grown lettuces. *J. Agric. Food Chem.,* 58, 6503–6509.

Li, F., Song, Q., Jjemba, P., Shi, Y., 2004. Dynamics of soil microbial biomass C and soil fertility in cropland mulched with plastic film in a semiarid agro-ecosystem. *Soil Biol. Biochem.,* 36, 1893–902.

Li, Q., Kubota, C., 2009. The influence of raw material characteristics on the storage life of fresh-cut butterhead lettuce. *Environ. Exp. Bot,.* 67, 59–64.

Lipton, W., 1987. Carbon-dioxide-induced injury of romaine lettuce stored in controlled atmospheres. *HortScience* 22, 461–463.

Liyama, K., Lam, T.B.T., Stone, B.A., 1994. Covalent Cross-links in the cell wall. *Plant Physiol.,* 104, 315–320.

Llorach, R., Martínez-Sánchez, A., Tomás-Barberán, F.A., Gil, M.I., Ferreres, F., 2008. Characterization of polyphenols and antioxidant properties of five lettuce varieties and escarole. *Food Chem.,* 108, 1028–1038.

Loewus, F.A., 1963. Tracer studies of ascorbic acid formation in plants. *Phytochemistry,* 2, 109–128.

López-Gálvez, F., 2009. Generalidades sobre los productos de IV Gama. En: Estrategias de lavado para mantener la calidad y garantizar la seguridad microbiológica de vegetales en IV Gama. Pp. 11.(Tesis)

López-Gálvez, F., Allende, A., Truchado, P., Martínez-Sánchez, A., Tudela, J.A., Selma, M.V., Gil, M.I., 2010. Suitability of aqueous chlorine dioxide vs sodium hypochlorite as an effective sanitizer preserving quality of fresh-cut lettuce while avoiding by-product formation. *Postharvest Biol. Technol.,* 55, 53–60.

López-Gálvez, G., Peise, G., Nie, X., Cantwell, M., 1997. Quality changes in packaged salad products during storage. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 205, 64–72.

Lopez-Galvez, G., Saltveit, M., Cantwell, M., 1996a. The visual quality of minimally processed lettuces stored in air or controlled atmospheres with emphasis on romaine and iceberg types. *Postharvest Biol. Technol.,* 8, 179–190.

Lopez-Galvez, G., Saltveit, M., Cantwell, M., 1996b. Wound-induced phenylalanine ammonia lyase activity: Factors affecting its induction and correlation with the quality of minimally processed lettuce. *Postharvest Biol. Technol.* 9, 223–233.

Ludford P.M., Isenberg F.M.R., 1987. Brassica crops. En: Weichmann J. (Ed.), Postharvest physiology of vegetables, Marcel Dekker, New York, pp. 497–522.

Luna, M.C., Tudela, J.A., Martínez-Sanchez, A., Allende, A., Gil, M.I., 2012. "Influencia del riego antes de la recolección en la calidad de la lechuga para IV Gama". En: Recasens, I., Graell, J., Echeverría, G. (Eds.), Avances en Poscosecha de Frutas y Hortalizas, Universidad de Lérida, pp. 277-281.

Luo S. Bok-choi., 2004. En: The commercial storage of fruits, vegetables, and florist and nursery stocks, Edited by Gross KC, Wang CY and Saltveit ME. USDA Agricultural Handbook 66. http://www.ba.ars.usda.gov/hb66/index.html (Accessed January 18, 2012).

Mahmoudi, H., Huang, J., Gruber, M.Y., Kaddour, R., Lachaal, M., Ouerghi, Z., hannoufa, A., 2012. The impact of genotype and salinity on physiological function, secondary metabolite accumulation and antioxidative responses in lettuce. *J. Agric. Food Chem.,* 58, 5122–5130.

Majan, P.V., Oliveira, F.A.R., Montanez, J.C., Frias, J., 2006. Development of userfriendly software for design of modified atmosphere packaging for fresh and fresh-cut produce. Innovat. *Food Sci. Emerg. Technol.* 8, 84–92.

Maroto, J.V., Gómez A.M., Soria C.B., 2000. La lechuga y la escarola. Edc. Mundi-prensa, Madrid.

Martínez, I., Area, G., Lema, P., 2008. Influence of cut and packaging film on sensory quality of fresh-cut butterhead lettuce (*Lactuca sativa* L., cv. Wang). *J. Food Quality,* 31, 48–66.

Martínez-Flóres, S., González-Gallego, J., Culebras, J. M., Muñón, M. J., 2002. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr. Hosp.,* 17, 271–278.

Martínez-Sánchez A., Allende A., Cortés-Galera Y., Gil M.I., 2008. Respiration rate response of four baby Brassica species to cutting at harvest and fresh-cut washing. *Postharvest Biol. Technol.,* 47, 382–388.

Martínez-Sánchez, A., Allende, A., Cortés-Galera, Y., Gil, M.I., 2008. Respiration rate response of four baby Brassica species to cutting at harvest and fresh-cut washing. *Postharvest Biol. Technol.* 47, 382–388.

Martínez-Sanchez, A., Gil-Izquierdo, A., Gil, M.I., Ferreres, F.A., 2008. A comparative study of flavonoid compounds, vitamin C and antioxidant properties of baby leaf "Brassicaceae species". *J. Agric. Food Chem.,* 56, 2330–2340.

Martínez-Sánchez, A., Marín, A., Llorach, R., Ferreres, F., Gil, M. I., 2006. Controlled atmosphere preserves quality and phytonutrients in wild rocket (*Diplotaxis tenuifolia*). *Posharvest Biol. Technol.,* 40, 26–33.

Martínez-Sanchez, Ascensión, 2008. Caracterización de compuestos bioactivos en cruciferas de uso en IV Gama: aspectos relacionados con la fisiología y tecnología postrecolección. Tesis.

Mateos, M., ke, D., Kader, A., Cantwell, M, 1993. Differencial responses of intact and minimally processed lettuce to high carbon dioxide atmospheres. *Acta Hortic.,* 343.

Mayer, A.M., Harel, E., 1991. Polyphenoloxidases and their significance in fruits an vegetables. En: Fox, P.F. (Ed.), Food Enzymology, Elsevier, London, pp. 373-379.

McDonald, R.E., Risse, L.A., Barmore, C.R., 1990. Bagging chopped lettuce in selected permeability films. *HortScience* 25, 671–673.

McEvvily, A.J., Iyengar, R., Gross, W.S., 1993. Compositions and methods for inhibiting browning in foods and beverages. U. S. Patent, 5, 202.141.

McKellar, R., C., Delaquis P., 2011. Development of a dynamic growth–death model for Escherichia coli O157:H7 in minimally processed leafy green vegetables. *Int. J. Food Microbiol.,* 151, 7–14.

McKellar, R.C., 2004. Influence of a commercial warm chlorinated water treatment and packaging on the shelf-life of ready-to-use lettuce. *Food Res. Int.,* 37, 343–354.

Medina, M.S, Tudela, J.A., Marín, A., Allende, A., Gil, M.I., 2012. Short postharvest storage under low relative humidity improves quality and shelf life of minimally processed baby spinach (*Spinach oleracea* L.). *Postharvest Biol. Technol.,* 67, 1–9.

Mencarelli F. Radicchio, 2004a. En: The commercial storage of fruits, vegetables, and florist and nursery stocks, Edited by Gross KC, Wang CY and Saltveit ME. USDA Agricultural Handbook 66. http://www.ba.ars.usda.gov/hb66/index.html (Accessed January 18, 2012).

Mencarelli F. Swiss chard, 2004b. En: The commercial storage of fruits, vegetables, and florist and nursery stocks, Edited by Gross KC, Wang CY and Saltveit ME. USDA Agricultural Handbook 66. http://www.ba.ars.usda.gov/hb66/index.html (Accessed January 18, 2012).

Mittler, R., 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* 7, 405–410.

Morales, M.A., Olmos, E., Torrecillas, A., Sánchez-Blanco, M.J., and Alarcón, J.J., 2001. Differences in water relations, leaf ion accumulation and excretion rates between cultivated and wild species of *Limonium sp.* grown in conditions of saline stress. *Flora,* 196, 345–352.

Murr, D.P., Morris, L.L., 1974. Influence of O_2 and CO_2 on *O*-diphenol oxidase activity in mushroom. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.,* 99, 155–158.

Namesny, A., 1993. La lechuga. En: Post-recolección de hortalizas. Ediciones de Horticultura, S.L. Reus, Pp.161-193.

Newman J.M., Hilton H.W., Clifford S.C., Smith A.C., 2005. The mechanical properties of lettuce: a comparison of some agronomic and postharvest effect. *J Mater. Sci,* 40, 1101–1104.

NGMC, New Guyana Marketing Corporation. Cabbage. Postharvest care and market preparation information sheet. National Agricultural Research Institute (NARI), 2004, http://www.newgmc.com/ (Accessed January 18, 2012).

Nguyen, T.B.T., Ketsa, S., Doorn V. W.G., 2003. Relationship between browning and the activities of polyphenol oxidase and phenylalanine ammonia-lyase in banana peel during low temperature storage. *Postharvest. Biol. Technol.,* 30, 187–193.

Nguyen-the, C., Carlin, F., 1994. The microbiology of minimally processed fresh fruits and vegetables. *Crit. Rev.Food Sci. Nutr.,* 34, 371–401.

Nicola S., Hoeberechts J., Fontana E., 2004. Rocket (*Eruca sativa Mill.*) and corn salad (Valerianella olitoria L.): production and shelf-life of two leafy vegetables grown in a soilless culture system. *Acta Hortic.,* 633, 509–516.

Nicola S., Hoeberechts J., Fontana E., 2007. Ebb-and- Flow and floating systems to grow leafy vegetables: A review for rocket, corn salad, garden cress and purslane. *Acta Hortic.* 747, 585–592.

Nicola S., Tibaldi G., Fontana E., 2009. Fresh-cut produce quality: implications for a systems approach. En: Florkowski W.J., Shewfelt R.L., Brueckner B., Prussia S.E. (Eds.), Postharvest Handling (Segunda edición), Systems Approach, Elsevier, New York, pp. 247–275.

Nicola, S., Hoeberechts, J., Fontana, E., 2005. Comparison between traditional and soilless culture systems to produce rocket (*Eruca sativa*) with low nitrate content. *Acta Hortic.* 697, 549–555.

Nicolas, J.J.; Richard-Forget, F.C.; Goupy, P.M.; Amiot, M.J.; Aubert, S.Y., 1994. Enzymatic browning reactions in apple and apple products. *Food Sci. Nutr.,* 34, 109–157.

Nicolle C., Carnat A., Fraisse D., Lamaison J.L., Rock E., Michel H., Amouroux P., Remesy R., 2004. Characterisation and variation of antioxidant micronutrients in lettuce (*Latuca sativa folium*). *J. Sci. Food Agric.,* 84, 2061–2069.

Noichinda, S., Bodhipadma, K., Mahamontri, C., Narongruk, T., Ketsa, S., 2007. Light during storage prevents loss of ascorbic acid, and increases glucose and fructose levels in Chinese kale (*Brassica oleracea* var. alboglabra). *Postharvest Biol. Technol.,* 44, 312–315.

Nou, X., Luo, Y., 2010. Whole-leaf wash improves chlorine efficacy for microbial reduction and prevents pathogen cross-contamination during fresh-cut lettuce processing. *J. Food Sci,.* 75, 283–290.

Oboh, G., Raddatz, H., Helen, T., 2008. Antioxidant properties of polar and non-polar extracts of some tropical green leafy vegetables. *J. Sci. Food Agric.,* 88, 2486−2492.

Oh, M. M., Trick, H.N., Rajashekar, C.B., 2009. Secondary metabolism and antioxidants are involved in environmental adaptation and stress tolerance in lettuce. *Plant Physiol.,* 166, 180–191.

Oh, M.M., Carey E.E., Rajashekar, C.B., 2010. Regulated water deficits improve phytochemical concentration in lettuce. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.,* 135, 223–229.

Olarte, C., Sanz, S., Echávarri, J.F., Ayala, F., 2009. Effect of plastic permeability and exposure to light during storage on the quality of minimally processed broccoli and cauliflower. *LWT: Food Sci. Technol.,* 42, 402–411.

Olfati J.A., Saadatian M., Peyvast G., Malakouti S.H., Kiani A., Poor-Abdollah M., 2011. Effect of harvesting date on yield and quality of lettuce. *Adv. Environ. Biol.,* 5, 1647–1650.

Ölmez, H., Yilmaz, A., 2010. Changes in chemical constituents and polyphenols oxidase activity of tea leaves with shoot maturity and cold storage. *J. Food Proc.,* 34, 653–665.

Pallanca, J.E., Smirnoff, N., 1999. Ascorbic acid metabolism in pea seedlings. A comparison of D-glucosone, L-sorbosone and L-galactono-1,4-lactone as ascorbate precursors. *Plant Physiol.,* 120, 453–461.

Pandjaitan, N., Howard, L.R., Morelock, T., Gil, M.I., 2005. Antioxidant capacity and phenolic content of spinach as affected by genetics and maturation. *J. Agric. Food Chem.* 53, 8618–8623.

Parr , A.J.; Bolwell, G.P., 2000. Phenols in the plant and in man. The potencial for possible nutricional enhancement of the diet by modifying in phenols content or profile. *J. Sci. Food Agric.,* 80, 985–1012.

Peiser, G., López-Gálvez, G., Cantwell, M., Saltveit, M.E., 1998. Phenylalanine ammonio-lyase inhibitors control browning of cut lettuce. *Postharvest Biol. Technol.* 14, 171–177.

Peña-Cortes, Fisahn, J., Willmitzer, L., 1995. Signals involved in wound-induced proteinase inhibitor II gene expression in tomato and potato plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 92, 4106–4113.

Pew, W.D., Gardner, B. R., Bessey, P. M., 1983. Comparison of controlled-release nitrogen fertilisers, urea and ammonium nitrate on yield and nitrogen uptake by fall-grown head lettuce. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.,* 108, 448–453.

Philippon, J., Maestre, J., 1993. El pardeamiento enzimático de las frutas y hortalizas. Mecanismos y métodos industriales de prevención. II Congreso internacional de Tecnología y desarrollo alimentarios, Murcia.

Philippoussis, A., Diamantopoulou, P., Zervakis, G., 2001. Calcium chloride irrigation influence on yield, calcium content, quality and shelf-life of the white mushroom. *J. Sci. Food Agric.* 81, 1447–1454.

Ponce A.G., Valle C.E., Roura S.I., 2004. Natural essential oils reducing agents of peroxidase activity in leafy vegetables. *Lebensm.- Wiss. U.- Technol.,* 37, 199–204.

Ponce, A.G., Agüera, M.V., Roura, S.I., Del Valle, C.E., Moreira, M.R., 2008. Dynamics of indigenous microbial populations of butter head lettuce grown in mulch and on bare soil. *J. Food Sci.,* 73, 257–263.

Poulsen, N., Johansen, A.S., Sorensen, J.N., 1995. Influence of growth on the value of crisphead lettuce. Quality changes during storage. *Plant Food Hum. Nutr.,* 47,157–162.

Prange, R.K., 2004. Chinese cabbage. En: The commercial storage of fruits, vegetables, and florist and nursery stocks, Edited by Gross KC, Wang CY and Saltveit ME. USDA Agricultural Handbook 66. http://www.ba.ars.usda.gov/hb66/index.html (Accessed January 18, 2012).

Reid, M.S., 2002. Maturation and maturity indices. En: Postharvest Technology of Horticultural Crops. Ed: Kader, A.A. University of California, Agriculture and Natural Resources, Davis, pp. 55–62.

Reifenrath, K., Müller, C., 2007. Species-specific and leaf-age dependent effects of ultraviolet radiation on two Brassicaceae. *Phytochemistry,* 68, 875–885.

Revilla, I., González-San José, M.L., 1997. Effect of exogenous indolacetic and abscisic acids on phenylalanine ammonia-lyase and tyrosine ammonia-lyase in strawberries (*Fragaria ananas*sa). *Agroch.,* 41, 20–26.

Rice, D.H., 1998. An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with leaf lettuce consumption. *J. Infect. Dis.* 177, 1588–1593.

Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Paganga, G., 1997. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trend Plant Sci.,* 2, 152–159.

Rice-Evans, C.A., Packer, L., 2003. Flavonoids in health and disease. En: Paker, L., Cadenas, E. (Eds.), Oxidative Stress and Disease, Marcel Dekker, New York, pp. 1-467.

Richard-Forget, F.C., Gauillard, F.A., 1997. Oxidation of chlorogenic acid, catechins, and e-methylcatechol in model solutions by combinations of pear (*Pyrus Communis* cv Williams) polyphenol oxidase and peroxidase-a possible involvement of peroxidase in enzymatic browning. *J. Agric. Food Chem.,* 45, 2472–2476.

Richard-Forget, F.C., Goupy, P.M., Nicolas, J.J., 1992. Cysteine as an inhibitor of enzymatic browning . Kinetic studies. *J. Agric. Food Chem.,* 40, 2108–2113.

Rico, D., Martín-Diana, A.B., Frías, J.M., Henehan, G.T.M., Barry-Ryan, C., 2006. Effect of ozone and calcium lactate treatments on browning and texture properties of fresh-cut lettuce. *J. Sci. Food Agric.* 86, 2179–2188.

Ride, J.P., 1983. Cell walls and other structural barriers in defence. En: Callow, J. A. (ed), Biochem. Plant Pathology. Wiley, New York, pp. 215–236.

Rijk Zwaan, 2009. Convenience catalogue. Vegetable Varieties for the Fresh Cut Industry. www.rijkzwaan.com/convenience (last access 19/04/2011).

Robards, K., Prenxler, P.D., Tucker, G., Swatsitang, P., Glover, W., 1999. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chem.,* 66, 401–436.

Robinson, D.S. (1991) Peroxidases and their significance in fruits and vegetables. En: Fox P.F. (Ed.), Food Enzymology, Elsevier, London, pp. 371–476.

Rodriguez-López, J.N., Espín, J.C., del Amor, F., Tudela, J., Martínez, V., Cerdá, A., García-Cánovas, F., 2000. Purification and kinetic characterization of an anionic peroxidase from melon (*Cucumis melo*. L.) cultivated under different salinity conditions. *J. Agric. Food Chem.* 48, 1537–1541.

Rogers G., Titley M., Giggins B., Bauer B., Poyton R., Kocks A., McAuliffe T., Le Budd J., 2006. Postharvest improvement in iceberg and cos lettuce to extent shelf life for fresh cut salads. Horticulture Australia. Applied Horticultural Research: Project Number: VX03092.

Rubatzky V., Saltveit M.E., 2004. Chicory. In: The commercial storage of fruits, vegetables, and florist and nursery stocks, Edited by Gross K.C., Wang C.Y., Saltveit M. USDA Agricultural Handbook 66. http://www.ba.ars.usda.gov/hb66/index.html (Accessed January 18, 2012).

Ryall A.L., Lipton W.J., 1979. Handling, transportation and storage of fruits and vegetables. Vol. 1 (segunda edición), En: Vegetables and Melons, Edited by AVI Pub. Co, Westport CT. ISBN 0-87055-115-9. Pp. 588

Ryder E.J., 1999. Physiology of germination, growth and development. En: Lettuce, Endive and Chicory. CABI Publishing, UK, pp 71.

Ryder, E.J., 2007. Production and value. En: Ryder, E.J. (Ed.), Lettuce, Endive and Chicory, CABI Publising, London,Cambridge, USA.

Saito, K., Nick, J.A., Loewus, F.A., 1990. D-Glucosone and L-sorbosone, putative intermediates of L-ascorbic acid biosynthesis in detached bean and spinach leaves. *Plant Physiol.,* 94, 1496–1500.

Saltveit M.E., 2004a. Endive and escarole. En: The commercial storage of fruits, vegetables, and florist and nursery stocks, Edited by Gross KC, Wang CY and

Saltveit ME. USDA Agricultural Handbook 66. http://www.ba.ars.usda.gov/hb66/index.html (Accessed January 18, 2012).

Saltveit M.E., 2004b. Lettuce. En: The commercial storage of fruits, vegetables, and florist and nursery stocks, Edited by Gross K.C., Wang C.Y. y Saltveit M.E. USDA Agricultural Handbook 66. http://www.ba.ars.usda.gov/hb66/index.html (Accessed January 18, 2012).

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

Saltveit, M.E., 2003. Fresh-cut vegetables. En: Bartz, J.A., Brecht, J.K. (Eds.), Postharvest Physiology and Pathology of Vegetables, Marcel Dekker Inc., New York, pp. 691–712.

Saltveit, M.E., Qin, L., 2008. Heating the ends of leaves cut during coring of whole heads of lettuce reduces subsequent phenolic accumulation and tissue browning. *Postharvest Biol. Technol.,* 47, 255–259.

Salunkhe, D.K., Bolin, H.R., Reddy, NR., 1991. Preharvest factors on postharvest yield and quality. En: Storage, Processing and Nutritional Quality of Fruits and Vegetables. CRC Press, Boca Ratón, Bostón, pp 7–44.

Salveit, M., 2004. Effect of 1-methylcyclopropene on phenylpropanoid metabolism, the accumulation of phenolic, and browning of whole and fresh-cut "iceberg" lettuce. *Postharvest Biol. Technol.,* 34, 75–80.

Sánchez, E., Soto, J.M., García, P.C., López-Lefebre, L.R., Rivero, R.M., Ruiz, J.M., Romero, L., 2000. Phenolic compounds and oxidative metabolism in green bean plants under nitrogen toxicity. *Austr. J. Plant Physiol.* 27, 973–978.

Sanz, S., Olarte, C., Ayala, F., Echávarri, J.F., 2008. The response to lighting of minimally processed chard: influence on its shelf life. *J. Sci. Food Agric.* 88, 1622–1631.

Sanz, S., Olarte, C., Ayala, F., Echávarri, J.F., 2009. Evolution of quality characteristics of minimally processed asparagus during storage in different lighting conditions. *J. Food Sci.,* 74, 296–302.

Sanz, S., Olarte, C., Echávarri, J.F., Ayala, F., 2007. Influence of exposure to light on the sensorial quality of minimally processed cauliflower. J. *Food Sci.,* 72, 12–18.

Sarma, A.D., Sreelakshmi, Y., Sharma, R., 1998. Differential expression and properties of phenylalanine ammonia-lyase isoforms in tomato leaves. *Phytochemistry,* 49, 2233–2243.

Savvas, D., Adamidis, K., 1999. Automated management of nutrient solutions based on target electrical conductivity, pH, and nutrient concentration ratios. *J. Plant Nutr.,* 22, 1415–1432.

Scaife, A., Cox, .F., Morris G.E.L., 1987. The relationship between shoot weight, plant density, and time during the propagation of four vegetable species. *Ann. Bot.,* 59, 325–334.

Scarponi, L., All, M.N., Martinetti, L., 1992. Metolachlor in corn (Zea mays) and soybean (Glycine max L.): biochemical signs of stress during its detoxification, *J. Agric. Food Chem.,* 40, 884–889.

Schonhof, I., Kläring, H.P., Krumbein, A., Clauben, Schreiner, M., 2006. Effect of temperature increase under low radiation conditions on phytochemicals and ascorbic acid in greenhouse grown broccoli. *Agric. Ecos. Environ.,* 119, 103–111.

Scuderi, D., Restuccia, C., Chisari, M., Barbagallo, R.N., Caggia, C., Giuffrida, F., 2011. Salinity of nutrient solution influences the shelf-life of fresh-cut lettuce grown in floating system. *Postharvest Biol. Technol.,* 59, 132–137.

Sedlárová, M., Luhová L., Petriválsky, M., Lebeda, A., 2007. Localisation and metabolism of reactive oxygen species during Bremia lactucae pathogenesis in *Lactuca sativa* and *wild Lactuca spp*. *Plant Physiol. Bioch.,* 45, 607–616.

Seo, M.W., Yang, D.S., Kays, S.J., Kim, J.H., Woo, J.H., Park, K.W., 2009. Effect of nutrient solution electrical conductivity and sulphur, magnesium, and phosphorus concentration on sesquiterpene lactones in hydroponically grown lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Sci. Hortic.,* 122, 369–374.

Sharma, M., Ingram, D.T., Patel, J.R., Millner, P.D., Wang, X., Hull, A.E., Donnenberg, M.S., 2009. A novel approach to investigate the uptake and internalization of

Escherichia coli O157:H7 in spinach cultivated in soil and hydroponic medium. *J. Food Prot.,* 72, 1513–1520.

Sharples, G.C.; Fabio S., Bessey P.M., 1963. Oxidase activity and discoloration in Great Lakes lettuce in relation to seasonal temperature. *Proc. Am. Soc. Hortic. Sci.,* 84, 356–363.

Shewfelt, R.L., 2009. Measuring quality and maturity. En: Florkowski, W.J., Shewfelt, R.L., Brueckner, B., Prussia, S.E. (Eds.), Postharvest Handling (Segunda edición), A systems approach, Elsevier, New York, pp. 461–477.

Shewfelt, R.L., 1990. Source of variation in the nutrient content of agricultural commodities from the farm to the consumer. *J. Food Quality,* 13, 37–54.

Simmonne, E., Simmonne, A., Wells, L., 2001. Nitrogen source affects crunchiness, but not lettuce yield. *J Plant Nutr.,* 24, 743–751.

Smirnoff, N., 2000. Ascorbate biosynthesis and function in photoprotección. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.,* 355, 1455–1464.

Smirnoff, N., 2011. Vitamin C: The metabolism and functions of ascorbic acid in plants. *Adv. Botan. Res.,* 59, 107–177.

Smirnoff, N., Wheeler, G.L., 2000. Ascorbid acid in plants: biosynthesis and function. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.,* 35, 291–314.

Smith, C.G., Rodgers, M.W., Zimmerlin, A., ferdinando, D., Bolwell, G.P., 1994. Tissue and subcellular inmunolocalisation of enzymes of lignin synthesis in differentiating and wounded hypocotyl tissue of French bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Planta,* 192, 155–164.

Smyth, A.B., Song, J., Cameron, A.C., 1998. Modified atmosphere packaged cut iceberg lettuce: effect of temperature and O_2 partial pressure on respiration and quality. *J. Agric. Food Chem.,* 46, 4556–4562.

Smyth, A.B., Sung, J., Cameron, A., 1998. Modified-atmosphere packaged cut iceberg lettuce: Effect of temperature and O2 partial pressure on respiration and quality. *J. Agric. Food Chem.,* 46, 4556–4562.

Sofo, A., Tuzio, A.C., Dichio, B., Xiloyannis, C., 2005. Influence of wáter déficit and rewatering on the components of the ascorbate-glutathione cycle in four interspecific Prunus hybrids. *Plant Sci.,* 169, 403–412.

Soil Survey Division Staff, 1993. Soil Survey Manual. Soil Conservation Service, U.S. Department of Agriculture Handbook 18. Available at: http://soils.usda.gov/technical/manual/.

Soundy, P., Cantliffe, D.J., Hochmuth, G.J., Sttofella, P.J., 2001. Nutrient requirements for lettuce transplants using a floatation irrigation system. I. Phosphorus. *HortScience,* 36, 1066–1070.

Spurr, A.R., 1969. A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. J. Ultrastruct. Res., 26, 31–43.

Stefanelli, D., Goodwin, I., Jones, R., 2010. Minimal nitrogen and water use in horticulture: Effects on quality and content of selected nutrients. *Food Res. Int.,* 43, 1833–1843.

Subramanian, N., venkatesh, P., Ganguli, S., Sinkar, V.P., 1999. Role of polyphenol oxidase and peroxidase in the generation of black tea theaflavins. *J. Agric. Food Chem.,* 47, 2571–2578.

Sun, H.Y., Liu, C.-M., Zhang, S.-X., Shen, Y.-J., Zhang, Y.Q., 2006. Effects of irrigation on water balance, yield and WUE o winter wheat in the North China Plain. *Agric. Water Manag.,* 85, 211–218.

Suslow, T., Cantwell, M., 2001. Spinach. Recommendations for Maintaining Postharvest Quality. http://postharvest.ucdavis.edu/pfvegetable/Radicchio/ (Accessed January 18, 2012).

Suslow, T.V., Oria, M.P., Beuchat, L.R., Garrett, E.H., Parish, M.E., Harris, L.J., Farber, J.N., Busta, F.F., 2003. Production practices as risks factors in microbial food safety of fresh and fresh-cut produce. En: Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, pp. 38–77 (Chapter II).

Sutton, B.G., Merit, N., 1993. Maintenance of lettuce root zone at field capacity gives best yields with drip irrigation. *Sci. Hortic*., 56, 1–11.

Tijskens, L.M.M., Koek, P.C., Van Der Meer, M.A., Schijvens, E.P.H.M., De Witte, Y., 1979. Quality changes in frozen Brussels sprouts during storage. II. Objective quality parameters: texture, colour, ascorbic acid content and microbiological growth. *J. Food Technol.,* 14, 301–313.

Tittonell, P., Grazia, J.D., Chiesa, A., 2001. Effect of nitrogen fertilization and plant population during growth on lettuce (*Lactuca sativa* L.) postharvest quality. *Acta Hortic.,* 553, 67–68.

Toivonen, P.M.A., Brumell, D., 2008. Biochemical bases of appearance and texture changes in fresh-cut fruit and vegetables. *Postharvest Biol. Technol.,* 48, 1–14.

Toledo, M.E., Ueda, Y., Imahori, Y., Ayaki, M., 2003. L-Ascorbic acid metabolism in spinach (*Spinacia oleracea* L.) during postharvest storage in light and dark. *Postharvest Biol. Technol.,* 28, 47–57.

Tomás-Barberán, F.A., Espín, J.C., 2001. Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruits and vegetables. *J. Sci. Food Agric.,* 81, 853–876.

Tomás-Barberán, F.A., Gil, M.I., Castañer, M., Artés, F., Saltveit, M.E., 1997a. Effect of selected browning inhibitors on phenolic metabolism in stem tissue of harvested lettuce. *J. Agric. Food Chem.,* 45, 583–589.

Tomás-Barberán, F.A., Loaiza-Velarde, J., Bonfanti, A., Saltveit, M.E., 1997b. Early wound- and ethylene-induced changes in phenylpropanoid metabolism in harvested lettuce. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.,* 122, 399–404.

Tsormpatsidis, E., Henbest R.G.C., Battey N.H., Hadley P., 2010. The influence of ultraviolet radiation on growth, photosynthesis and phenolic leves of green and red lettuce: potencial for exploiting effects of ultraviolet radiation in a production. *Ann. of Appl. Biol.,* 156, 357−366.

Udenigwe, C.C., Lu, Y.L., Han, C.H., Hou, W. ., Aluko, R. ., 2009. Flaxseed protein-derived peptide fractions: Antioxidant properties and inhibition of lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in murine macrophages. *Food Chem.,* 116, 277−284.

UNECE. Standards FFV 09, 22, 38, 44, 58, 2010. Concerning the marketing and commercial quality control of headed cabbages, lettuces, curled-leaved endives and broadleaved (batavian) endives, witloof chicory, Chinese cabbage and leafy vegetables. http://www.unece.org/trade/agr/standard/fresh/FFV-StandardsE.html/ (Accessed January 18, 2012).

UNESCO, 2012. Water consumption - sources and methods. http://www.worldometers.info/water/

USDA Textural Soil Classification, 1987. Soil Mechanics Level 1. Module 3. Study Guide. Soil Conservation Service, United State Department of Agriculture. Available at: http://www.wsi.nrcs.usda.gov/products/w2q/H&H/docs/training series modules/soil-USDA-textural-class.pdf.

Valente Pereira, F.M.; Rosa, F.M., Fahey, J.W., Stephenson, K.K., Carvalho, R., Aires, A., 2002. Influence of temperatura and ontogeny on the levels of glucosinolates in broccoli (*Brassica oleracea* var. italic) sprouts and their effect on the induction of mammaliam phase 2 enzymes. *J. Agric. Food Chem.,* 50, 6239–6244.

Vance, C.P., Krik, T.K., Sherwood, R.T., 1980. Lignification as a mechanism of disease resistance. *Ann. Rev. Phytopathol.,* 18, 259–288.

Vandekinderen, I., 2008. Impact of decontamination agents and a packaging delay on the respairation rate of fresh-cut produce. *Postharvest Biol. Technol.,* 49, 277–282.

Varoquaux, P., Varoquaux, F., Breuils, G., 1991. Browning potential of varios Cichorium endivia L. cultivars as a function of harvest time. *Lebensm. Wiss. u Technol.,* 24, 270–273.

Varoquaux, P., Wiley, R.C., 1994. Biological and biochemical changes in minimally processed refrigerated fruits and vegetables. En: Wiley, R.C. (Ed.), Minimally Processed Refrigerated Fruits & Vegetables.Chapman & Hall, London, pp. 226–258.

Victoria M.M., Whitaker, J.R., 1995. The biochemistry and control enzymatic browning. *Trends Food Sci. Tech.,* 6, 195–200.

Walker, J.R.L., 1997. Enzymic browning in food. Its chemistry and control. *Food Technol. N. Z,* 12, 19–25.

Wang, S.L., Cerkauskas, R.F. 1999. Recent development of production and processing of oriental vegetables in Canada. *Acta Hortic.,* 483, 429–436.

Watada, A.E., Ko, N. P., Minota, D.A., 1996. Factors affecting quality of fresh-cut horticultural products. *Postharvest Biol. Technol.,* 9, 115–125.

Watada, A.E., Qi, L.,1999. Quality of freh-cut produce. *Postharvest Biol. Technol.,* 15, 201–205.

Weston, L.A., Barth, M.M., 1997. Preharvest factors affecting postharvest quality of vegetables. *HortScience,* 32, 812–816.

Willocx, F., Hendrickx, M., Tobback, P. 1994. The influence of temperature and gas composition on the evolution of microbial and visual quality of minimally processed endive. En: Singh, R.P., Oliveira, F.A.R. (eds.), Minimal Processing of Foods and Process Optimization, CRC Press, Florida, pp.475–92.

with Escherichia coli O157:H7 and Salmonella enterica. Appl. Environ. Microbiol., 74, 2298–2306.

Wright, K.P., 2004. Salad greens. In: The commercial storage of fruits, vegetables, and florist and nursery stocks, Edited by Gross KC, Wang CY and Saltveit ME. USDA Agricultural Handbook 66. http://www.ba.ars.usda.gov/hb66/index.html (Accessed January 18, 2012).

Wu, Y., Perry, A.K., Klein, B.P., 1992. Vitamin C and β- carotene in fresh and frozen green beans and broccoli in a simulated system. *J. Food Quality.,* 15, 87–96.

Wurr, C.E., Fellows, J.R., Hiron, R.W.P., Antill, D.N., Hand, D.J., 1992. The development and evaluation of techniques to predict when to harvest iceberg lettuce heads. *J. Hortic. Sci.,* 67, 385–393.

Wurr, D.C.E., Fellows, J.R., Suckling, R.F., 1988. Crop continuity and prediction of maturity in the crisp lettuce variety Saladin. *J. Agric. Sci.,* 111, 481–486.

Wurr, D.C.E., Hambidge, A.J., Fellows, J.R., Lynn, J.R., Pink, D.A.C., 2002. The influence of water stress during crop growth on the postharvest quality of broccoli. *Postharvest Biol. Technol.,* 25, 193–198.

Yang X.F., Bie Z.L., Xu J.L., 2006. Effects of potassium supply on the growth, photosynthetic characteristics and quality of lettuce. *Acta Hortic.,* 761, 471–476.

Zagory, D., 1999. Effects of post-processing handling and packaging on microbial populations. *Postharvest Biol. Technol.,* 14, 313–321.

Zapata, S., Dufour, J.F., 1992. Ascorbic, dehydroascorbic and isoascorbic acid simultaneous determinations by reverse phase ion interaction HPLC. *J. Food Sci.,* 57, 506–511.

Zhan, L., Li Y., Hu, J., Pang, L., Fan, H., 2012. Browning inhibition and quality preservation of fresh-cut romaine lettuce exposed to high intensity light. Innov. Food Sci. Emeg. Tech., 14, 70–76.

Zhang, F, Li, Q., 2008. Effects of different storage temperatures on PAL, POD and PPO activity of wampee fruit. *Shipin Yu Fajiao Gongye,* 34, 69–71.

Zhang, F.Z., Wagstaff, C., Rae, A.M., Sihota, A.K., Keevil, C.W., Rothwell, S.D., Clarkson, G.J.J., Michelmore, R.W., Truco, M.J., Dixon, M.S., Taylor, G., 2007. QTL for shelf life in lettuce co-locate with those for leaf biophysical properties but not for leaf developmental traits. *J. Exp. Bot.,* 58, 1433–1449.

Zhao, X., Iwamoto, T., Carey, E., 2007. Antioxidant capacity of leafy vegetables as affected by high tunel environment, fertilisation and growth stage. *J. Sci. Food Agric.,* 87, 2692–2699.

Zhou, Y.H., Yu, J.Q., Huang, L.F., Nogues, S., 2004. The relationship between CO_2 assimilation, photosynthetic electron transport and water-water cycle in chill exposed cucumber leaves under low light and subsequent recovery. *Plant Cell Environ.,* 27, 1503–1514.

Zhou, Y.H., Zhang, Y. Y., Zhao, X., YU, H.J., Shi, K., Yu, J.Q., 2009. Impact of light variation on development of photoprotection, antioxidants, and nutritional value in Lactuca sativa L. *J. Agric. Food Chem.,* 57, 5494–5500.

Zhuang, H., Margaret, B.M., Fan, X., 2001. Respirations and browning discoloration of fresh-cut produce in modified atmosphere atmosphere packaging. En: Brody, A.L., Zhuang H, Han, J.H. (Eds.), Modified Atmosphere Packaging for Fresh-Cut Fruits and Vegetables, Wiley-Blackwell, Oxford, pp. 31–47.