



UNIVERSIDAD DE MURCIA

FACULTAD DE BIOLOGÍA

**Estrategias de Intervención en Precosecha y
Postcosecha para Mejorar la Calidad y Prolongar la
Vida Útil de 'Hojas Jóvenes' en IV Gama.**

D^a Yolanda Esperanza Garrido Hernández
2016



D^a. M^a Isabel Gil Muñoz, Profesora de Investigación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) en el Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS) de Murcia y profesora del programa de Doctorado en Biología Vegetal de la Universidad de Murcia,

Autoriza:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada “ESTRATEGIAS DE INTERVENCIÓN EN PRECOSECHA Y POSTCOSECHA PARA MEJORAR LA CALIDAD Y PROLONGAR LA VIDA ÚTIL DE ‘HOJAS JÓVENES’ EN IV GAMA” realizada por D^a. Yolanda Esperanza Garrido Hernández, bajo mi dirección y supervisión en el departamento de Ciencia y Tecnología de los Alimentos del Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 2 de Junio de 2016.

Dra. M^a Isabel Gil Muñoz

La presente tesis doctoral es un compendio de los siguientes trabajos publicados:

- **Garrido, Y.**, Tudela, J. A., Marín, A., Mestre, T., Martínez, V., Gil, M. I., 2014. Physiological, phytochemical and structural changes of multi-leaf lettuce caused by salt stress. *J. Sci. Food Agric.* 94, 1592-1599.
- **Garrido, Y.**, Tudela, J. A., Gil, M. I., 2015. Time of day for harvest and delay before processing affect the quality of minimally processed baby spinach. *Postharvest Biol. Technol.* 110, 9-17.
- **Garrido, Y.**, Tudela, J. A., Gil, M. I., 2015. Comparison of industrial precooling systems for minimally processed baby spinach. *Postharvest Biol. Technol.* 102, 1-8.
- **Garrido, Y.**, Tudela, J. A., Hernández, J. A., Gil, M. I., 2016. Modified atmosphere generated during storage under light conditions is the main factor responsible for the quality changes of baby spinach. *Postharvest Biol. Technol.* 114, 45-53.

La autora de la presente memoria ha disfrutado de una beca de “Formación de Personal Investigador (FPI)” (BES-2011-044616) del Ministerio de Economía y Competitividad.

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

- MINECO AGL2010-20070 “Estrategias de intervención en precosecha y postcosecha para mejorar la calidad y prolongar la vida útil de hojas jóvenes en IV Gama”.
- MINECO AGL2013-48529-R “Biomarcadores de calidad y seguridad de hortalizas de hoja”.
- FP7-KBBE-2009-2-5-0 (project VEG-i-TRADE). Impact of climate change and globalization on safety of fresh produce governing a supply chain of uncompromised food sovereignty

Asimismo se agradece la inestimable ayuda y colaboración de la empresa Primaflor S.A.T. responsable del manejo del cultivo, que ha proporcionado el material vegetal y ha puesto a disposición sus instalaciones, personal y equipos necesarios para llevarse con éxito parte de la experimentación estos trabajos.

Tienes la fuerza, no pierdas la ilusión.

(Mensaje de ida y vuelta entre hermanas gemelas)

*A mis padres, mis grandes mecenas,
quienes siempre han apostado por mi educación*

*A Fernando y nuestro pequeño Álvaro,
mi pensamiento alegre*

Echando la vista atrás descubro que son muchas las personas que me han ayudado a alcanzar esta etapa de mi formación y para ellos van dirigidas estas líneas.

En estos últimos cinco años de trabajo he abordado un proyecto no sólo científico sino también personal. Porque como para tantos doctorandos ha supuesto un esfuerzo más allá de lo laboral, y que ha implicado tanto a mi grupo de trabajo como a mis seres queridos.

Alcanzar esta meta no habría sido posible sin el apoyo y colaboración de mi gran grupo de trabajo, el Grupo de Calidad, Seguridad y Bioactividad de Alimentos Vegetales (CEBAS, CSIC). Todos han participado en mayor o menor medida en la realización de estas publicaciones. Quiero darles las gracias por su profesionalidad, su trabajo en equipo, por echar una mano siempre que ha hecho falta y también por su cariño y compañía durante este tiempo.

La base de todos estos trabajos comienza por el equipo técnico, profesionales de los que he aprendido más de lo que se enseña en las aulas, y que han sido mis grandes compañeros de batalla en la toma de datos: Nathalie, Laura, Paco, Emilia, Joaquín, Silvia y Macarena. Muy especialmente quiero mostrar mi agradecimiento a Nathalie, por su especial implicación en estos trabajos, por su tiempo, su esfuerzo, sus desvelos, su apoyo y su amistad.

A Juan Antonio, por tener siempre su puerta abierta para mis dudas y demandas, por su paciencia, su guía e implicación en todos y cada uno de los trabajos realizados.

A Alicia y Luna por su colaboración y paciencia, sobre todo al inicio de esta tesis donde todo eran dudas y preguntas; y a David, por facilitarme todo lo necesario y responder con infinita paciencia.

Mi agradecimiento especial a Irene y a Carlos, por arrimar el hombro, por ser mis compañeros y amigos, por llenar de luz y risas mi tiempo en el CEBAS.

A Ana, Pachi, Huertas, Paco, Antonio Pérez, Rocío, M^a Ángeles, María, Victoria, Federico, Fernando Vallejo, Antonio González y José Enrique, por sus cuidados, su cariño y su compañía.

A los compañeros pertenecientes a otros grupos del CEBAS, por aportar sus conocimientos, instalaciones y equipos, contribuyendo así a la realización de estos trabajos: Vicente Martínez, Teresa Mestre, Paco García, Félix Plasencia, Pepe Hernández, Pedro Díaz y Jose Ramón Rodríguez.

Dejo para el final a aquellas personas que merecen el mayor reconocimiento por mi parte, tanto en lo profesional como en lo personal.

A Mabel, no sólo por su reconocido valor científico sino también por su valor humano. Por ser capaz de guiarme con mano firme y a la vez con cariño e infinita paciencia. Por ser líder, guía, maestra y compañera de todas y cada una de las etapas de realización de estos trabajos, y por sus grandes esfuerzos en crear y mantener este gran grupo del que he formado parte.

A mi gran y hermosa familia, mi gran regalo en la vida, por ser mis raíces, por darme la seguridad y estabilidad que me sostiene en todo momento.

En especial a mi hermana Mónica, mi compañera y mi mejor amiga desde ante de que llegáramos al mundo.

A mis padres, Paco y Reme, mis grandes mecenas, para los que mi educación siempre ha sido lo más importante, incluso en aquellos momentos en los que apostar por ella les supuso grandes sacrificios y desvelos.

A Fernando, mi gran amor, mi mejor amigo, mi compañero dentro y fuera de los despachos, desde siempre y para siempre. Y a nuestro pequeño Álvaro, por llenar de luz, ternura e ilusión el final de esta etapa y todas las que me quedan por vivir.



**Estrategias de Intervención en Precosecha
y Postcosecha para Mejorar la Calidad y
Prolongar la Vida Útil de ‘Hojas Jóvenes’
en IV Gama**

Trabajo Realizado para Optar al Título de Doctor por
la Universidad de Murcia

Yolanda E. Garrido Hernández

2016

ÍNDICE GENERAL

Resumen	i
Listado de abreviaturas y símbolos.	vii
Listado de figuras y tablas.	xv
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN GENERAL.	1
1. Productos IV Gama.	3
2. ‘Hojas jóvenes’ en IV Gama.	6
2.1 Especificaciones de calidad de ‘hojas jóvenes’ para IV Gama.	8
2.2 Lechuga ‘multi’ y lechuga ‘baby’.	9
2.3 Espinaca ‘baby’.	11
3. Producción y procesado de ‘hojas jóvenes’ para IV Gama.	12
3.1 Cultivo y recolección.	12
3.2 Pre-enfriamiento.	12
3.3 Procesado para IV Gama.	16
4. Causas de pérdida de calidad en ‘hojas jóvenes’ para IV Gama.	20
5. Factores precosecha que afectan a la calidad de ‘hojas jóvenes’ para IV Gama.	22
5.1 Factores genéticos.	22
5.2 Estado de maduración.	22
5.3 Factores climáticos.	23
5.4 Factores agronómicos.	25
5.4.1 Sistemas de cultivo: cultivo con suelo y sin suelo.	25
5.4.2 Nutrición del cultivo.	26
5.4.3 Manejo del riego y salinidad del agua de riego.	27
5.4.4 Momento del día para la recolección.	29
6. Factores postcosecha que afectan a la calidad de ‘hojas jóvenes’ para IV Gama.	31
6.1 Técnicas de pre-enfriamiento.	31

6.2	Manejo del producto desde la cosecha hasta su distribución y venta.	32
6.3	Condiciones de temperatura y humedad relativa durante la conservación.	33
6.4	Atmósfera de conservación.	35
6.5	Condiciones de iluminación durante la conservación.	37
CAPÍTULO II: OBJETIVOS.		39
CAPÍTULO III: METODOLOGÍA.		43
CAPÍTULO IV: CAMBIOS EN LA FISIOLOGÍA, COMPOSICIÓN FITOQUÍMICA Y ESTRUCTURA DE LECHUGA ‘MULTI’ CAUSADOS POR ESTRÉS SALINO.		67
CAPÍTULO V: INFLUENCIA DEL MOMENTO DEL DÍA PARA LA RECOLECCIÓN Y LA DEMORA HASTA EL PROCESADO EN LA CALIDAD DE ESPINACA ‘BABY’ MÍNIMAMENTE PROCESADA.		77
CAPÍTULO VI: COMPARACIÓN DE SISTEMAS DE PRE-ENFRIAMIENTO DE USO INDUSTRIAL PARA ESPINACA ‘BABY’ MÍNIMAMENTE PROCESADA.		91
CAPÍTULO VII: FACTORES RESPONSABLES DE LOS CAMBIOS EN CALIDAD DE ESPINACA ‘BABY’ DURANTE LA CONSERVACIÓN BAJO DISTINTAS CONDICIONES DE ILUMINACIÓN.		101
CAPÍTULO VIII: DISCUSIÓN GENERAL.		113
1.	Influencia del estrés salino en la calidad de lechuga ‘multi’ como materia prima y posibles implicaciones en la procesabilidad.	115
2.	Efecto del momento del día de recolección y la demora hasta el procesado en la calidad de espinaca ‘baby’ mínimamente procesada.	119
3.	Efecto de distintos sistemas de enfriado de uso industrial en la calidad de espinaca ‘baby’ mínimamente procesada.	123
4.	Influencia de la exposición en distintas condiciones de luz y de atmósfera durante la vida útil de espinaca ‘baby’ mínimamente procesada.	127
CAPÍTULO IX: CONCLUSIONES		133
BIBLIOGRAFÍA		139

RESUMEN

Los nuevos hábitos de consumo y la mayor preocupación por una alimentación sana y saludable han impulsado el lanzamiento a nivel mundial de las ensaladas de ‘hojas jóvenes’, como una combinación de hojas de variedades seleccionadas por su pequeño tamaño, de textura tierna, apariencia exótica y que suponen una fuente natural de constituyentes beneficiosos para la salud. A pesar de ser considerados productos de alto valor añadido, no satisfacen las expectativas del mercado por ser un producto muy perecedero y problemático. La investigación descrita en esta tesis tiene como objetivo profundizar en el conocimiento de algunas de las causas de falta de calidad de las ensaladas de ‘hojas jóvenes’. Entre los factores precosecha analizados por su implicación en la vida útil se incluyen la influencia de condiciones de estrés como la salinidad en el agua de riego (**Capítulo IV**) y la influencia del momento del día en la que se produce la cosecha (**Capítulo V**). Entre los factores postcosecha relacionados con las causas de deterioro durante la vida útil analizados en estos trabajos se incluyen el acondicionamiento de la materia prima, con el estudio de distintos tiempos de demora entre la cosecha y el procesado (**Capítulo V**) así como el estudio del efecto de distintos sistemas de pre-enfriamiento de la materia prima antes del procesado (**Capítulo VI**). Además, también se ha prestado especial atención a las condiciones de atmósfera e iluminación durante la conservación del producto envasado (**Capítulo VII**). En estos trabajos se han estudiado los mecanismos de acción con una investigación básica relacionada con la biología de la hoja mediante el análisis de parámetros relacionados con su fisiología, histología, bioquímica y microbiología, así como su efecto en la calidad sensorial y nutricional del producto envasado, junto con elementos más tecnológicos y de aplicación industrial como la comparación de los sistemas de enfriamiento y el estudio de distintas atmósferas modificadas en el envasado.

El efecto del estrés salino ha sido analizado en lechuga ‘multi’ dado su potencial como modelo para estudios de crecimiento en condiciones controladas (**Capítulo IV**), mientras que la influencia del resto de factores se ha analizado en espinaca ‘baby’ con el objetivo de profundizar en el conocimiento de unos de los alimentos más innovadores y demandados de la IV Gama (**Capítulo V- VII**).

En el **Capítulo IV** se ha estudiado el cultivo de lechugas ‘multi’ con distintas condiciones salinas cultivadas en sistema sin suelo y su influencia en la fisiología y calidad del producto. La salinidad produjo cambios estructurales en las hojas que pueden estar relacionados con una mayor resistencia física de la hoja, con el incremento en concentración de solutos, la elasticidad de la hoja y la compactación de sus tejidos. El estrés salino también aumentó el contenido en compuestos fenólicos aunque afectó negativamente a la calidad visual de la hoja y al rendimiento.

En el **Capítulo V** se ha evaluado en espinaca ‘baby’ la influencia de distintas horas del día de recolección así como distintos períodos de retraso hasta el procesado en la calidad del producto procesado. En base a los resultados obtenidos, en invierno las hojas de espinaca ‘baby’ podrían ser cosechadas en cualquier momento del día sin afectar la calidad del producto procesado. Sin embargo, en primavera los resultados obtenidos mostraron que a primera hora de la mañana es la mejor hora del día para su recolección. La cosecha de primera hora del día presentó un mayor contenido en agua y firmeza y mejor calidad visual a lo largo de toda la conservación del producto procesado. Además, los resultados mostraron que las hojas de espinaca ‘baby’ pueden tolerar un retraso hasta su procesado de al menos 48 horas sin presentar síntomas evidentes de pérdida de calidad.

En el **Capítulo VI** se evaluó el efecto en espinaca ‘baby’ de distintos sistemas de pre-enfriamiento de uso industrial. La etapa de pre-enfriamiento tuvo una mayor

influencia en la mejora de la calidad del producto en la cosecha de primavera que en la de invierno. Los sistemas de pre-enfriamiento por vacío y por ducha con agua fría mejoraron la viveza del color y la hidratación de las hojas, destacando como sistemas más eficaces comparados con el enfriamiento en cámara convencional y por aire forzado. Sin embargo, el enfriamiento por vacío redujo la calidad visual de las hojas debido a un aumento de su fragilidad.

En el **Capítulo VII** se ha analizado el efecto de diferentes exposiciones a la luz durante la conservación de espinaca ‘baby’ tanto bajo condiciones de atmósfera modificada (MAP) como de atmósfera controlada (AC). Los resultados muestran que el producto conservado en MAP en oscuridad alcanza en el interior del envase altos niveles de CO₂, mientras que en luz se alcanzan altos niveles de O₂ debido al balance entre los procesos fotosintéticos y respiratorios. La exposición a distintas condiciones de luz no afectó a ninguno de los parámetros evaluados en el producto procesado conservado en AC. Los resultados muestran que los cambios observados se deben principalmente al efecto de la atmósfera de conservación y no al efecto directo de la exposición a la luz. Altos niveles de O₂ promovieron un daño oxidativo de las hojas y el crecimiento bacteriano, mientras que altos niveles de CO₂ aumentaron el pH de producto y ocasionó daños en el tejido, por lo que se recomiendan niveles intermedios de O₂ y CO₂ durante la conservación de brotes de espinaca.

Los resultados generales obtenidos en esta tesis han permitido profundizar en el conocimiento de la fisiología y tecnología postcosecha desde la pre-cosecha a la postcosecha, con especial interés en las fases de recolección, acondicionamiento tras la recolección y procesado de ‘hojas jóvenes’ para IV Gama.

Listado de Abreviaturas y Símbolos

AC	Atmósfera Controlada
AFHORLA	Asociación Española de Fabricantes de Frutas y Hortalizas Lavadas Listas para su Empleo
ANOVA	Análisis de la varianza
B ⁺³	Ión boro
BPW	Agua de peptona tamponada (Buffered Peptone Water)
°C	Grado Celsius
CA	Atmósfera controlada (Controlled Atmosphere)
CA*	Contenido en agua
Ca ²⁺	Ión calcio
CFU	Unidades formadoras de colonias (Colony Forming Units)
cm	Centímetro
CO ₂	Dióxido de carbono
CRA	Contenido relativo en agua
Cu ²⁺	Ión cobre
DAD	Detector de diodo array (Diode Array Detector)
DM	Peso seco (Dry Mass)
DPV	Déficit de presión de vapor
DW	Peso seco (Dry Weight)
E _c	Evapotranspiración del cultivo
EAM	Envasado en atmósfera modificada
ESI	Ionización por electrospray
Fe ²⁺	Ión hierro
FEPEX	Federación Española de Asociaciones de Productores Exportadores de Frutas, Hortalizas, Flores y Plantas Vivas

FDA	Administración de Drogas y Alimentos (Food and Drug Administration)
Fv/Fm	Rendimiento cuántico máximo del fotosistema II (Fluorescencia variable máxima/ Fluorescencia máxima)
FM	Peso fresco (Fresh Mass)
FW	Peso fresco (Fresh Weight)
g	Gramo
h	Hora
H ₂ O	Agua
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia (High-Performance Liquid Chromatography)
HPLC-MS-MS	Cromatografía líquida de alta eficacia acoplada a un detector de masas en serie
HR	Humedad relativa
HSD	Diferencia significativa honesta (Honestly Significant Difference)
IFPA	Asociación Internacional de Productores de Vegetales Frescos Cortados (International Fresh-cut Produce Association)
°K	Grado Kelvin
K ⁺	Ión potasio
kg	Kilogramo
km	Kilómetro
kPa	Kilopascal
kW	Kilovatio
L	Litro

LSD	Diferencia significativa mínima (Least Significant Differences)
log	Logaritmo
m	Metro
M	Molar
MA	Atmósfera modificada (Modified Atmosphere)
mbar	Milibar
Mg ⁺²	Ión magnesio
MAGRAMA	Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente
MAP	Envasado en atmósfera modificada (Modified Atmosphere Packaging)
MDA	Malondialdehído
MICINN	Ministerio de Ciencia e Innovación
MINECO	Ministerio de Economía y Competitividad
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
mmol	Milimol
Mn ²⁺	Ión manganeso
Mo ⁶⁺	Ión molibdeno
Mpx	Megapíxel
MS	Detector de masas
M€	Millón de euros
µm	Micrómetro
µmol	Micromol

na	No analizado
ns	No significativo
N ₂	Nitrógeno molecular
NaCl	Cloruro de sodio
NaF	Fluoruro de sodio
NaOCl	Hipoclorito de sodio
NFT	Técnica de cultivo hidropónico NFT (Nutrient Film Technique)
NGS	Técnica de cultivo hidropónico NGS (New Growing System)
NH ₄ ⁺	Ión amonio
nm	Nanómetro
nmol	Nanomol
NO ₃ ⁻	Ión nitrato
O ₂	Oxígeno molecular
Osm	Osmol
P	Nivel de significancia
Pa	Pascal
PAR	Radiación fotosintéticamente activa (Photosynthetically Active Radiation)
PCA	Agar de recuento en placa (Plate Count Agar)
PCD	Muerte celular programada (Programmed Cell Death)
pCO ₂	Presión parcial de dióxido de carbono
PF	Peso fresco
pH	Potencial de hidrógeno
PMA	Asociación de Comercializadores de Productos Frescos (Produce Marketing Association)

pO_2	Presión parcial de oxígeno
PO_4^{2-}	Ión fosfato
PP	Polipropileno
ppm	Partes por millón
PS	Peso seco
PSII	Fotosistema II
PT	Peso a máxima turgencia
%	Porcentaje
RH	Humedad relativa (Relative Humidity)
rpm	Revoluciones por minuto
RWC	Contenido relativo en agua (Relative Water Content)
s	Segundo
SO_4^{2-}	Ión sulfato
spp.	Especies
t	Tonelada
TBA	Ácido tiobarbitúrico (Thiobarbituric Acid)
TCA	Ácido tricloroacético (Trichloroacetic Acid)
3-D	Tridimensional
UFC	Unidades formadoras de colonias
UNECE	Comisión Económica de las Naciones Unidas para Europa (United Nations Economic Commission for Europe)
UV	Ultravioleta
v/v	Relación volumen/volumen
VPD	Déficit de presión de vapor (Vapor Pressure Deficit)
W	Vatio

WC	Contenido en agua (Water Content)
x	Por
x g	Gravedad
Y(II)	Rendimiento cuántico efectivo del fotosistema II
Y(NO)	Rendimiento cuántico de la disipación de la energía no regulada del fotosistema II
Y(NPQ)	Rendimiento cuántico de la disipación de la energía regulada del fotosistema II
Zn ²⁺	Ión zinc

Listado de Figuras y Tablas

CAPÍTULOS I-III

Figura 1. Esquema de los principales sistemas de pre-enfriamiento para hortalizas de hojas para IV Gama.

Figura 2. Esquema de la línea de procesado para ‘hojas jóvenes’ en IV Gama.

Figura 3. Esquema del procesado, envasado y conservación del material vegetal en las instalaciones de CEBAS-CSIC.

Figura 4. Esquema de la zona de toma de muestras en las hojas para la determinación de extensibilidad de la pared celular y análisis histológicos.

Fotografía 1. Lechugas tipo ‘multi’ y ‘tipo ‘baby’ (Rijk Zwaan, 2016c).

Fotografía 2. Espinaca tipo ‘baby’ (Rijk Zwaan, 2016b).

Fotografía 3. Síntomas de pérdida de calidad en ‘hojas jóvenes’ para IV Gama.

Fotografía 4. Toma de muestras para la determinación del contenido relativo en agua (CRA) de las hojas.

Fotografía 5. Fragmentos de hojas fijados para su posterior análisis histológico.

Fotografía 6. Imagen captada al microscopio óptico (a) y reconocimiento celular dentro del área de estudio mediante análisis de imagen (b).

Fotografía 7. Imágenes captadas al microscopio óptico de células intactas y células con síntomas de daño celular.

Fotografía 8. Toma de muestras para la determinación de pérdida de electrolitos de las hojas.

Tabla 1. Principales fabricantes y comercializadoras de IV Gama.

Tabla 2. Índices de madurez para hojas tipo ‘baby’ para IV Gama

CAPÍTULO IV

Figure 1. Plant growth characteristics (A), fresh weight per plant (B), fresh weight per leaf (C), number of leaves per plant (D) and leaf area (E) of lettuce cultivated with 50, 100 and 150 mmol L⁻¹ NaCl (S1, S2 and S3 respectively) compared with control plants (Ct). Bars are mean ± standard error of 11, ten, 11 and 15 replicates for fresh weight per plant, fresh weight per leaf, number of leaves per plant and leaf area respectively. Bars with different letters are significantly different ($P < 0.05$) according to Tukey's HSD test; ns, not significant.

Figure 2. Changes in leafwater content (A), osmotic potential (B), elasticity (% reversible extension per 10 g load) (C) and plasticity (% irreversible extension per 10 g load) (D) of lettuce cultivated with 50, 100 and 150 mmol L⁻¹ NaCl (S1, S2 and S3 respectively) compared with control plants (Ct). Bars are mean ± standard error of three, three, ten and ten replicates for water content, osmotic potential, elasticity and plasticity respectively. Bars with different letters are significantly different ($P < 0.05$) according to Tukey's HSD test; ns, not significant.

Figure 3. Changes in colour saturation (A), chlorophyll *a* (B), chlorophyll *b* (C), total phenolic compounds (D), total phenolic acids (E) and total flavonols (F) of lettuce cultivated with 50, 100 and 150 mmol L⁻¹ NaCl (S1, S2 and S3 respectively) compared with control plants (Ct). Bars are mean ± standard error of 15 replicates for colour saturation and three replicates for all other parameters. Bars with different letters are significantly different ($P < 0.05$) according to Tukey's HSD test.

Figure 4. Changes in leaf thickness (A), area of epidermal cells (B), area of parenchyma cells (C) and total area occupied by epidermis (D), parenchyma (E) and intercellular spaces (F) in leaf sections of lettuce cultivated with 50, 100 and 150 mmol

L^{-1} NaCl (S1, S2 and S3 respectively) compared with control plants (Ct). Bars are mean \pm standard error of at least 70, 300, 1000 and 20 replicates for leaf thickness, area of epidermal cells, area of parenchyma cells and total area occupied by epidermis, parenchyma and intercellular spaces respectively. Bars with different letters are significantly different ($P < 0.05$) according to Tukey's HSD test; ns, not significant.

Figure 5. Images captured by optical microscope (A–H) and electron microscope (I–L) of lettuce leaves cultivated under control conditions (A, E, I) and salt conditions of 50 mmol L^{-1} NaCl (B, F, J), 100 mmol L^{-1} NaCl (C, G, K) and 150 mmol L^{-1} NaCl (D, H, L): ue, upper epidermis; le, lower epidermis; pp, palisade parenchyma; sp, spongy parenchyma; ie, intercellular spaces; cw, cell wall; pm, plasma membrane; c, chloroplast.

Table 1. Changes in area of upper epidermal cell, lower epidermal cell, palisade parenchyma cell and spongy parenchyma cell in leaf sections of lettuce cultivated with 50, 100 and 150 mmol L^{-1} NaCl (treatments S1, S2 and S3 respectively) compared with control plants (Ct)

Table 2. Changes in area occupied by upper epidermis, lower epidermis, palisade parenchyma, spongy parenchyma and intercellular spaces in leaf sections of plants treated with 50, 100 and 150 mmol L^{-1} NaCl (treatments S1, S2 and S3 respectively) compared with control plants (Ct).

CAPÍTULO V

Figure 1. Climatic data of radiation, temperature and vapor pressure deficit (VPD) over the 24 h period corresponding to harvest day in both experiments. H1, H2 and H3 corresponded with the time of harvest at 08:30, 13:00 and 17:30 h, respectively.

Figure 2. Relative water content of baby spinach leaves harvested in winter (A) and in spring (B) at 8:30 h (H1), 13:00 h (H2) and 17:30 h (H3) with a delay before processing of 24 h (DP24) and 48 h (DP48) in winter before processing and 3 h (DP3), 24 h (DP24) and 48 h (DP48) in spring before processing and after storage (3 days at 4 °C plus 6 days at 7 °C). Bars are the mean \pm standard deviation of 15 replicates.

Figure 3. Changes in color saturation (Chroma) of baby spinach harvested in spring at 8:30 h (H1), 13:00 h (H2) and 17:30 h (H3) with a delay before processing of 3 h (DP3), 24 h (DP24) and 48 h (DP48) before processing and after storage (3 days at 4 °C plus 6 days at 7 °C). Bars are the mean \pm standard deviation of 15 replicates.

Figure 4. Respiration rate of minimally processed baby spinach harvested in spring at 8:30 h (H1), 13:00 h (H2) and 17:30 h (H3) with a delay before processing of 3 h (DP3), 24 h (DP24) a 48 h (DP48) and stored for 13 days at 7 °C. Bars are the mean \pm standard deviation of 3 packages.

Figure 5. Changes in visual quality of minimally processed baby spinach harvested in spring at 8:30 h (H1), 13:00 h (H2) or 17:30 h (H3), processed with a delay of 3 h (DP3), 24 h (DP24) and 48 h (DP48) and stored for 3 days at 4 °C plus 6 days at 7 °C. Bars are the mean \pm standard deviation of 5 replicates. Dash line represents the limit of marketability.

Table 1 Climatic variables during the spinach growing cycles including sunshine, rainfall, radiation, temperature and crop evapotranspiration (E_c).

Table 2 Analysis of variance of the changes in relative water content, color, respiration rate, head space gas composition, psychrotroph counts, *Pseudomonas* counts, visual quality, texture and damaged leaves of baby spinach harvested in winter and spring as affected by harvest time (HT) and delay before processing (DP).

Table 3 Psychrotroph and *Pseudomonas* counts (log CFU g⁻¹) of baby spinach harvested at 8:30 h (H1), 13:00 h (H2) and 17:30 h (H3) at harvest and after storage.

Table 4 Psychrotroph and *Pseudomonas* counts (log CFU g⁻¹) of baby spinach at harvest and after storage with a delay before processing of 3 h (DP3), 24 h (DP24) and 48 h (DP48).

Table 5 Changes in texture and the degree of damage of minimally processed baby spinach harvested in spring at 8:30 h (H1), 13:00 h (H2) and 17:30 h (H3).

Supplementary information 1. Changes in color saturation (Chroma) of baby spinach harvested in winter at 8:30 h (H1), 13:00 h (H2) and 17:30 h (H3) with a delay before processing of 24 h (DP24) and 48 h (DP48) before processing and after storage (3 d at 4 °C plus 6 d at 7 °C). Bars are the mean ± standard deviation of 15 replicates.

Supplementary information 2. Headspace partial pressure of O₂ (solid lines) and CO₂ (dash lines) of minimally processed baby spinach harvested at 8:30 h (H1), 13:00 h (H2) and 17:30 h (H3) with a delay before processing of 24 h (DP24) and 48 h (DP48) in winter (A) and 3h, 24 h (DP24) and 48 h (DP48) in spring (B), and stored for 3 d at 4 °C plus 6 d at 7 °C. Each symbol is the mean ± standard deviation of 3 packages.

Supplementary information 3. Changes in visual quality of minimally processed baby spinach harvested in winter at 8:30 h (H1), 13:00 h (H2) or 17:30 h (H3), processed with a delay of 3 h (DP3), 24 h (DP24) and 48 h (DP48) and stored for 3 d at 4 °C plus 6 d at 7 °C. Bars are the mean ± standard deviation of 5 replicates. Dash line represents the limit of marketability.

CAPÍTULO VI

Figure 1. Changes in leaf water content of minimally processed baby spinach cultivated in winter and spring, and evaluated before (white bar) and after cooling by different precooling systems. Samples were stored for 3 d at 4 °C plus 8 d at 7 °C. Bars are the mean \pm standard deviation of 15 replicates. RC (room cooling), FAC (forced air cooling), HC (hydro cooling), VC (vacuum cooling). Ns, not significant; ***, significant at $p < 0.001$.

Figure 2. Changes in colour saturation (chroma) of minimally processed baby spinach cultivated in winter and spring, precooled by different systems and stored for 3 d at 4 °C plus 8 d at 7 °C. Bars are the mean \pm standard deviation of 15 replicates. RC (room cooling), FAC (forced air cooling), HC (hydro cooling), VC (vacuum cooling). Ns, not significant; ***, significant at $p < 0.001$.

Figure 3. Headspace partial pressure of O₂ (solid lines) and CO₂ (dash lines) of minimally processed baby spinach cultivated in winter and spring precooled by different techniques and stored for 3 d at 4 °C and 8 d at 7 °C. Each symbol is the mean \pm standard deviation of 3 packages. RC (room cooling), FAC (forced air cooling), HC (hydro cooling), VC (vacuum cooling). Ns, not significant; **, significant at $p < 0.01$; ***, significant at $p < 0.001$.

Figure 4. Respiration rate of minimally processed baby spinach cultivated in spring, precooled by different systems and stored for 11 d at 7 °C. Bars are the mean \pm standard deviation of 3 packages. RC (room cooling), FAC (forced air cooling), HC (hydro cooling), VC (vacuum cooling). Bars with different letters are significantly different ($p < 0.05$).

Figure 5. Images captured by optical microscope of spinach leaves after harvest (A), and after precooling by different systems in spring: room cooling (B), forced air cooling

(C), hydro cooling (D) and vacuum cooling (E). dc (damaged cell); cc (cell corpse); ic (intact cell); c (cytoplasm); cw (cell wall); pm (plasma membrane). Bars: 20 μm .

Figure 6. Changes in visual quality of minimally processed baby spinach cultivated in winter and spring, precooled by different techniques and stored for 3 d at 4 °C and 8 d at 7 °C. Bars are the mean \pm standard deviation of 5 replicates. RC (room cooling), FAC (forced air cooling), HC (hydro cooling), VC (vacuum cooling). Ns, not significant; *, significant at $p < 0.05$; **, significant at $p < 0.01$; ***, significant at $p < 0.001$. Dash line represents the limit of marketability.

Figure 7. Changes in damaged leaf value in minimally processed baby spinach cultivated in winter and spring, precooled by different techniques and stored for 3 d at 4 °C and 8 d at 7 °C. Bars are the mean \pm standard deviation of 5 replicates. RC (room cooling), FAC (forced air cooling), HC (hydro cooling), VC (vacuum cooling). **, significant at $p < 0.01$; ***, significant at $p < 0.001$.

Table 1 Temperatures (°C) of baby spinach before and after precooling using different cooling systems.

Table 2 Psychrotrophs and *Pseudomonas* counts ($\log \text{CFU g}^{-1}$) of minimally processed baby spinach precooled by room cooling (RC), forced air cooling (FAC), hydro cooling (HC) and vacuum cooling (VC).

Table 3 Damaged cells of minimally processed baby spinach precooled by room cooling (RC), forced air cooling (FAC), hydro cooling (HC) and vacuum cooling (VC), evaluated in samples before and just after cooling.

CAPÍTULO VII

Figure 1. Headspace partial pressure of O₂ and CO₂ of minimally processed baby spinach stored for 12 d at 7 °C under different light conditions: light (A), photoperiod (B) and darkness (C). Each symbol is the mean \pm standard deviation of 4 bags.

Figure 2. Changes in the effective PSII quantum yield (Y(II)) (A), the quantum yield of nonregulated energy dissipation Y(NO) (B), and the quantum yield of regulated energy dissipation Y(NPQ) (C) of minimally processed baby spinach stored for 10 days at 7 °C under different light conditions: light, photoperiod and darkness. Baby spinach was evaluated at 0 days (white bar) and after 10 days of storage. Bars are the mean \pm standard deviation of 40 replicates. For the same storage date, bars with different letters are significantly different ($P < 0.05$) according to Kruskal– Wallis test.

Figure 3. Images captured by optical microscope of cells of baby spinach stored for 10 days at 7 °C under different storage condition: light + air, light + CA (0.5 kPa O₂ + 10 kPa CO₂), darkness + air, darkness + CA (0.5 kPa O₂ + 10 kPa CO₂). Images of intact cells (A), damaged cell with a cytoplasmic retraction (B), damaged cell with a visible gap between the cell wall and the plasma membrane (C) and cell corpse (D). dc (damaged cell); cc (cell corpse); ic (intact cell); c (cytoplasm); cw (cell wall); pm (plasma membrane). Bars: 20 μ m.

Figure 4. Changes in the level of damaged cells (A), lipid peroxidation (measured as malondialdehyde content) (B) and electrolyte leakage (C) of minimally processed baby spinach stored for 10 days at 7 °C under different storage conditions: light + air, light + CA (0.5 kPa O₂ + 10 kPa CO₂), darkness + air, darkness + CA (0.5 kPa O₂ + 10 kPa CO₂). Baby spinach was evaluated at 0 days (white bar) and during storage. Bars are the mean \pm standard deviation of 15, 4 and 6 replicates for damaged cells, lipid peroxidation and electrolyte leakage, respectively.

Figure 5. Changes in chlorophyll fluorescence parameters of minimally processed baby spinach stored for 10 days at 7 °C under different storage conditions: light + air, light + CA (0.5 kPa O₂ + 10 kPa CO₂), darkness + air, darkness + CA (0.5 kPa O₂ + 10 kPa CO₂). Images of maximum quantum yield of photosystem II (PSII) (Fv/Fm), effective PSII quantum yield (Y(II)), quantum yield of nonregulated energy dissipation Y(NO), and quantum yield of regulated energy dissipation Y(NPQ) captured with an Imaging-PAM M-series system. The false-colour code depicted between the images ranged from 0 (black) to 1 (purple).

Table 1. Changes in visual quality and off-odour of minimally processed baby spinach stored for 12 d at 7 °C under light, photoperiod and darkness.

Table 2. Statistical significance by the Anova test and Kruskal–Wallis test of leaf quality and leaf senesce parameters of baby spinach stored for 10 d at 7 °C under different storage conditions: light + air, light + CA (0.5 kPa O₂ + 10 kPa CO₂), darkness + air, darkness + CA (0.5 kPa O₂ + 10 kPa CO₂).

Table 3. Changes in maximum quantum yield of photosystem II (PSII) (Fv/Fm), effective PSII quantum yield (Y(II)), quantum yield of nonregulated energy dissipation Y(NO), quantum yield of regulated energy dissipation Y(NPQ) and chlorophyll a content of minimally processed baby spinach stored for 10 days at 7 °C under different storage condition: light + air, light + CA (0.5 kPa O₂ + 10 kPa CO₂), darkness + air, darkness + CA (0.5 kPa O₂ + 10 kPa CO₂).

Table 4. Changes in visual quality, off-odour and *Pseudomonas* counts of minimally processed baby spinach stored for 10 d at 7 °C under different storage conditions: light + air, light + CA (0.5 kPa O₂ + 10 kPa CO₂), darkness + air, darkness + CA (0.5 kPa O₂ + 10 kPa CO₂).

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN GENERAL

1. Productos IV Gama

El consumo de productos vegetales aporta nutrientes esenciales para el metabolismo humano como vitaminas, minerales, fibra y compuesto bioactivos. Su consumo diario está estrechamente relacionado con la mejora de la salud gastrointestinal, la visión, la prevención de daños vasculares, las enfermedades crónicas como la diabetes y algunos tipos de cáncer (Dias, 2013). En las sociedades desarrolladas, la salud es una preocupación de primer orden existiendo un interés creciente por la nutrición y los hábitos de alimentación saludables. Los cambios en los hábitos de consumo y el ritmo de vida acelerado han provocado que los productos mínimamente procesados o de IV Gama hayan experimentado un rápido crecimiento dentro del mercado tanto de frutas como de hortalizas. Estos productos se caracterizan por recibir tratamientos que modifican muy poco su apariencia original, mostrándose frescos en sus características y homogéneos en calidad (Wiley, 1994). Las operaciones de procesado a los que se someten requieren exclusivamente métodos simples de selección, lavado, deshojado, cortado, secado y envasado entre otros, los cuales producen cambios poco perceptibles de sus propiedades nutritivas y organolépticas, mientras que facilitan su consumo. Estos productos están constituidos por tejidos vivos, y debido a las operaciones de preparación manifiestan respuestas fisiológicas más aceleradas que el producto original, por lo que presentan una menor vida útil que los productos frescos de los que proceden. Por este motivo deben permanecer refrigerados y habitualmente envasados en atmósfera modificada (EAM), para evitar su recontaminación y pérdida de sus propiedades nutritivas y garantizar una vida útil suficiente para llevar a cabo su distribución (Artés y Artés-Hernández, 2003)

En España, el consumo medio de hortalizas de IV Gama en 2011 se estimó en 3,35 kg por persona y año, lo que correspondía al 5,5% del consumo total de hortalizas

(Cerdeño, 2011). Según los datos correspondientes a los cinco principales operadores nacionales obtenidos por el Comité de Fruta y Hortalizas Preparadas de Fepex, el volumen fabricado en España de productos de IV Gama en 2013 ascendió a casi 78.000 t. Del total producido, un 81% se dedicó a la distribución dentro del territorio nacional, un 12% a la exportación y el resto se destinó a la restauración, canal al que se dirigen gran parte de los operadores de nuestro país (Monje, 2014). En cuanto a los principales fabricantes y comercializadoras de productos de IV Gama, el GRUPO FLORETTE IBÉRICA es el líder con un volumen total de ventas de 30.379 t bajo la marca FLORETTE (**Tabla 1**). En segundo lugar se encuentra el grupo VERDIFREH S.L., que es interproveedor de Mercadona, con un volumen de venta de 28.700 t bajo las marcas VERDIFRESH y MESTURADOS CANARIOS. En tercera posición se encuentra PRIMAFLOR S.L. con 11.00 t bajo la marca PRIMAFLOR, seguido por KERNEL EXPORT S.L. con 9.000 t con las marcas KERNEL, LUMINOSA y RICA RICA. Los datos de 2014 muestran que el principal producto de IV Gama comercializado en hipermercados y supermercados lo constituyen las ensaladas listas para su consumo con un 60% del total de ventas, frente al 40% que engloba al resto de verduras y frutas. En términos económicos, las ventas de productos de IV Gama en distribución en el territorio nacional superaron los 323 M€ (Monje, 2014). Esto indica que dentro del mercado nacional estos productos ocupan un lugar destacado debido a su alto valor añadido y gran calidad, con un crecimiento lento pero firme año tras año.

Tabla 1. Principales fabricantes y comercializadoras de IV Gama.

	Empresa	Ubicación	Volumen (t)	Horeca (%)	Principales productos	Marcas
1	GRUPO FLORETTE IBÉRICA	Milagro (Navarra)	30.379	21	Ensaladas, hortalizas y verduras	Florette
2	VERDIFRESH, S.L. (GRUPO)	Riba-Roja de Turia (Valencia)	28.700	0	Ensaladas, hortalizas y verduras	Verdifresh, Mesturados Canarios
3	PRIMAFLOR, S.L.	Pulpí (Almería)	11.000	25	Ensaladas, hortalizas y verduras	Primaflor
4	KERNEL EXPORT, S.L.	Los alcázares (Murcia)	9.000	50	Ensaladas, hortalizas y verduras	Kernel, Luminosa, Rica Rica
5	TRANSF. DE PATATA DE ÁLAVA, S.L.	Vitoria (Vitoria)	5.000	100	Patata, cebolla, ajo y ensaladas	Natuber, Florette
6	IBÉRICA DE PATATAS SELECTAS, S.L.	Madrid	4.500	97	Patata y cebolla	Ibérica de Patatas, El Sabor de Mamá
7	GRUPO CUTTING´S, S.L.	Barcelona	4.300	88	Patata, cebolla, ensaladas, verdura y fruta	Cutting´s
8	VEGETALES LÍNEA VERDE NAVARRA, S.L.	Tudela (Navarra)	4.100	14	Ensaladas, hortalizas y verduras	Dimmidisí
9	JOPRIMSA, S.L.	Hostalric (Girona)	3.200	100	Patata, cebolla, ajo, ensaladas y verdura	Joprimsa
10	S.A.T. HUERTA DE PERALTA	Peralta (Navarra)	3.000	30	Ensaladas, hortalizas y verduras	El Huertico, Huerta Peralta

Fuente: Monje, 2014.

2. ‘Hojas jóvenes’ en IV Gama

Desde que comenzó hace ya 20 años la producción y comercialización de IV Gama en España, la evolución de productos y variedades de materias primas utilizadas ha sido permanente. Aún hoy, la innovación sigue siendo un factor fundamental ya que el consumidor es más exigente y busca la comodidad de un producto atractivo, fresco, con sabor y que además cumpla con los requisitos de máxima calidad (Floristán, 2009). En este sentido, en los últimos años se han incorporado los nuevos tipos de ‘hojas jóvenes’ para ensaladas también llamadas ‘minihojas’, ‘brotes’, ‘mesclum’ en Francia, ‘spring mix’ en EEUU y ‘baby salad leaves’ en Gran Bretaña, como combinación de hojas inmaduras de distintas hortalizas de hoja. Las ensaladas de ‘hojas jóvenes’ son uno de los productos más prometedores de la IV Gama cuyo consumo se ha incrementado de manera exponencial en los últimos años y continuará aumentando siguiendo la tendencia de países desarrollados como Estados Unidos (Rijk Zwaan, 2016a). Son consideradas productos ‘Premium’ cuyo argumento de venta principal es la excelente calidad organoléptica, ya que van destinados a consumidores con gusto por lo exquisito, y por su alto valor añadido, bien sea por la de materias primas más frescas, variedades de menor tamaño, textura más tierna e incluso por el empleo de algunos ingredientes más selectos con la combinación de aromas y sabores más exóticos (Nunhems, 2015; Martínez-Sánchez y col., 2012). En este campo, las nuevas variedades de ‘hojas jóvenes’ desarrolladas recientemente como hojas de alta calidad para la industria de IV Gama incluyen varios tipos de lechugas (*Lactuca sativa* L.), espinaca (*Spinacia oleracea* L.), canónigo (*Valerianella locusta* L.), mizuna (*Brassica rapa* L. subsp. *japonica*), verdolaga (*Portulaca oleracea* L.), rocket o rúcula (*Eruca sativa* Mill., *Diplotaxis tenuifolia* (L.) DC. y *Diplotaxis muralis* (L.) DC.), acelga (*Beta vulgaris* subsp. *cicla* L.) y berros (*Nasturtium officinale* R. Br.) (Gil y col., 2012).

Las ‘hojas jóvenes’ engloban tanto a hojas de pequeño tamaño debido a su estado de inmadurez (tipo ‘baby’), como a hojas maduras (tipo ‘multi’) que no alcanzan su tamaño habitual debido a la densidad de plantación más alta de estas hortalizas. Algunos de los beneficios de estas ‘hojas jóvenes’, en comparación con lechugas IV Gama procedentes de cabeza entera son: (i) una mayor eficiencia debido a un mayor porcentaje de producto utilizable, (ii) procesamiento más fácil y rápido (no necesitan ser cortadas), (iii) presentación más atractiva en el envase debido a su estructura 3-D, y (iv) mínima oxidación ya que la superficie de corte se reduce a la zona basal del peciolo (Martínez-Sánchez y col., 2012).

Este producto presenta la ventaja de que no necesita un cortado por el pequeño tamaño de sus hojas. Tras la recolección sufren un ligero procesado, que consiste en un lavado o higienización, secado con la eliminación de humedad, envasado en atmósfera modificada y conservación en refrigeración (Nicola y col. 2009). No existe un único producto, sino que son los procesadores los que crean sus propias mezclas, combinando distintos colores y texturas junto con el alto contenido en constituyentes beneficiosos para la salud incluidos los polifenoles, glucosinolatos, carotenoides y vitamina C (Martínez-Sánchez y col., 2008a). A pesar de todas estas bondades, la realidad es que no satisfacen las expectativas esperadas ya que la calidad no es constante ni homogénea por las posibles modificaciones en sus características sensoriales, físico-químicas, microbiológicas y/o nutricionales. Las hortalizas de hoja se caracterizan por ser productos muy perecederos, con una alta tasa de respiración y pérdida de agua (Cantwell y col. 1998; Wang, 2003). La garantía de calidad debe comenzar en el origen ya que el procesado de IV Gama no mejora la calidad de las materias primas de partida, tan sólo puede mantener dicha calidad durante la vida útil. Sin embargo, es difícil conocer las estrategias de intervención que pueden aplicarse para mejorar la calidad de

las materias primas y prolongar la vida útil del producto procesado, ya que son muchos los factores que intervienen como posibles causas de deterioro, de los que no se dispone de suficiente información tanto durante el cultivo como en la recolección, el procesado o durante la conservación. Es necesario por tanto profundizar en el conocimiento de estos factores pre cosecha y post cosecha como responsables de la pérdida de calidad de la materia prima y del producto procesado a lo largo de su vida útil.

2.1 Especificaciones de calidad de ‘hojas jóvenes’ para IV Gama

Las ‘hojas jóvenes’ para IV Gama comparten con el resto de hortalizas de hoja una serie de criterios de calidad para su comercialización (UNECE, 2012; Wright, 2004):

- Textura fresca, tersa, sin deshidratación y marchitamiento.
- Color típico de la variedad.
- Ausencia de daños físicos, plagas, enfermedades y fisiopatías.

Tanto para hojas tipo ‘baby’ como para hojas tipo ‘multi’ se emplean además la longitud del peciolo y la longitud total de la hoja (5-12 cm) como buenos indicadores del estado de madurez y de la calidad del producto procesado (Gil y col., 2012). La **Tabla 2** recoge otra serie de especificaciones publicadas para el caso de las hojas tipo ‘baby’ que incluyen en algunos casos la anchura de la hoja.

Tabla 2. Índices de madurez para hojas tipo ‘baby’ para IV Gama.

Tipo de hoja ‘baby’	Longitud de la hoja (cm)			Longitud del peciolo(cm)		Otros parámetros
	Mínimo	Óptimo	Máximo	Mínimo	Máximo	
Batavia verde y roja	5	10	12			Anchura de hoja: 7-8 cm
Lollo rossa/bionda				Presencia	6	
Acelga roja	5	10	12	Presencia	35% longitud de la hoja	Anchura de hoja: 7-8 cm
Mostaza roja	5		8			Anchura de hoja > 7-8 cm
Rúcula	5	10	12	Presencia	4-5	Anchura de hoja: 4 cm, anchura de peciolo < 3 mm
Espinaca	5	10	12	Presencia	35% longitud de la hoja	Anchura de hoja > 7-8 cm
Tatsoi	6	8	12	2	4-5	Anchura de peciolo < 7-8 cm
Berro		8	12			Anchura de hoja: óptimo 40 mm, máximo 60 mm; anchura de peciolo: óptimo 2,5-3,5, máximo 4 mm

Fuente: Gil y col., 2012.

2.2 Lechuga ‘multi’ y lechuga ‘baby’

La lechuga (*Lactuca sativa* L.) es una planta anual y autógama perteneciente a la familia Compositae. En estado maduro presenta raíz pivotante y hojas dispuestas en roseta que en algunos casos se acogollan más tarde. La temperatura óptima de germinación oscila entre 18-20 °C. Durante la fase de crecimiento del cultivo se requieren temperaturas entre 15-20 °C por el día y 5-8 °C por la noche, pues la lechuga exige que hayan diferencias de temperatura entre el día y la noche (MAGRAMA, 2015a). La lechuga constituye una de las hortalizas de mayor relevancia en IV Gama debido a su textura fresca y crujiente, buen aroma y sabor, además de ser una hortaliza rica en compuestos fitoquímicos saludables como compuestos fenólicos, vitamina C y

carotenoides (Kimura y Rodríguez-Amaya, 2003; Llorach y col., 2008). Las lechugas pueden presentar innumerables formas, desde hojas estrechas y suaves, hasta rizadas y amplias de los tipos Lollo y Hoja de Roble. Los colores también pueden abarcar un amplio abanico de posibilidades, destacando el color rojo avinado de las variedades de Lollo Rossa, que contrasta con el verde pálido de las Lollo Bionda, el verde intenso de las Romanas, Trocadero y Batavia y el verde rojizo de la Hoja de Roble (Andújar y col., 2010). En el mercado de las ‘hojas jóvenes’ para IV Gama pueden encontrarse tanto lechugas tipo ‘baby’ como tipo ‘multi’ (**Fotografía 1**). Estas últimas son lechugas que se caracterizan por poseer un mayor número de hojas de menor tamaño que las lechugas convencionales, y se pueden utilizar tanto para consumo en fresco como para su procesado en IV Gama (Vidal, 2011).

LECHUGAS TIPO ‘MULTI’



Hoja de Roble Verde



Batavia Roja



Lollo Bionda



Lollo Rossa

LECHUGAS TIPO ‘BABY’



Hoja de Roble Verde



Batavia Roja



Lollo Bionda



Lollo Rossa

Fotografía 1. Lechugas tipo ‘multi’ y ‘tipo ‘baby’ (Rijk Zwaan, 2016c).

2.3 Espinaca ‘baby’

La espinaca es una planta herbácea dioica perteneciente a la familia Chenopodiaceae. En estado maduro presenta una raíz pivotante y las hojas dispuestas en roseta alrededor de un tallo más o menos ramificado. La temperatura óptima de germinación oscila entre 16-20 °C. Durante la fase de crecimiento del cultivo se requieren temperaturas entre 10-25 °C con un crecimiento nulo por debajo de -5 °C (MAGRAMA, 2015b). Las espinacas ‘baby’ son hojas verdes, tiernas y de sabor más dulce que la espinaca madura, especialmente sabrosas cuando se consumen crudas en ensalada (**Fotografía 2**). Este alimento vegetal es en la dieta una importante fuente de fibra y compuestos bioactivos tales como vitamina C, vitamina A y polifenoles (Gil y col., 1999; Pandrangi y Laborde, 2004; Xie y col., 2013). La quinta parte de la espinaca transformada por la industria española se destina a la exportación, siendo sus principales destinos los países del norte y centro de Europa, ya que éstos son grandes consumidores de espinacas. El cultivo de la espinaca tiene muy buenas expectativas de futuro, especialmente el cultivo para industria debido al creciente mercado europeo donde el periodo de producción es mucho más reducido.



Espinaca ‘baby’

Fotografía 2. Espinaca tipo ‘baby’ (Rijk Zwaan, 2016b).

3. Producción y procesado de ‘hojas jóvenes’ para IV Gama

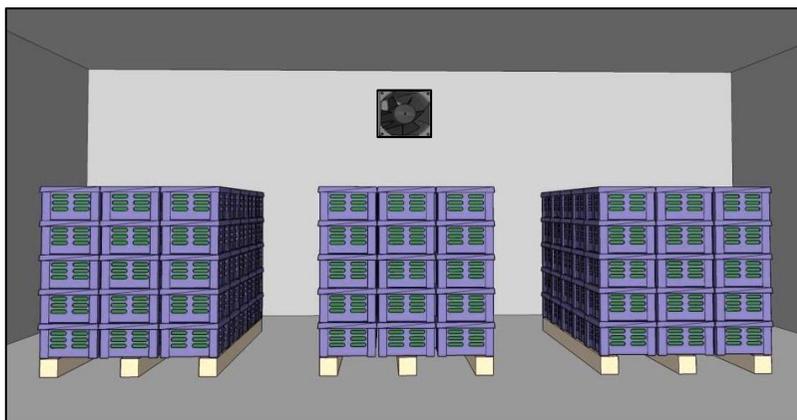
3.1 Cultivo y recolección

La siembra de las hojas tipo ‘baby’ se realiza de forma directa en camas elevadas con una densidad de plantación de 800 plantas m⁻². En el caso de las hojas tipo ‘multi’, la germinación se lleva a cabo en semilleros y posteriormente se realiza el trasplante en mesas elevadas con una densidad de plantación de 30 plantas m⁻² (Martínez-Sánchez y col., 2012). La fecha de recolección de las ‘hojas jóvenes’ se establece en función del tamaño de la hoja, fijándose el momento de la cosecha cuando alcanzan un tamaño de hoja de 5-12 cm incluido el peciolo. Las hojas tipo ‘baby’ son cultivos de ciclo de cultivo cortos que varían de unos 70 días en invierno a unos 40 días en verano, mientras que las hojas tipo ‘multi’ suelen presentar ciclos de cultivos más largos hasta alcanzar el tamaño adecuado (Vidal, 2011; Martínez-Sánchez y col., 2012). La siembra y recolección de hojas tipo ‘baby’ se lleva a cabo de forma totalmente mecanizada y algunas empresas están desarrollando el concepto de adaptar esta maquinaria para mecanizar el cultivo de hojas tipo ‘multi’. Las hojas deben recolectarse sanas y sin defectos, evitando daños mecánicos durante la manipulación para reducir los destríos en la planta de procesado. Los productores deben prestar especial atención a los aspectos de contaminación microbiana durante el cultivo, recolección y transporte, para que el producto llegue con mayor garantía de calidad microbiológica y que se mantenga en el producto procesado (Allende y col., 2003). En España se consiguen cultivar ‘hojas jóvenes’ a lo largo de todo el año, obteniéndose cosechas de verano en zonas como Navarra y Granada, y el resto del año principalmente en Murcia y Almería.

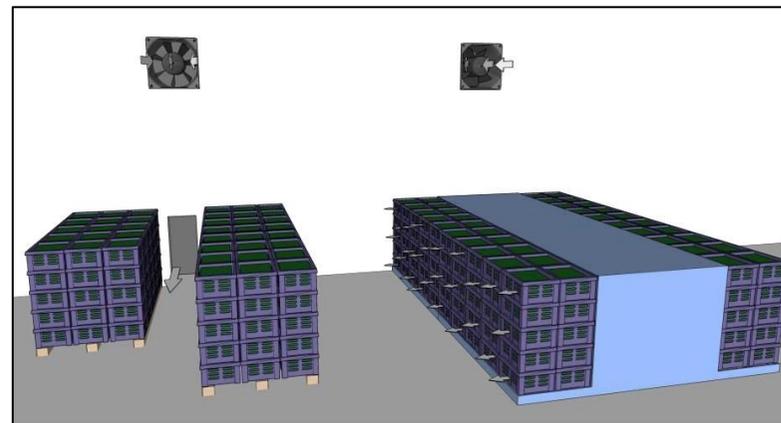
3.2 Pre-enfriamiento

Se denomina pre-enfriamiento al proceso que elimina el calor del campo inmediatamente después de la cosecha. La reducción de la temperatura de los productos hortícolas tras la cosecha reduce en gran medida la tasa de respiración, extiende la vida útil y protege la calidad del producto, al tiempo que reduce las pérdidas de peso por la reducción en la tasa de pérdida de agua y deterioro (Brosnan y Sun, 2001; Thompson y col., 2008; Kitinoja y Thompson, 2010). Los principales métodos de pre-enfriamiento de productos altamente perecederos como las hortalizas de hoja incluyen distintos sistemas con multitud de variaciones: (i) enfriamiento en cámara, (ii) enfriamiento por aire forzado, (iii) hidro-enfriamiento y (iv) enfriamiento por vacío (Thompson y col., 2002) (**Figura 1**). El enfriamiento en cámara (i) consiste en la introducción del producto en cámaras de refrigeración en contenedores donde el aire frío de los evaporadores circula a través de los mismos y lentamente enfría el producto. En el enfriamiento por aire forzado (ii), el aire a presión pasa a través del producto enfriándolo. A diferencia del enfriamiento en cámara, el aire pasa a través del contenedor, no alrededor de él, gracias a la utilización de unas aperturas dispuestas en los laterales del contenedor en la misma dirección que el paso del aire frío. En el hidro-enfriamiento (iii) se pone en contacto el producto directamente en agua fría mediante un sistema de ducha o inmersión. En un hidro-enfriador tipo ducha, el agua fría es bombeada a un tanque de distribución elevado y el agua cae sobre el producto que puede estar dispuesto a granel en un transportador, en contenedores o estar ya envasado (Thompson y col., 2002). El enfriamiento por vacío (iv) se basa en la evaporación rápida de parte de la humedad del producto sometido a vacío, siendo el enfriamiento por evaporación una de las técnicas más rápidas (Sun y Zheng, 2006). Al reducir la presión atmosférica alrededor del producto disminuye la temperatura de ebullición del agua que contiene, por lo que conforme se produce la caída de presión dentro del contenedor, el agua se evapora

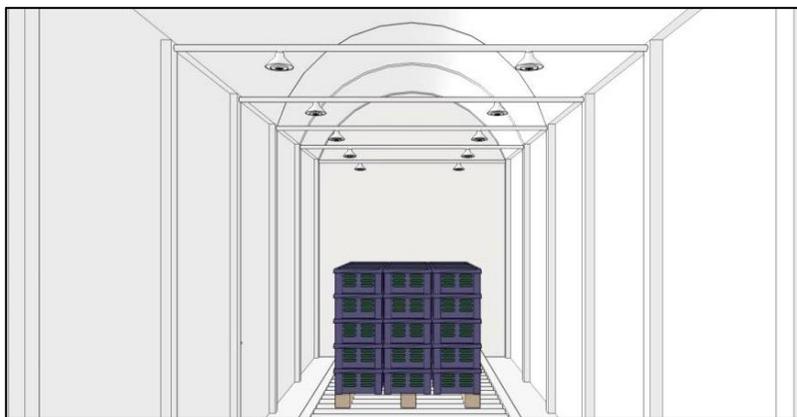
rápidamente y el producto cede calor. Las ventajas e inconvenientes de cada uno de estos métodos de enfriamiento así como sus efectos en la calidad del producto se describen el **apartado 6.1.**, dentro de los factores postcosecha que afectan a la calidad de ‘hojas jóvenes’ para IV Gama



Enfriamiento en cámara



Enfriamiento por aire forzado



Hidro-enfriamiento tipo ducha



Enfriamiento por vacío

Figura 1. Esquema de los principales sistemas de pre-enfriamiento para hortalizas de hojas para IV Gama.

3.3 Procesado para IV Gama

El procesado mínimo de ‘hojas jóvenes’ para IV Gama consiste en un lavado, secado, y envasado en atmósfera modificada (Barth, y col., 2004; Cantwell y col., 1998). El acondicionamiento previo de las materias primas refrigeradas en las instalaciones de procesado se lleva a cabo en la denominada zona ‘sucias’ por estar en contacto con otros productos que no han sido lavados, mientras que el resto de operaciones se llevan a cabo en una zona aséptica denominada zona ‘limpia’ (**Figura 2**). La primera operación en la zona de recepción de las materias primas es el control de calidad, el cual es necesario para lograr que se cumplan las especificaciones de calidad para cada producto establecidas por cada procesador. Los criterios principales se basan en la apariencia del producto, incluyendo frescura general, la ausencia de insectos y cuerpos extraños, daños físicos y fisiopatías (Varoquaux y Mazollier, 2002). Para ello se lleva a cabo un proceso de descarte de las hojas que no cumplan los criterios de calidad de forma manual o en el caso de ‘hojas jóvenes’ mediante la utilización de sistemas de visión artificial incorporados en la línea de acondicionamiento del material. El producto seleccionado se conduce mediante una cinta transportadora hacia la zona ‘limpia’ donde se encuentran los tanques de lavado y aclarado que deben contar con agua de buena calidad microbiológica a temperatura entre 1 y 4 °C (Artés y Artés-Hernández, 2003). Estos procesos son necesarios porque permiten que se elimine la suciedad, se eliminan posibles cuerpos extraños como insectos y se eliminan los exudados del tejido tras el corte, además de enfriar el producto (AFHORLA, 2010). Para que el proceso de lavado se realice de forma correcta es necesario el empleo de un higienizante que actúa como coadyuvante del proceso, siendo el más común el hipoclorito sódico (30 ppm de cloro libre) regulando el pH con ácido cítrico en valores entre 6,5 y 7,5, rango en el que la eficacia bactericida del cloro es óptima. El producto lavado pasa al aclarado con duchas

de agua para eliminar los restos del higienizante (Gil y col., 2005). Como alternativa al uso del hipoclorito sódico se están incorporando nuevas técnicas de desinfección como el dióxido de cloro, ozono y ácido peroxiacético, entre otros (Beuchat y col., 1998; Brackett, 1999; Sapers, 2003; Allende y col., 2006). Tras pasar por los tanques de lavado y aclarado, el producto es sometido a un proceso de secado para eliminar el exceso de agua. En la industria existen principalmente dos métodos de secado del producto: las centrifugas y los túneles de aire templado (Varoquaux y Mazollier, 2002) o de frío polar (Turatti, 2016). Para el secado de ‘hojas jóvenes’ se recomienda la utilización de túneles con aspiración del agua remanente ya que suponen un método más controlado que conlleva un menor daño físico comparado con la centrifugación (FTNON, 2016). Por último el material vegetal pasa a la sala de pesado, mezclado y envasado que debe encontrarse refrigerada y que está separada de la zona de lavado. En el envasado, el producto pasa a través de un tubo vertical en cuya parte superior tiene unos dispositivos o cabezales muy precisos programados para que cuando se alcance el peso establecido se abra y caiga el contenido al tubo formador, realizándose el sellado del envase (**Figura 2**). El envasado se lleva a cabo utilizando polímeros plásticos de baja permeabilidad al vapor de agua para mantener una alta humedad en el interior del envase. Además, el envasado evita la contaminación con el exterior y permite generar una composición gaseosa adecuada alrededor del producto para ayudar a alargar la vida útil (Gil y Tudela, 2003). El envasado suele llevarse a cabo en atmósfera modificada o MAP (Modified Atmosphere Packaging), que implica una modificación de la composición gaseosa que rodea al producto envasado distinta al aire. Esta modificación de la atmósfera se puede producirse de forma pasiva o activa. El envasado en atmósfera modificada pasiva se lleva a cabo en aire y la modificación de la atmósfera se produce de forma gradual debido a la respiración del propio tejido vegetal y a la permeabilidad

de plástico con el intercambio de gases entre la atmósfera interior y exterior a través de la película plástica, conllevando la reducción en la concentración de oxígeno (O_2) y el incremento en la concentración de dióxido de carbono (CO_2). Por otro lado, el envasado en atmósfera modificada activa implica la inyección de una mezcla precisa de gases en el interior del envase antes del sellado para crear una atmósfera inicial distinta del aire (Al-Ati y Hotchkiss, 2002). Una vez embolsado el producto procesado, se disponen las bolsas en cajas las cuales se paletizan y almacenan en un recinto refrigerado donde se almacenan hasta su distribución.

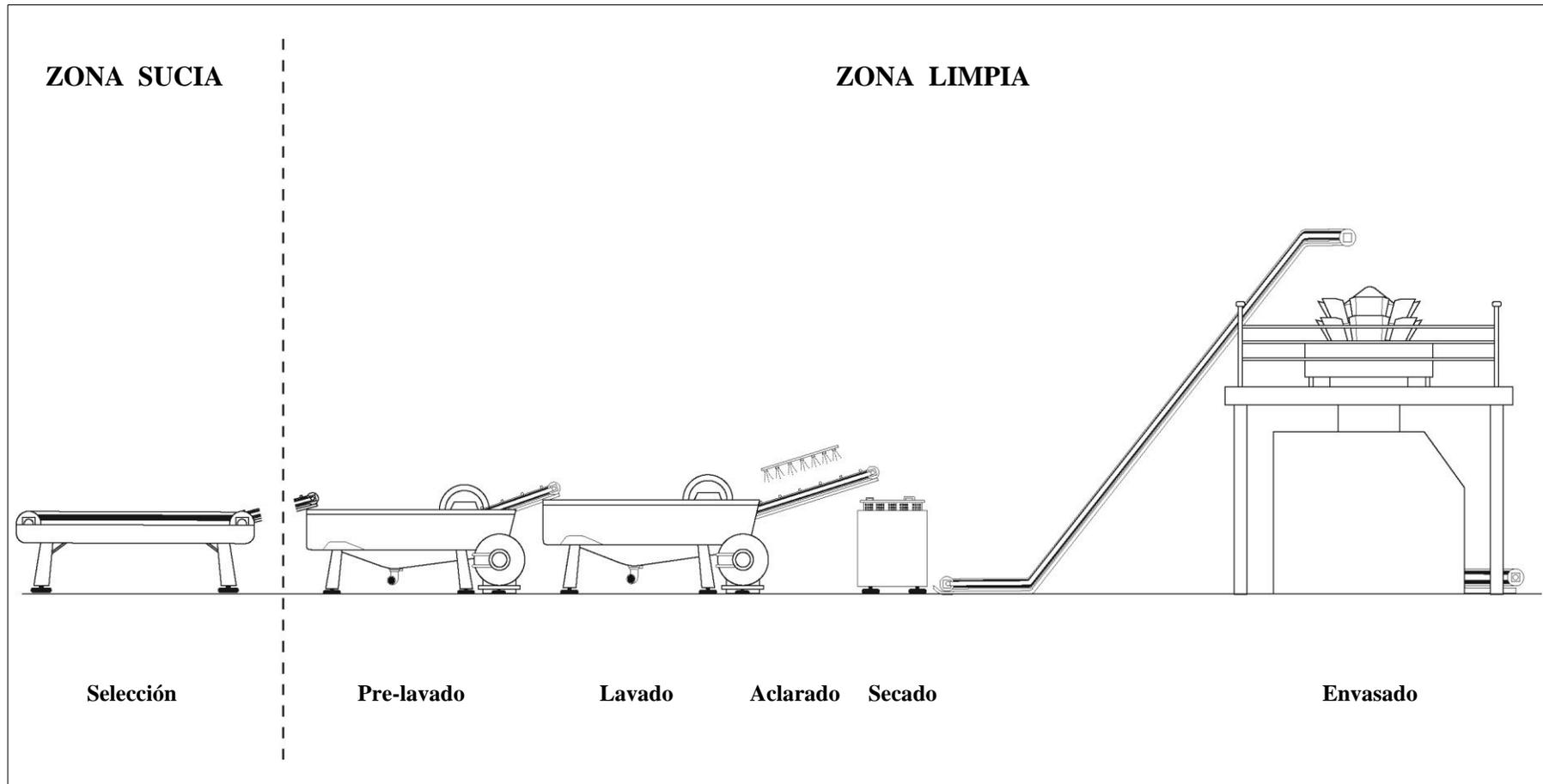


Figura 2. Esquema de la línea de procesado para 'hojas jóvenes' en IV Gama.

4. Causas de pérdida de calidad en ‘hojas jóvenes’ para IV Gama

La apariencia visual del producto es el primer atributo identificado por el consumidor y afecta en gran medida a su decisión de compra (Toivonen y Brummell, 2008). En hortalizas de hoja y especialmente en ‘hojas jóvenes’, la pérdida de agua está íntimamente relacionada con la pérdida de calidad visual del producto ya que la deshidratación confiere a las hojas un aspecto de marchitez (Cantwell y col., 1998; Wang, 2003). La deshidratación de las hojas destaca como la principal causa de pérdida postcosecha de este producto, ya que conlleva tanto pérdidas directas por pérdida de peso como un deterioro en la calidad visual y textura del producto (Kader, 1992, Piagentini y col., 2002). Además, existen otra serie de parámetros que afectan a la calidad visual de las hortalizas de hoja como la presencia de heridas, podredumbres o decoloraciones. Los defectos físicos puede originarse antes de la cosecha como resultado del ataque de insectos, fitopatógenos, agentes químicos y ambientales, o después de la cosecha durante la manipulación y procesado del producto. Por otro lado, las principales causas de los cambios en el color de las hojas son el amarilleamiento debido a la degradación de la clorofila y las oxidaciones debido al pardeamiento enzimático en las zonas de corte de las hojas (Kader, 2002; Toivonen y Brummell, 2008). En esencia, los cambios en la apariencia y textura están fuertemente ligados al deterioro del tejido, y como tal se utilizan como medidas de frescura y pérdida de la calidad en la industria de IV Gama (Cantwell y Suslow, 2002). La textura o firmeza de la hoja viene determinada en gran parte por la anatomía física del tejido como el tamaño y la forma celular, el espesor de la pared celular, etc., junto con el estado de turgencia de la hoja. En este sentido, los principales factores que afectan a la pérdida de firmeza postcosecha son la deshidratación y los cambios osmóticos en la hoja (Shackel y col., 1991; Toivonen y Brummell, 2008).

Otro factor importante de pérdida de calidad de las hojas durante la conservación se debe al desarrollo de microorganismos alterantes en el producto envasado. Durante la conservación de hortalizas de hojas se produce un crecimiento bacteriano que alcanzado un determinado nivel determinados grupos de bacterias alterantes pueden provocar la aparición de síntomas claros de deterioro como, producción de malos olores, la pérdida de textura y la aparición de pudriciones blandas (Snowdon, 1990). Dentro de las bacterias causantes del deterioro de hortalizas de hoja durante su conservación destacan las bacterias del grupo *Pseudomonas*, y en menor medida bacterias de la familia Enterobacteriaceae y bacterias ácido lácticas (Heard, 2002).

Por otro lado, los consumidores prestan especial atención al sabor y al aroma del producto envasado listo para el consumo. El sentido del gusto engloba tanto la percepción de sabor como del aroma del alimento, y en el caso de hortalizas de hoja está principalmente relacionado con su composición en azúcares, ácidos orgánicos y compuestos volátiles (de Rovira, 1996; Beaulieu y Baldwin, 2002). Durante la conservación del producto envasado pueden ocurrir cambios metabólicos y fisiológicos del producto que alteren su composición inicial y promuevan el desarrollo de sabores y aromas desagradables.

La **Fotografía 3** muestra algunos ejemplos de síntomas de pérdida de calidad de ‘hojas jóvenes’ para IV Gama.



Fotografía 3. Síntomas de pérdida de calidad en ‘hojas jóvenes’ para IV Gama.

5. Factores precosecha que afectan a la calidad de ‘hojas jóvenes’ para IV Gama

5.1 Factores genéticos

La excelente calidad de la materia prima es la propiedad o característica más importante que afecta la calidad y vida útil del producto procesado. Es de vital importancia la selección de un material vegetal de alta calidad que tenga un comportamiento homogéneo para garantizar la obtención de un producto de calidad excelente a lo largo de todo el año (Gil y col., 2013). Para tomar esta decisión se debe conocer el potencial de vida útil mediante la evaluación de la calidad de la materia prima y la del producto procesado. En el caso de la IV Gama, hasta ahora para aceptar una nueva variedad, sólo se tenía en cuenta la producción, desatendiendo otros atributos de calidad tan relevantes como la textura o el contenido en constituyentes fitoquímicos, los cuales pueden estar relacionados con la fragilidad del tejido, la susceptibilidad a la contaminación microbiana y el potencial de pardeamiento (Ruppel y col., 2008) y con la defensa frente a estreses ambientales (Hodges y Toivonen, 2008). Por ejemplo, en estudios llevados a cabo en 26 cultivares de espinaca mostraron que aquellos con mayor contenido en compuestos polifenólicos presentaron mayor resistencia a plagas y enfermedades (Howard y col., 2002).

En cuanto a su resistencia al procesado, el término ‘procesabilidad’ se define como la capacidad de las hojas para soportar los procesos de lavado, secado y envasado necesarios para la producción de ensaladas listas para el consumo (Clarkson y col. 2003). Existen varios estudios que muestran que la vida útil y calidad de ‘hojas jóvenes’ tras su procesado están relacionadas con algunas características precosecha como son la morfología de la hoja (tamaño de la hoja y de sus células) y con su estructura interna (resistencia física). Según las investigaciones llevadas a cabo, se considera que una hoja tiene mayor procesabilidad si es una hoja robusta, con una combinación de células

pequeñas, con una elevada concentración de solutos y paredes celulares fuertes (Clarkson y col. 2003; Wagstaff y col., 2010; Zhang y col., 2007).

5.2 Estado de maduración

El estado de madurez de la hortalizas de hojas destinadas a IV Gama es un factor crítico que afecta tanto a su tolerancia a la manipulación y procesado como a su calidad y vida útil tras el procesado (Kader, 2002; Gil y col., 2012). Por ejemplo, en el lechuga romana cortada se ha observado que la vida útil se reduce en el caso de estados de madurez avanzados debido al mayor desarrollo de pardeamiento en el corte. Sin embargo, en estados de madurez más tempranos, al final de la conservación se desarrollan mayores niveles de malos aromas aunque la calidad visual no se vea afectada (Gil y col., 2012).

El estado de madurez afecta a la tasa respiratoria del producto envasado siendo generalmente más elevada en ‘hojas jóvenes’ incluso cuando se compara con el producto cortado (Martínez-Sánchez y col., 2008b; Martínez-Sánchez y col., 2012). Las altas tasas respiratorias se relacionan con una mayor actividad metabólica y mayor velocidad de deterioro del producto. Además pueden resultar en una pérdida rápida de ácidos orgánicos, azúcares y otros constituyentes que determinan la calidad nutricional del producto (Cantwell y Suslow, 2002). Sin embargo, estudios llevados a cabo en distintas variedades de lechuga muestran que las ‘hojas jóvenes’, aunque presentan mayor tasa respiratoria que sus formas maduras cortadas para IV Gama, alcanzan una vida útil similar al producto cortado (Martínez-Sánchez y col., 2012). La pérdida de calidad del producto cortado se relaciona con la problemática asociada a la etapa de corte, en concreto con el pardeamiento y el crecimiento bacteriano; mientras que en las ‘hojas jóvenes’ se asocia con su rápido deterioro como consecuencia de la pérdida de firmeza (Martínez-Sánchez y col., 2012). En cuanto a la composición nutricional, varios

estudios muestran que el contenido en compuestos bioactivos como minerales y compuestos antioxidantes es similar o incluso superior en variedades de ‘hojas jóvenes’, comparado con estados de maduración más avanzados y que además esta composición se mantiene estable durante la vida útil del producto (Martínez-Sánchez y col., 2012; Santos y col., 2014).

5.3 Factores climáticos

Existen factores climatológicos, en especial la temperatura e intensidad de luz, que tienen una fuerte influencia en la composición nutricional y en el desarrollo de hortalizas de hojas. Por este motivo, la localización geográfica y la época del año en la que se desarrolla el cultivo pueden tener un efecto determinante en la calidad del producto procesado (Kader, 2002). Numerosos estudios muestran que la luz es uno de los factores relacionados con el contenido en constituyentes fitoquímicos, ya que al aumentar las horas de exposición a la luz y/o el estrés lumínico aumenta el contenido en constituyentes antioxidantes de las hojas, ya que están implicados en los mecanismos de fotoprotección de la planta (Wang y Frei, 2011). Además del papel de estos constituyentes como sistema de defensa, muchos metabolitos secundarios son bien conocidos como compuestos bioactivos beneficiosos para la salud los cuales están relacionados con las propiedades anticancerígenas, antioxidantes y anti-inflamatorias (Balandrin y col., 1985; Kris-Etherton y col., 2002; Reddy y col., 2003).

En ‘hojas jóvenes’ de lechuga y espinaca, varios estudios muestran que el contenido en compuestos fenólicos y carotenoides se incrementa en cultivos expuestos a altas intensidades lumínicas (Howard y col., 2002; Li y Kubota, 2009; Oh y col., 2009; Zhou y col., 2009; Esteban y col., 2014). En el caso de variedades de ‘hojas jóvenes’ pigmentadas, la época de cultivo puede afectar además a la coloración de la hoja y por tanto a su calidad visual. Estudios llevados a cabo en campo abierto en distintas

variedades de lechuga ‘baby’ pigmentada muestran que a medida que avanza la fecha de recolección hacia cultivos de primavera, las hojas presentaron un mayor contenido en compuestos antioxidantes, en particular en antocianos, junto con una coloración más rojiza, aunque la intensidad de la respuesta mostró un importante componente genético (Marin y col., 2015).

Por otro lado, hay que tener en cuenta el efecto de la utilización de sistemas de cultivo protegido o en invernadero frente al cultivo en campo abierto. El cultivo protegido o en invernadero es uno de los sistemas empleados en el cultivo de ‘hojas jóvenes’ para proteger las hojas de daños mecánicos (viento, insectos etc.), con la desventaja de proporcionar altas temperaturas y baja intensidad de luz. En este sentido, estudios realizados en el cultivo bajo malla muestran que el cultivo protegido redujo la acumulación de flavonoides en espinaca (Bergquist y col., 2007), la capacidad antioxidante en tatsoi (Zhao y col., 2007) y el contenido en glucosinolatos en col china (He y col., 2000), comparado con cultivos en campo abierto. En lechuga pigmentada cultivada bajo distintos tipos de plásticos se observó que con materiales que permiten una exposición a mayores intensidades lumínicas se obtuvo un producto con una mayor concentración de compuestos antioxidantes y una coloración más rojiza (García-Macías y col., 2007). En el cultivo en invernadero y con los sistemas tecnológicos adecuados se pueden controlar los factores ambientales como la intensidad de luz y la temperatura, permitiendo el cultivo fuera de temporada o en condiciones ambientales adversas aunque con el sobrecoste que ello implica (Rouphael y col., 2012).

5.4 Factores agronómicos

5.4.1 Sistemas de cultivo: cultivo con suelo y sin suelo

En los últimos 20 años, el sistema de cultivo tradicional en suelo ha sido sustituido cada vez más por sistemas de cultivo sin suelo o hidropónicos (Nicola y col., 2009).

Existen numerosos tipos de cultivo sin suelo implementados en diferentes países como el cultivo hidropónico NGS (New Growing System), el sistema NFT (Nutrient Film Technique) y los sistemas de flotación y aeropónicos, entre otros (Johnson, 2008; Fallovo y col., 2009). El sistema de cultivo hidropónico permite obtener cultivos de forma más precoz, con una homogeneidad cualitativa y cuantitativa en la producción, y en muchos casos permite incrementar la vida útil de determinadas hortalizas de hoja para IV Gama por el control tan preciso de la solución nutritiva (Fontana y Nicola, 2008, 2009). Además, este sistema permite obtener cultivos en alta densidad de plantación, por lo que este sistema se está implementando en productos de alto valor añadido como el caso de ‘hojas jóvenes’ para IV Gama.

Estudios realizados en lechuga de cabeza muestran que, comparado con el cultivo tradicional, el cultivo sin suelo proporcionó un producto de ciclo de cultivo más corto, mayor contenido en compuestos bioactivos, menor respuesta al pardeamiento del producto procesado y mayor control del crecimiento microbiano, aunque como ocurre en otros estudios la intensidad en la respuesta depende del genotipo estudiado (Selma y col., 2012).

Estudios llevados a cabo en ‘hojas jóvenes’ de berro, canónigo y rúcula han puesto de manifiesto que en cultivo sin suelo se obtiene mayor producción de cultivo en términos de peso fresco y en menor tiempo que en cultivo con suelo con una calidad óptima para su procesado en IV Gama (Fontana y Nicola, 2008, 2009).

5.4.2 Nutrición del cultivo

La gestión de la fertilización del cultivo de hortalizas de hojas tiene un fuerte impacto en la calidad comercial, nutricional y organoléptica de las mismas (Rouphael y col., 2012).

El cultivo comercial de lechuga en campo requiere unos niveles adecuados de nitrógeno (N_2), calcio (Ca^{2+}) y potasio (K^+) para garantizar una calidad postcosecha adecuada a lo largo de la vida útil del producto envasado (Poulsen y col. 1995; Hoque y col., 2010). Un exceso de N_2 ocasiona enfermedades y acelera el deterioro postcosecha (Hoque y col., 2010) y reduce el contenido en azúcares, vitamina C y materia seca (Poulsen y col. 1995) mientras que un déficit de N_2 disminuye la producción en campo. Por otro lado, el K^+ está implicado en la apertura estomática y un déficit en este ión aumenta la susceptibilidad frente a patógenos y puede interferir en la absorción del Ca^{2+} y del magnesio (Ma^{2+}) (Bonilla, 2008).

En el cultivo sin suelo de hortalizas de hoja, la concentración total de nutrientes aportada es uno de los aspectos más importantes. Los niveles demasiado elevados pueden inducir un estrés osmótico, toxicidad y desequilibrio nutricional, mientras que los niveles demasiado bajos pueden conducir síntomas por deficiencias nutricionales (Falovo y col., 2009; Luna y col, 2013a). En el cultivo sin suelo de lechuga se ha observado que el nivel de fósforo aportado puede afectar a la concentración de compuestos implicados en proporcionar un sabor desagradable en el producto que puede influir en su aceptación por parte del consumidor (Seo y col., 2009). Estudios realizados en espinaca ‘baby’ en cultivo hidropónico muestran que el aporte simultáneo de nitrato (NO_3^-) y NH_4^+ como fuente de nitrógeno aumenta la calidad del producto con una reducción en la acumulación de oxalatos y un aumento en la concentración de compuestos antioxidantes, sin afectar a la producción de biomasa del cultivo (Lin y col., 2014). Del mismo modo, esta combinación de iones como aporte de nitrógeno reduce la acumulación de nitratos en berro en cultivo hidropónico por debajo del límite permitido para su comercialización (Fontana y Nicola, 2008).

5.4.3 Manejo del riego y salinidad del agua de riego

La correcta gestión del aporte de agua es fundamental en el cultivo de hortalizas de hojas para IV Gama ya que puede afectar al rendimiento del cultivo y a la calidad general del producto envasado (Gil y col., 2013). El exceso de riego reduce la producción de la cosecha y aumenta el riesgo de desarrollo de microorganismos en el tejido vegetal, acortando la vida útil tras el procesado (Coelho y col., 2005; Luna y col., 2012). Por otro lado, los mismos autores han observado que un riego deficitario puede provocar un estrés hídrico, reduciendo el rendimiento del cultivo.

La respuesta al estrés hídrico es un tema de gran interés ya que gran parte de la producción de ‘hojas jóvenes’ se cultiva en zonas donde existen graves problemas de sequía y abastecimiento de aguas para riego, afectando a la conductividad eléctrica del agua y del suelo de cultivo. La agricultura intensiva tiene grandes requisitos de agua, y combinado con una mayor incidencia de eventos de sequía extrema ha obligado al uso de agua de calidad inferior para riego. La salinización del suelo es uno de los principales problemas que ocurren en las prácticas agrícolas intensivas, especialmente en las zonas áridas y semiáridas. En España, aproximadamente de los 3,5 millones de hectáreas de tierras de regadío el 3% está afectado por acumulación de sales y otro 15% está en riesgo grave de afectación (Acosta y col., 2011).

Existen varios estudios que ponen de manifiesto la importante influencia que puede tener el estrés salino en la calidad poscosecha de hortalizas de hoja. En este sentido, hay que tener en cuenta que en plantas afectadas por estrés salino se ven limitados algunos procesos como la expansión de la superficie de la hoja, el crecimiento de la planta y el metabolismo primario del carbono, debido al desequilibrio nutricional, al estrés osmótico, al déficit de agua y al estrés oxidativo (Hu y col., 2007; Kim y col., 2008; Parida y Das, 2005; Shalhevet y Hsiao, 1986). Además, las plantas pueden alterar los niveles de metabolitos secundarios tales como compuestos fenólicos y terpenoides para

mejorar sus sistemas de defensa contra las agresiones, especialmente en respuesta al estrés oxidativo (Wahid y Ghazanfar, 2006). En algunos casos un estrés hídrico controlado durante el crecimiento de la planta puede tener efectos beneficiosos en las características del producto conservado (Gil y col., 2013).

En lechuga ‘baby’ se ha observado que el estrés salino aumenta la plasticidad de las paredes celulares, reduce el tamaño de las células epidérmicas, aumenta la presión osmótica del tejido y proporciona un producto con mayor aceptabilidad y vida útil (Clarkson y col., 2003). Otros trabajos realizados en lechuga ‘baby’ describen que el riego con agua con alta conductividad eléctrica aumenta el contenido en carotenoides de las hojas sin afectar a su calidad visual (Kim y col., 2008). Además, el estrés salino puede mejorar las propiedades del producto envasado con una reducción en la actividad oxidativa y pardeamiento, y una reducción en la actividad respiratoria del producto, manteniendo su color y textura (Chisari y col., 2010; Scuderi y col., 2011).

5.4.4 Momento del día para la recolección

La hora del día a la que se realiza la recolección puede afectar a la calidad y composición nutricional de las hortalizas de hoja para IV Gama (Khalid y col., 2009; Moghaddam y col., 2013; Hasperué y col., 2013, 2014).

En ‘hojas jóvenes’ existen estudios que describen una mejor calidad durante la vida útil del producto procesado cuando la recolección de las hojas se realiza durante la noche (Clarkson y col., 2005). Estos autores atribuyen esta mejoría a las características biofísicas de las paredes celulares de la hoja, presentando las hojas al final del día una mayor extensibilidad de su pared celular y una mayor acumulación de carbohidratos (Clarkson y col., 2005). Estos cambios pueden deberse a cambios en los factores ambientales como son la temperatura, la intensidad de luz y la disponibilidad de agua (Veit y col., 1996; Fan y col., 2014). Por otro lado, existen ritmos biológicos generados

endógenamente en la planta que están sincronizados con factores ambientales como la luz y la temperatura, y que se repiten aún cuando estos factores ambientales se mantienen constantes (Millar, 2004; Salomé y McClung, 2005; McClung, 2006).

En espinaca, se relacionan algunos cambios diarios con cambios en la temperatura y en la intensidad de luz. Por ejemplo, los niveles de proteínas de choque térmico y las concentraciones de nitratos y ácido ascórbico varían significativamente en ciclos de 24 horas (Li y col., 2000; Chang y col., 2013).

La recomendación general para la recolección de hortalizas de hoja se centra en el manejo de la temperatura del producto cosechado. Para estos productos tan sensibles a las altas temperaturas se recomienda evitar la recolección en las horas del día con temperaturas excesivamente calurosas (Thompson y col., 2002). En este sentido, la temperatura del producto cosechado debe mantenerse lo más baja posible, por lo que se recomienda cosechar a primera hora del día o durante la noche (Thompson, 1998; Thompson y col., 2008). Sin embargo, estudios específicos llevados a cabo en distintas hortalizas de hoja muestran que existe una respuesta variable dependiendo del tipo de cultivo. En brócoli, la recolección al final del día mantiene el color de la inflorescencia y los niveles de azúcares durante la conservación del producto procesado (Hasperué y col., 2014). En lechuga, Moccia y col. (1998) observaron que la calidad postcosecha de distintas variedades de lechuga se ve afectada por el momento del día en el que se lleva a cabo la recolección, variando el momento óptimo dependiendo de la variedad. En lechuga en cultivo hidropónico, el mayor rendimiento de cosecha se obtuvo cuando la recolección se realizó al amanecer (Gent, 2012). En ‘hojas jóvenes’, incluyendo Lollo Rossa, rúcula y acelga roja, Clarkson y col. (2005) observaron que la vida útil aumentaba significativamente cuando la cosecha se llevaba a cabo al final del día (22:00 h), aunque la respuesta dependía de la variedad analizada. Estos trabajos sugieren que el

momento óptimo para la recolección está fuertemente influenciado tanto por el genotipo como por factores ambientales.

6. Factores postcosecha que afectan a la calidad de ‘hojas jóvenes’ para IV Gama

6.1 Técnicas de pre-enfriamiento

En hortalizas de hoja el tiempo transcurrido entre la recolección y el enfriamiento del producto debe ser reducido al máximo ya que los retrasos en el enfriamiento conducen a una reducción en la vida útil y calidad de producto, especialmente en hortalizas de hoja de pequeño tamaño debido a su alta susceptibilidad para la deshidratación (Cantwell y Kasmire, 2002)

Los principales métodos de pre-enfriamiento de hortalizas de hoja han sido descritos en el **apartado 3.2** de esta introducción general y representados en la **Figura 1** e incluyen: (i) el enfriamiento en cámara, (ii) el enfriamiento por aire forzado, (iii) el hidro-enfriamiento, (iv) el enfriamiento por vacío, con multitud de variaciones dentro de estas técnicas. Algunos productos pueden ser enfriados por cualquiera de estos métodos, mientras que otros productos pueden ver afectada su calidad negativamente en función de la técnica de pre- enfriamiento aplicada (Wang, 1993). El enfriamiento en cámara (i) destaca por su sencillez en el diseño, operatividad y por la reducida inversión necesaria en equipo, sin embargo, presenta serias limitaciones debido a que es un sistema demasiado lento para la mayoría de productos hortofrutícolas (Thompson y col., 2002, 2008). El sistema de enfriamiento por aire forzado (ii) es uno de los sistemas de enfriamiento más adaptados a un amplio rango de productos (Thompson, 1998). Es mucho más rápido que las cámaras de enfriamiento debido a que el aire frío circula a través de los contenedores en lugar de alrededor de ellos y permite que el aire frío tenga un contacto directo con el producto caliente (Thompson y col., 2002). Sin embargo, este sistema posee una baja eficiencia energética y puede causar una excesiva pérdida de

agua en algunos productos (Thompson y col., 2008). El sistema de hidro-enfriamiento (iii) evita la deshidratación en hortalizas de hoja e incluso puede suponer una recuperación en hojas deshidratadas debido al aporte de agua. Sin embargo, en algunas hortalizas de hoja, el agua remanente en superficie puede potenciar el desarrollo de podredumbres (Brosnan y Sun, 2001). Por otro lado, el enfriamiento por vacío (iv) destaca como uno de los sistemas más eficientes de enfriamiento el cual es ampliamente utilizado en lechugas de cabeza como la lechuga iceberg (Sun y Brosnan, 1999; He y col., 2004). Existen estudios que muestran también la eficacia en otras hortalizas como brocoli (Sun, 1999), espinaca (Sun, 2000; Xie y col., 2013) y col china (Sun, 2000). Una desventaja del enfriamiento por vacío es que puede causar una excesiva deshidratación de las hojas (McDonald y Sun, 2000), aunque se han desarrollado varios métodos para compensar esta pérdida de agua, como es la humidificación del producto previa al proceso de enfriamiento (Sun, 1999) o la instalación de pulverizadores de agua en el interior de la cámara para humedecer el producto (Zheng y Sun, 2004; Thompson y col., 2008). En el caso de ‘hojas jóvenes’ para IV Gama no existe información detallada acerca de las condiciones óptimas de pre-enfriamiento y la mayor parte de la información disponible es parte del conocimiento técnico de las propias empresas productoras y procesadoras. Hoy en día, este tipo de producto es pre-enfriado siguiendo las recomendaciones generales para hortalizas de hojas que recomienda que el enfriado sea lo más rápido posible mediante sistemas como el hidro-enfriamiento o el enfriamiento por vacío (Wright, 2004; Acedo, 2010).

6.2 Manejo del producto desde la cosecha hasta su distribución y venta

Desde el mismo momento de la recolección y a lo largo de todas las etapas de producción (recolección, transporte, procesado y distribución), las hortalizas de hoja pueden verse sometidas a una serie de daños físicos que afectan a la calidad y vida útil

(Miller, 2003; Toivonen y Hodges, 2011). Las hortalizas de hoja y en especial las ‘hojas jóvenes’ son muy sensibles a cortes, impactos, compresiones, abrasiones, punciones, etc., que provocan la ruptura celular y la liberación del contenido intracelular, acelerando la degradación del producto. Además, en la superficie de las hojas a menudo aparecen heridas que quedan expuestas al aire y pueden constituir focos de contaminación microbiana (Cantwell y col., 1998; Hodges y col., 2000).

Las propias etapas de procesado (lavado, secado y envasado) potencian el deterioro fisiológico acelerado, los cambios bioquímicos y la degradación por microorganismos alterantes en las hortalizas de hoja (Salveit, 1997; O’Beirne y Francis, 2003), pudiendo resultar en una degradación del color, la textura y del sabor del producto (Kabir, 1994; Varoquaux y Wiley, 1994; Allende y col., 2006).

Estos daños físicos en las hojas se van acumulando a lo largo de las etapas del proceso, y su incidencia y severidad dependerán del cuidado en el manejo del producto durante las operaciones manuales y de la severidad de los procesos mecanizados a los que se ve sometido el producto desde la cosecha hasta la distribución y venta (Hodges y col., 2000; Kader, 2002)

6.3 Condiciones de temperatura y humedad relativa durante la conservación

El control de la temperatura a la que se ve expuesta el producto es el factor más importante tras la recolección y constituye el método más efectivo para frenar el deterioro y mantener la calidad a lo largo de la vida útil (IFPA y PMA, 1999; Jacxsens y col., 2002; Luo y col., 2009). La exposición del producto a bajas temperaturas durante la conservación frena el metabolismo fisiológico del tejido vegetal y controla significativamente la proliferación de microorganismos (Smyth y col., 1998; Jacxsens y col., 2002; Luo y col., 2009). Por lo tanto, para asegurar la calidad óptima de producto

envasado es de vital importancia que se mantenga el rango de temperaturas recomendadas (Evans y col., 2007, Kou y col., 2015).

La Administración de Medicamentos y Alimentos estadounidense (Food and Drug Administration, FDA) en 2009 actualizó su normativa incluyendo como requisito para hortalizas de hoja para IV Gama el mantenimiento de temperaturas iguales o inferiores a 5 °C para minimizar la proliferación de patógenos a lo largo de la cadena de distribución (FDA, 2013). La recomendación general para ‘hojas jóvenes’ para IV Gama especifica que deben mantenerse por debajo de 2 °C durante su conservación para alcanzar una vida útil entre 7-10 días, aunque la vida útil alcanzada del producto depende del material vegetal (Cantwell y col., 1998; Wright, 2004). En espinaca ‘baby’ Kou y col. (2014) observaron que temperaturas de conservación entre 1-4 °C mantienen la calidad hasta 18 días tras el procesado, mientras que temperaturas superiores a 8 °C provocan una reducción de la vida útil con el incremento de la pérdida de electrolitos del tejido, amarilleamiento de las hojas, podredumbres y desarrollo de malos aromas.

Aunque el mantenimiento de una temperatura óptima de conservación supone un punto crítico para preservar la calidad de hortalizas de hojas para IV Gama, asegurar unas condiciones óptimas durante el transporte y la distribución del producto supone todo un reto debido a los problemas logísticos que aparecen a lo largo de la cadena de distribución (de Frias y col., 2015; Kou y col., 2015).

Por otro lado, dada la sensibilidad de las hortalizas de hoja a la pérdida de agua tras la cosecha, el mantenimiento del producto dentro del rango óptimo de humedad durante la conservación constituye un punto crítico para la reducción de las pérdidas postcosecha y el mantenimiento de la calidad del producto envasado (Kader, 2002). La deshidratación debida a los procesos de transpiración de las hojas constituye la principal

causa de pérdidas económicas postcosecha, fijándose en un máximo del 3% la pérdida de peso admitida en hortalizas de hoja para IV Gama (Paull, 1999; Agüero y col., 2011).

La recomendación general para la conservación específica de hortalizas de hoja es que debe llevarse a cabo en frío y en unas condiciones de humedad cercanas al 95% de humedad relativa (Thompson y col., 2008). Esta recomendación también se aplica en el caso de ‘hojas jóvenes’ para IV Gama (Cantwell y col., 1998; Wright, 2004). Tras el lavado de las hojas, la alta humedad durante la conservación se consigue gracias al envasado empleando polímeros plásticos con baja permeabilidad al vapor de agua (Paull, 1999; Gil y Tudela, 2003). Sin embargo, la exposición de las hojas a un exceso de agua tras la recolección puede suponer una situación desfavorable que reduzca la vida útil (Ben-Yehoshua y Rodov, 2003). Además, un exceso de agua durante la conservación puede favorecer el crecimiento de bacterias alterantes en el interior del envase y acortar la vida útil (Herner y Krahn, 1973; Varoquaux y Mazollier, 2002; Medina y col., 2012). En espinaca ‘baby’ se ha observado que la exposición en condiciones de alta humedad relativa desde la cosecha hasta el procesado aumenta la proliferación de microorganismos alterantes y acorta la vida útil de producto procesado (Medina y col., 2012).

En el caso de ‘hojas jóvenes’, son pocos los estudios que analizan el efecto de las condiciones de humedad relativa durante el acondicionamiento y tras el procesado y conservación, factor de vital importancia no sólo cuando se trata de ‘monoproductos’ sino también cuando se desea determinar la compatibilidad de distintos tipos de hojas para su envasado como ‘mezclas’.

6.4 Atmósfera de conservación

El uso de envases permite la utilización de una atmósfera modificada para controlar los cambios fisiológicos y de calidad en productos de IV Gama (Toivonen y DeEll,

2002). Después de la reducción de la temperatura del producto, el uso de atmósferas modificadas se considera el segundo método más efectivo para prolongar la comercialización de los productos de IV Gama (Schlimme y Rooney, 1994; Gil y Tudela, 2003).

El potencial del envasado en atmósfera modificada ha sido ampliamente documentado para un amplio rango de productos de IV Gama (Brecht y col., 2003; Jacxsens y col., 2001; Saltveit, 2003; Gorny, 2001). De hecho, existen en el mercado multitud de polímeros y mezclas de gases que pueden ser utilizados para la optimización del envasado de un amplio rango de productos hortofrutícolas en función de sus características (Gorny, 2003).

En un envasado en atmósfera modificada, en general, la composición gaseosa en el interior del envase contiene una baja concentración de O₂ y alta de CO₂, dependiendo de la temperatura, el peso del producto, la tasa respiratoria y la permeabilidad a estos gases del polímero utilizado (Cameron y col., 1995). Generalmente, una concentración baja en O₂ y/o alta en CO₂ reduce la tasa de respiración y el deterioro del producto (Kader, 1986). Sin embargo, concentraciones excesivamente bajas de O₂ pueden inducir un metabolismo anaerobio y la producción de compuestos responsables de malos olores y sabores (Gil y col., 1998; Toivonen y Brummell, 2008).

En el caso de ‘hojas jóvenes’ para IV Gama, el efecto del envasado en atmósfera modificada ha sido ampliamente estudiado en espinaca ‘baby’ debido a que la calidad está fuertemente afectada por la atmósfera de conservación (Babic y Watada., 1996; Ko y col., 1996, McGill y col., 1996, Tudela y col., 2013). Se ha observado que bajas concentraciones de O₂ reducen la actividad respiratoria del producto, la pérdida de peso y de compuestos antioxidantes, a la vez que frena el desarrollo de microorganismos alterantes (Babic y Watada., 1996; Ko y col., 1996; Gil y col., 1999). Sin embargo, se

ha observado en espinaca 'baby' que en atmósferas con bajas concentraciones de O₂ y altas de CO₂ hay pérdidas de calidad debido al metabolismo anaerobio con el desarrollo de malos aromas (Ko y col., 1996, McGill y col., 1996, Tudela y col., 2013). En espinaca 'baby', Tudela y col. (2013) estudiaron la conservación en atmósfera modificada con distintas concentraciones de O₂ y CO₂ y su influencia en la calidad y vida útil así como en el desarrollo de malos aromas y en los procesos de senescencia del producto desde el punto de vista histológico. Las muestras expuestas a bajo O₂ desarrollaron peores malos aromas al final de la conservación, aunque controlaron mejor el crecimiento microbiano, conservaron mejor la calidad visual del producto y retardaron los procesos de senescencia respecto a las conservadas con niveles moderados de O₂ (Tudela y col., 2013).

Es necesario profundizar en el conocimiento del efecto de la atmósfera de conservación ya que proporciona tanto ventajas como inconvenientes en función del parámetro analizado. Por lo tanto, se deben buscar soluciones técnicas de envasado que permitan mantener la calidad del producto al final de la conservación.

6.5 Condiciones de iluminación durante la conservación

Los productos de IV Gama se comercializan a menudo bajo condiciones no controladas de iluminación a lo largo de la cadena de distribución (Glowacz y col., 2014). Durante la conservación, la influencia de la exposición a distintas condiciones lumínicas ha sido estudiada en numerosas hortalizas, sin embargo su efecto es variable con respuestas positiva o negativas en función del producto analizado (Lester y col., 2010, Costa y col., 2013, Gergoff Grozeff y col., 2013; Braidot y col., 2014; Glowacz y col., 2014). En general, la exposición a la luz de hortalizas de hoja para IV Gama durante su conservación afecta a algunos parámetros de calidad, potenciando la pérdida de agua de la hoja (Lester y col., 2010; Zhan y col., 2013; Glowacz y col., 2014; Xiao y

col., 2014) y de calidad visual (Martínez-Sánchez y col., 2011; Xiao y col., 2014), así como la internalización microbiana (Kroupitski y col., 2009). También puede favorecer otros parámetros de calidad como el preservar el contenido en clorofila (Costa y col., 2013; Gergoff Grozeff y col., 2013; Zhan y col., 2013), y aumentar el contenido en compuestos bioactivos (Noichinda y col., 2007; Lester y col., 2010; Zhan y col., 2012; Gergoff Grozeff y col., 2013; Braidot y col., 2014). Además, la exposición a distintas condiciones lumínicas afecta a la composición gaseosa en el interior del envase, ya que bajo condiciones de iluminación se prosigue la actividad fotosintética de las hojas, liberando O₂ en el envase y reduciendo el contenido en CO₂ (Olarte y col., 2009; Martínez-Sánchez y col., 2011; Glowacz y col., 2014). Sin embargo, es necesario determinar si los cambios observados en la calidad del producto se deben a un efecto directo por la exposición a la luz o constituyen una consecuencia indirecta por la composición gaseosa generada en el interior del envase bajo condiciones lumínicas.

CAPÍTULO II

OBJETIVOS

En el mercado de la IV Gama la innovación es un factor clave para satisfacer la demanda de nuevos productos más atractivos y saludables por parte de unos consumidores cada vez más exigentes. A pesar de que las ensaladas de ‘hojas jóvenes’ son un alimento muy demandado, como producto no presentan una calidad constante ni homogénea a lo largo de todo el año y plantea serios problemas tanto a productores como a procesadores.

Se han identificado algunas causas que influyen en la pérdida de calidad de este producto y que pueden tener su origen en el cultivo, durante el procesado o bien a lo largo de la vida útil, provocando la pérdida de las características sensoriales, físico-químicas, microbiológicas y nutricionales.

En esta tesis doctoral se proponen las siguientes estrategias de intervención para la mejora de la calidad y vida útil de este alimento en IV Gama:

- Estrategias de intervención precosecha.
 - Influencia del estrés salino en la calidad de lechuga ‘multi’ como materia prima y posibles implicaciones en su procesabilidad (**Capítulo IV**).
 - Efecto del momento del día de recolección en la calidad de espinaca ‘baby’ mínimamente procesada (**Capítulo V**).
- Estrategias de intervención postcosecha.
 - Influencia del tiempo de demora hasta el procesado en la calidad de la espinaca ‘baby’ mínimamente procesada (**Capítulo V**).
 - Efecto de distintos sistemas de enfriado de uso industrial en la calidad de espinaca ‘baby’ mínimamente procesada (**Capítulo VI**).
 - Influencia de la exposición en distintas condiciones de luz y de atmósfera en vida útil de espinaca ‘baby’ mínimamente procesada (**Capítulo VII**).

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA

En el desarrollo de esta tesis doctoral gran parte del esfuerzo se ha centrado en la optimización de medidas objetivas para su aplicación en el estudio de ‘hojas jóvenes’ para IV Gama. Por las peculiaridades del producto ha sido necesario adaptar una serie de técnicas ampliamente aplicadas en otros productos para IV Gama. También se han aplicado otras técnicas más relacionadas con la medida del estrés fisiológico en plantas.

Destaca entre otras metodologías la optimización del análisis mediante microscopía óptica del daño tisular con la identificación de síntomas morfológicos de daño celular, así como su aplicación en el estudio de cambios anatómicos y celulares en respuesta a factores precosecha. A su vez, destaca la aplicación de técnicas de identificación de estrés vegetal para evaluar el estado del producto durante su conservación, como son la pérdida de electrolitos, la peroxidación de lípidos y la fluorescencia de la clorofila.

A continuación se detallan los materiales y métodos aplicados en el desarrollo de los trabajos incluidos en esta tesis doctoral.

1. Material vegetal

El material vegetal estudiado en la presente tesis doctoral corresponde a lechuga tipo iceberg (*Lactuca sativa* L. var *capitata*) obtenida a partir de semillas de la variedad ‘Tempo neutro’ (**Capítulo IV**), así como distintas variedades de espinaca ‘baby’ (*Spinacia oleracea* L.) cultivadas en condiciones comerciales (**Capítulos V-VII**). El material vegetal necesario para la realización de los estudios en espinaca ‘baby’ ha sido proporcionado por la empresa Primaflor S.A.T. a la que se le agradece su colaboración en los trabajos llevados a cabo tanto en el cultivo como en la planta de acondicionamiento de material vegetal.

2. Condiciones de cultivo

2.1 Cultivo en cámara de crecimiento controlado

El estudio en lechuga ‘multi’ recogido en el **Capítulo IV** se llevó a cabo en una cámara de crecimiento controlado en las instalaciones del CEBAS-CSIC (Murcia), con una temperatura de 23 °C/ 18 °C (día/noche), un fotoperiodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad y una radiación fotosintéticamente activa (PAR) de 400 $\mu\text{moles m}^2 \text{s}^{-1}$. La siembra se llevó a cabo de forma directa sobre la superficie de contenedores de 17 L de capacidad que contenían solución nutritiva Hoagland. Cada semilla se colocó en el interior de unos cilindros de poliestireno que atravesaban la superficie del contenedor de forma que su parte inferior quedaba sumergida en la solución nutritiva. Durante todo el ensayo se utilizó solución nutritiva Hoagland con la siguiente composición: 7 mmol L⁻¹ K⁺, 4 mmol L⁻¹ Ca²⁺, 3 mmol L⁻¹ NO₃⁻, 1 mmol L⁻¹ Mg²⁺, 1 mmol L⁻¹ PO₄²⁻, 1 mmol L⁻¹ SO₄²⁻, 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ Fe²⁺, 2,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ B³⁺, 2 $\mu\text{mol L}^{-1}$ Mn²⁺, 2 $\mu\text{mol L}^{-1}$ Zn²⁺, 0,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ Cu²⁺ y 0,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ Mo⁶⁺; manteniéndose a un pH de 5,5. Finalizado el estudio las hojas se recolectaron manualmente para llevar a cabo las distintas determinaciones.

2.2 Cultivo en campo abierto

Las variedades de espinaca ‘baby’ de uso en IV Gama analizadas en los **Capítulos V-VII** fueron cultivadas en campo abierto y proporcionadas por la empresa Primaflor S.A.T. en Pulpí (Almería), quien llevó a cabo el manejo del cultivo en condiciones comerciales. La siembra se realizó de forma directa en camas elevadas con una densidad de plantación de 800 plantas m⁻². La fecha de recolección se estableció en función del tamaño de la hoja, fijándose el momento de la cosecha cuando alcanzaron un tamaño de hoja 5-12 cm incluido el peciolo. Tanto la siembra como la recolección de espinaca ‘baby’ se llevó a cabo de forma totalmente mecanizada por parte de la empresa colaboradora.

3. Crecimiento de la planta

El crecimiento de la planta al final del cultivo se evaluó mediante el registro en peso fresco de la parte aérea de la planta y el número de hojas de planta (en todas las plantas). Además, se registró el peso de la hoja en 10 hojas por tratamiento y se analizó el área de la hoja mediante análisis de imagen en 15 hojas por tratamiento. Las imágenes se captaron con una cámara reflex digital modelo Sony Alpha 200 (10 Mpx) y posteriormente se procesaron con el software ImageJ para Microsoft Windows.

4. Tasa de fotosíntesis y transpiración de la hoja

Los parámetros de intercambio de gases de la hoja se midieron usando un sistema de medición de fotosíntesis portátil (modelo LCA-4, ADC Bioscientific Ltd., Hoddesdon, Reino Unido) con una cámara para la hoja (PLC-4N de 11,35 cm²), configurado para un sistema abierto según lo descrito por Simón y col. (2013). Se midió la tasa de fotosíntesis y de transpiración en 30 hojas para cada condición justo antes de la recolección.

5. Procesado, envasado y conservación

El material vegetal recolectado fue transportado desde las fincas de Pulpí (Almería) hasta las instalaciones del CEBAS-CSIC en condiciones refrigeradas (150 Km). En función del objetivo del estudio, el material vegetal fue sometido o no a un enfriamiento en la etapas previas a su transporte, tal y como se recoge en los capítulos correspondientes. El procesado y obtención de la espinaca ‘baby’ en IV gama (**Capítulos V-VII**) se realizó simulando las condiciones y etapas aplicadas por la industria de IV gama en las instalaciones de CEBAS-CSIC a 4 °C (**Figura 3**). El material vegetal fue almacenado a 4 °C y 85% HR hasta su procesado. Siguiendo las condiciones comerciales, se seleccionaron las hojas que cumplían las especificaciones de calidad basadas principalmente en ausencia de defectos, para su procesado en IV Gama. Para ello, se colocaron en cestillos perforados y se pasaron a una cámara en

condiciones de higiene para la elaboración de alimentos a 4 °C, donde se sumergieron durante 30 s en depósitos de 40 L conteniendo agua de red clorada con 100 mg L⁻¹ de NaOCl a pH 6,5 ajustado con ácido cítrico. A continuación, los cestillos perforados se sacaron de los depósitos de agua permitiendo 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).

Tras el lavado y secado se procedió al envasado en atmósfera modificada (**Capítulos V-VII**), y para ello se pesó una masa de producto (100 g) por bolsa, la cual se confeccionó, llenó y selló de forma mecánica con una envasadora vertical (Etna 280-X model, Ulma, Oñati, Spain). Se empleó un polímero plástico de polipropileno (PP) de 35 µm de espesor (Amcor Flexibles, Bristol, UK), con unas características de permeancia al O₂, CO₂ y al vapor de agua de 2,629E⁻¹² mol m⁻² s⁻¹ Pa⁻¹, 9,84E⁻¹² mol m⁻² s⁻¹ Pa⁻¹ y 5,408E⁻⁶ mol m⁻² d⁻¹, respectivamente a 7 °C y 97% HR. El tamaño de la bolsa fue de 230 mm × 310 mm y se procedió al sellado de la bolsa en condiciones de aire ambiental. En función del objetivo del estudio se procedió o no a la realización de una macroperforación manual con una aguja de 0,5 mm de diámetro, tal y como se recoge en los capítulos correspondientes.

Para el envasado en atmósfera controlada (**Capítulo VII**), tras el procesado de las hojas se conservó una masa de producto (300 g) en frascos de cristal de 5 L conectados a un sistema de flujo que proporcionó diferentes atmósferas controladas humidificadas a un flujo constante, en las condiciones que se recoge en el capítulo correspondiente.

La duración y las condiciones de temperatura e iluminación durante la conservación del material procesado vienen especificadas en los capítulos correspondientes.

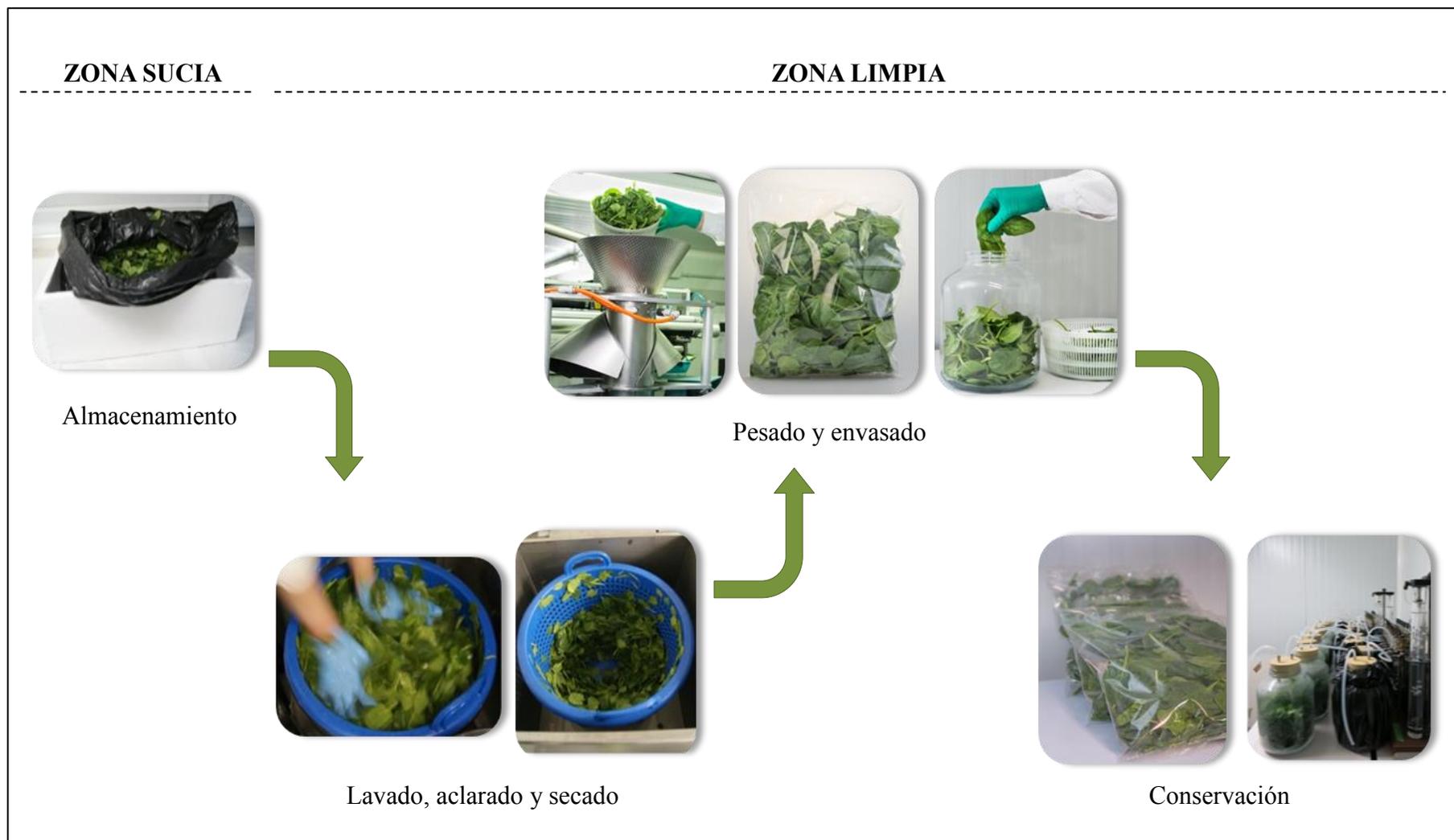


Figura 3. Esquema del procesado, envasado y conservación del material vegetal en las instalaciones de CEBAS-CSIC.

6. Composición atmosférica en el interior del envase y actividad respiratoria

La composición gaseosa en el espacio de cabeza de las bolsas (**Capítulos V-VII**) y la composición atmosférica en el interior de los frascos (**Capítulo VII**) se monitorizó periódicamente con un analizador de O₂ con una célula de detección electroquímica de cerámica de óxido de circonio (CG-1000, Ametek, Thermox Instruments Co., Pittsburgh, PA, USA) y un analizador de CO₂ con detector de infrarrojos (Via 510, Horiba Instruments Co., Irvine, CA, USA). Se analizaron muestras de 0,2 mL que se tomaron través de ‘septums’ de silicona herméticos utilizando jeringuillas de plástico graduadas. Se realizó el seguimiento de las presiones parciales de O₂ y CO₂ las cuales se expresaron en kPa. El número de réplicas y tiempos de medida analizados vienen especificados en cada caso en los capítulos correspondientes.

La actividad respiratoria del producto en conservación se relaciona como con el nivel de estrés y la velocidad de deterioro del producto, ocasionando la modificación de la atmósfera del interior del envase. La actividad respiratoria del producto se midió en los **Capítulos V-VII** en sistema permeable tal y como describen Luna y col. (2013b) con algunas modificaciones. En la envasadora semiautomática, se envasaron réplicas de 100 g de producto fresco tal y como se describe en el **apartado 3** del presente capítulo. Se empleó un polímero plástico de polipropileno (PP) de 35 μm de espesor (Amcor Flexibles, Bristol, Reino Unido), con una permeanza al O₂, CO₂ y H₂O de $2,629E^{-12}$ mol m⁻² s⁻¹ Pa⁻¹, $9,84E^{-12}$ mol m⁻² s⁻¹ Pa⁻¹ y $5,408E^{-6}$ mol m⁻² d⁻¹, respectivamente a 7 °C y 97% HR. El tamaño de la bolsa fue de 230 mm × 310 mm y se procedió al sellado de la bolsa en condiciones de aire ambiental. Se registraron los cambios en O₂ desde 20,9 kPa iniciales en el interior de la bolsa en función del tiempo y se ajustaron a una curva para determinar la tasa respiratoria como propusieron Lee y col. (1996) en cuatro réplicas por condición evaluada. Se calculó la tasa respiratoria cuando la composición gaseosa en el

espacio de cabeza alcanzó 15 kPa (**Capítulos V-VI**) y 17 kPa (**Capítulo VII**) en las bolsas conservadas a 7 °C.

El calibrado y comprobación del correcto funcionamiento del analizador de infrarrojos se realizó con patrones de concentración conocida de O₂ (0,1, 0,5, 1, 5 y 10 kPa) y CO₂ (5 y 10 kPa) (Abelló Linde, Barcelona).

7. Evaluación de la calidad sensorial

La calidad sensorial del producto fue evaluado inmediatamente tras el procesado y periódicamente a lo largo de la conservación (**Capítulos V-VII**) según lo descrito por Tudela y col. (2013). La evaluación del producto se llevó a cabo a ciegas por un panel de 5 evaluadores entrenados. El material procedente de 4 envases individuales (aproximadamente 250 g) se mezcló homogéneamente en la misma bandeja para cada condición a evaluar. La evaluación se llevó a cabo inmediatamente tras retirar los envases de la cámara de conservación, en envases recién abiertos. Las bandejas se rotularon con códigos de 3 dígitos y se presentaron al azar a los panelistas que realizaron las evaluaciones de forma independiente sin comunicarse entre ellos.

Como parámetros de calidad del producto se evaluaron su calidad visual y textura, y como parámetros de alteración se evaluaron el desarrollo de malos aromas, podredumbres y nivel de hojas dañadas. La calidad visual del producto se evaluó considerando su frescura, apariencia, homogeneidad del color y brillo, asignando un valor en una escala hedónica de 9 puntos. En esta escala 9 representa la máxima calidad, 7 representa un producto de buena calidad, 5 marca el límite de aceptación, 3 se corresponde con un producto alterado y 1 representa un producto totalmente alterado. La textura del producto se evaluó en una escala de 5 puntos, donde 5 representa una textura óptima, 3 refleja una textura moderada y 1 representa una textura muy mala. Para los parámetros de alteración (desarrollo de malos aromas, podredumbres y nivel

de hojas dañadas) se utilizó una escala de 1 a 5 puntos, donde 1 refleja la ausencia de alteración, 3 se corresponde con un nivel moderado y 5 representa una alteración severa.

Los parámetros y tiempos de medida analizados vienen especificados en cada caso en los capítulos correspondientes

8. Análisis microbiológicos

La calidad microbiológica del producto se determinó mediante el recuento de bacterias psicrotrofas (**Capítulos V y VI**) y de bacterias del género *Pseudomonas* spp. (**Capítulos V-VII**) según lo descrito por Medina y col. (2012). Las muestras vegetales (30 g) se homogeneizaron en dos ciclos de 60 s con 0,1 % de agua de peptona tamponada estéril (BWP) (AES Laboratoire, Combourg, Francia) (dilución 1:10) en bolsas estériles con filtro (Seeward Medical, Londres, Reino Unido) para la homogenización de la muestra mediante un masticador (IUL Instrument, Barcelona). Se realizaron las diluciones necesarias de la muestra para la siembra con la misma agua de peptona. Los medios de cultivo y condiciones de incubación empleados para el recuento de los estos grupos microbianos fueron los siguientes: las bacterias psicrotrofas se enumeraron en un agar de recuento en placa (PCA) (Scharlau Chemie S.A., Barcelona) incubadas a 7 °C durante 7 días, mientras que las bacterias del género *Pseudomonas* spp se enumeraron en un medio *Pseudomonas* agar (Oxoid, Ltd., Basingstoke, Hampshire, Reino Unido) a 30 °C durante 24–48 h. Todas las muestras fueron analizadas por duplicado y cada recuento microbiológico correspondió a la media de tres muestras diferentes. Los recuentos se expresaron como log UFC g⁻¹.

9. Contenido en agua de la hoja

En el **Capítulo IV** la toma de muestras para determinar el contenido en agua de las hojas se llevó a cabo mediante el método descrito por Agüero y col. (2011) con

modificaciones. Se tomaron 20 g de trozos de hojas por tratamiento, se homogenizaron con una picadora comercial y se dividieron en 3 réplicas de unos 5 g por tratamiento registrando su peso (PF).

En los **Capítulos V-VII**, la toma de muestras se realizó siguiendo el método descrito por Viacava y col. (2010) con modificaciones. Se registró el peso de 3 hojas completas (PF) en 15 réplicas por tratamiento. Posteriormente se introdujo cada réplica en el interior de bolsas de cierre hermético (200 x 120 mm) con 200 mL de agua destilada en su interior (**Fotografía 4**). Las muestras se almacenaron durante 24 h a 4 °C en oscuridad y posteriormente se retiró el exceso de agua superficial de las hojas con papel absorbente y se pesaron las hojas para registrar su peso a máxima turgencia (PT).



Fotografía 4. Toma de muestras para la determinación del contenido relativo en agua (CRA) de las hojas.

En todos los casos, se determinó el peso seco de las muestras (PS) tras permanecer en una estufa con ventilación forzada a 65 °C (Thermocenter T C40/100, Salvis Lab, Rotkreuz, Suiza) durante 48 h hasta alcanzar un peso constante. El contenido en agua (CA*) y contenido relativo en agua (CRA) de la hoja se calculó en % según lo descrito por Viacava y col. (2010):

$$CA^* = \frac{PF - PS}{PF} \times 100$$

$$CRA = \frac{PF - PS}{PT - PS} \times 100$$

10. Potencial osmótico de las hojas

Para determinar el potencial osmótico de las hojas (Ψ_s) se tomaron 3 réplicas de 5 g de trozos de hojas por tratamiento y se congelaron a $-20\text{ }^\circ\text{C}$. Las muestras se centrifugaron a $2800 \times g$ durante 15 min (Centronic centrifuge, J.P. Selecta, Barcelona). La osmolaridad (c_s) del sobrenadante se analizó con un micro-osmómetro (Roebbling 13DR, Löser Messtechnik, Berlin, Alemania). El potencial osmótico (Ψ_s) se calculó según la ecuación de Van't Hoff: $\Psi_s = -R \times T \times c_s$, donde R es la constante de los gases ideales ($\text{m}^3 \text{ Pa mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$), T es la temperatura ($^\circ\text{K}$), y c_s es la osmolaridad (Osm m^{-3}).

11. Extensibilidad de la pared celular

Para analizar la resistencia física de la hoja se determinó la extensibilidad (elasticidad y plasticidad) de la pared celular de las hojas en al menos 10 hojas por tratamiento, siguiendo la metodología descrita por Clarkson y col. (2003) con modificaciones. Se seleccionaron trozos de la lámina de la hoja, se introdujeron en metanol puro y se almacenaron a $4\text{ }^\circ\text{C}$ en oscuridad durante 24 h. Previamente a la realización de las medidas de extensión de la hoja, los trozos obtenidos se rehidrataron sometiéndolos a 3 lavados de 15 min en agua destilada. Se aislaron secciones de hojas de $7 \times 10\text{ mm}$ tomadas de la zona adyacente a la vena principal de la hoja y paralela a ella (**Figura 4**). La extensibilidad de la pared celular se determinó utilizando un texturómetro (TA XT Plus, Stable Micro Systems, Godalming, Reino Unido). Los

fragmentos se sujetaron por sus extremos con 2 pinzas separadas 5 mm y se estiraron lentamente a una velocidad de 2 mm min^{-1} mediante el desplazamiento de la pinza inferior. La carga a la que se vio sometida el tejido se registró electrónicamente mediante el software Exponent (Stable Micro Systems, v. 4.09). Cada muestra de tejido fue extendida dos veces ejerciendo una carga de 20 g en cada extensión. Se calculó el porcentaje de plasticidad (% de extensión irreversible por 10 g de carga) y el porcentaje de elasticidad (% de extensión reversible por 10 g de carga) de la pared celular, según la metodología propuesta por Van Volkenburgh y col. (1983).

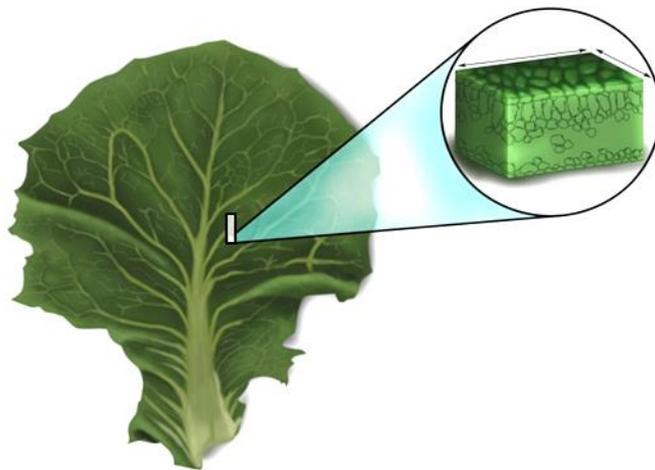


Figura 4. Esquema de la toma de muestras en las hojas para la determinación de extensibilidad de la pared celular y análisis histológicos.

12. Análisis histológicos

En los trabajos que forman la presente tesis doctoral se ha puesto a punto la metodología para realizar estudios histológicos en las hojas que permitan analizar tanto la anatomía interna del tejido vegetal como identificar síntomas de estrés a nivel celular. Para estos estudios se analizaron al menos 10 hojas por condición evaluada. Para la toma de muestras se aislaron fragmentos de lámina de hoja de 3 mm x 5 mm tomados de la zona adyacente a la vena principal de la hoja y paralela a ésta (**Figura 4**). Las

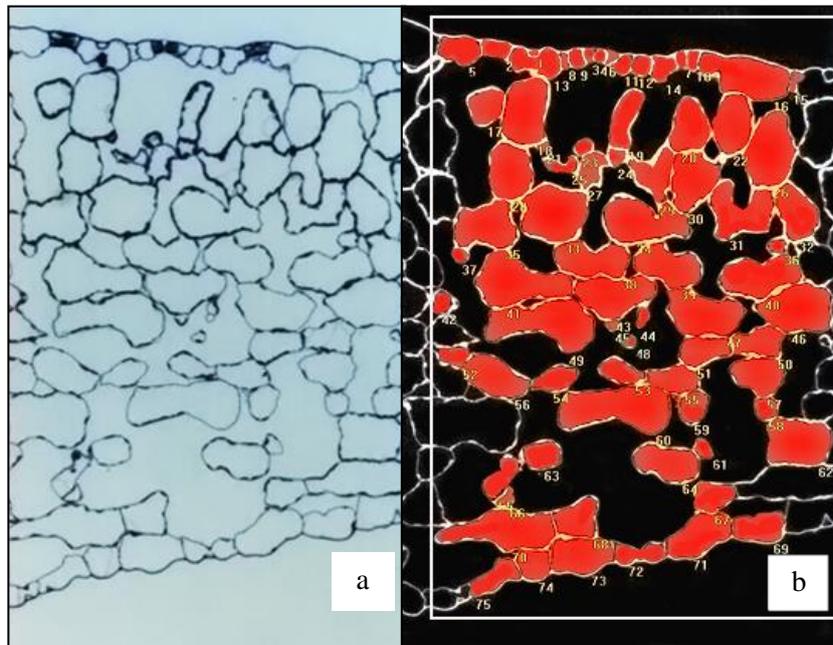
muestras fueron fijadas durante 2,5 h a 4 ° C en tampón fosfato de Na 0,1 M (pH 7,2) con glutaraldehído al 2,5% y paraformaldehído al 4% (**Fotografía 5**). El tejido fue sometido a una post-fijación en tetróxido de osmio al 1% durante 2 h. Las muestras se deshidrataron en una serie gradual de alcoholes y fueron embebidas en resina de Spurr. Los bloques fueron seccionados con un ultramicrotomo Leica (Leica Mikrosysteme, Hernalser Hauptstraße, Viena, Austria). Las secciones semifinas (0,5 µm) se tiñeron con azul de toluidina al 0,5% en tampón borato.



Fotografía 5. Fragmentos de hojas fijados para su posterior análisis histológico.

Para el análisis de las muestras al microscopio óptico se tomaron una serie de microfotografías de las secciones semifinas que fueron capturadas en un microscopio óptico Leica DMR (Leica, Wetzlar, Alemania) con una cámara digital acoplada. Para el estudio de la anatomía interna y morfología celular de la hoja, las imágenes fueron procesadas utilizando el software Leica QWin Pro V3 (Leica, Wetzlar, Alemania). Se analizaron un mínimo de 20 imágenes procedentes de 10 hojas por tratamiento. Se estableció en el tejido un área de estudio de tejido de 350 µm de ancho que incluía todo

el grosor de la hoja. En las medidas se analizaron todas la células incluidas en el área de estudio, excluyéndose los haces vasculares y las células que limitaban con los bordes laterales de esta área (**Fotografía 6**).



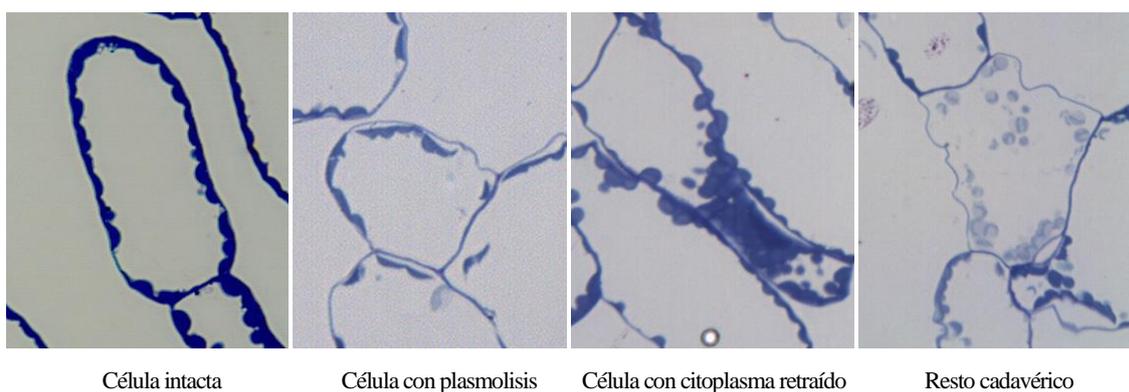
Fotografía 6. Imagen captada al microscopio óptico (a) y reconocimiento celular dentro del área de estudio mediante análisis de imagen (b).

Se determinó el área ocupada por epidermis, parénquima y espacios intercelulares, expresándose como % con respecto al área total. A su vez, se analizaron estos tejidos diferenciando epidermis superior e inferior, parénquima lagunar y parénquima en empalizada. Además se analizó el área y la forma de las células epidérmicas y parenquimáticas. Para evaluar la morfología celular se calculó su redondez como:

$$\text{Redondez} = \frac{\text{Perímetro}^2}{4\pi \times \text{área} \times 1,064}$$

En el **Capítulo IV** para el análisis de la ultraestructura celular, se visualizaron las hojas mediante el microscopio electrónico. Para ello, de los bloques estudiados al microscopio óptico se seleccionaron 3 bloques procedentes de 3 hojas diferentes por tratamiento. Se obtuvieron secciones ultrafinas (60-70 nm), las cuales fueron colocadas en rejillas de cobre y teñidas con acetato de uranilo. La ultraestructura del tejido se observó al microscopio electrónico de transmisión (JEOL JEM-1011, Tokyo, Japón) y se identificaron células con síntomas de plasmólisis (separación física entre la membrana plasmática y la pared celular).

En los **Capítulo VI y VII**, el daño a nivel celular en la hoja se analizó al microscopio óptico mediante la captura de imágenes de las secciones semifinas, como ya se ha comentado anteriormente. Para medir el daño celular en la hoja, las células fueron clasificadas en varias categorías (**Fotografía 7**): células intactas (células sin síntomas de daño), células dañadas (células con una separación entre la membrana plasmática y la pared celular o con una retracción del citoplasma) y restos cadavéricos (células con una ruptura de la membrana plasmática y una desorganización del citoplasma).



Fotografía 7. Imágenes captadas al microscopio óptico de células intactas y células con síntomas de daño celular.

Se evaluaron imágenes procedentes de al menos 10 hojas por condición evaluada, analizándose al menos 150 células por hoja. El daño celular se expresó como porcentaje de células dañadas con respecto al total de células evaluadas por hoja.

Los síntomas de daño analizados han sido identificados en otros estudios en células con morfología de apoptosis similar a muerte celular programada en células senescentes tras la aplicación de un estrés, en respuesta a patógenos o durante el desarrollo del tejido (Levine y col., 1996; Delorme y col., 2000; Kacprzyk y col., 2011; Reape y McCabe, 2013). En nuestro caso, el uso de muestras fijadas dificultó la distinción entre células vivas o senescentes. Sin embargo, la detección de estos síntomas morfológicos proporcionó información acerca de la severidad del daño ocasionado por las distintas condiciones evaluadas.

13. Pérdida de electrolitos

La medida de pérdida de electrolitos de las hojas se empleó como medida de la integridad de membrana y se analizó siguiendo el método propuesto por Fan y Sokorai (2005) con ligeras modificaciones. En cada réplica se tomaron 12 taleolas de 1 cm² procedentes de 12 hojas diferentes y se sumergieron en 15 mL de agua desionizada (**Fotografía 8**).



Fotografía 8. Toma de muestras para la determinación de pérdida de electrolitos de las hojas.

Después de 2 h de incubación en agitación a 150 rpm en una placa agitadora (INFORSAG, HT, Suiza) se registró la conductividad eléctrica (CE2h) de la disolución con un conductímetro (Modelo CM35, Crison, Barcelona, España). A continuación, el tejido junto con la disolución se sometió a un baño a 95 °C durante 20 min y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Posteriormente, se volvió a medir la conductividad eléctrica de la disolución resultante (CETOTAL). La pérdida de electrolitos se midió en 6 réplicas por tratamiento y se expresó en % según la siguiente ecuación:

$$\text{Pérdida de electrolitos} = \frac{\text{CE2h}}{\text{CETOTAL}} \times 100$$

14. Peroxidación de lípidos y pH de las hojas

La medida de la extensión de peroxidación de lípidos hace referencia al daño oxidativo de los lípidos de las membranas celulares. Se analizó en las hojas siguiendo el método descrito por Hernández y col. (2004) en base a la reacción de ácido tiobarbitúrico (TBA) que mide el contenido en malondialdehído (MDA) en el tejido en 4 réplicas por tratamiento. Muestras de tejido fresco (0,5 g) se homogeneizaron con ácido tricloroacético (TCA) al 0.1 % y se centrifugaron (12000 x g). El sobrenadante (0,5 mL) se mezcló con TBA al 0,5% diluido con TCA al 20% y se incubó a 95 °C durante 20 min. Pasado ese tiempo, la reacción se interrumpió introduciendo los tubos con las muestras en un baño con hielo. Finalmente, el sobrenadante se analizó por espectrofotometría (UV-1603 Shimadzu, Tokio, Japón), midiéndose la absorbancia a 532 nm y restándole la absorbancia a 600 nm para corregir la turbidez no específica del

sobrenadante de las muestras, debido a las interferencias que pueden crearse por la incubación a 90 °C. Los resultados se expresaron en nmol de MDA por g de peso fresco.

El pH de las hojas se analizó en 4 réplicas por tratamiento y para ello muestras de 8 g de tejido fresco se homogeneizaron en ultraturrax (Ika, Staufen, Alemania) con 125 mL de agua destilada. Posteriormente, el pH del homogeneizado se midió con un pH-metro Metrom (modelo 785 DMP Tritino, Herisau, Suiza).

15. Color de las hojas

El color se determinó en el tejido fotosintético de las hojas con un fotocolorímetro de reflexión compacto (Minolta CR-300, Ramsey, NJ, EE.UU.). Se midió el color de la superficie de las hoja, registrando los valores de L^* , a^* y b^* . Posteriormente se calcularon los parámetros hue (tono o matiz del color) y chroma (saturación o intensidad de un determinado color) según las siguientes ecuaciones:

$$\text{Hue} = \tan^{-1} \frac{b^*}{a^*}$$

$$\text{Chroma} = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}}$$

En los Capítulos **IV**, **V** y **VI**, el color se analizó en una hoja por réplica, mientras que en el **Capítulo VII** el color se analizó en 3 hojas por réplica en las mismas muestras empleadas para determinar el contenido en agua de la hoja. Se midieron 15 réplicas por condición evaluada.

16. Contenido en clorofilas

En el **Capítulo IV**, para la extracción y cuantificación de los pigmentos fotosintéticos foliares se utilizó el método descrito por Wellburn (1994) con modificaciones. Se analizaron 4 réplicas por tratamiento de 0,2 g de material vegetal fotosintético fresco, seccionado en taleolas de 7 mm de diámetro el tejido y añadiendo

10 mL de metanol puro. El proceso de extracción se llevó a cabo durante 24 h a temperatura ambiente y en oscuridad.

En el **Capítulo VII**, la extracción y cuantificación de los pigmentos fotosintéticos se llevó a cabo siguiendo el método descrito por Lichtenthaler y Wellburn (1983) con modificaciones. Se analizaron 4 réplicas por tratamiento de 0,5 g de material vegetal fotosintético fresco. El material vegetal se homogeneizó en mortero añadiendo 50 mL de acetona al 80% a temperatura ambiente.

En ambos estudios, tras la extracción, las muestras se centrifugaron a 2800 x g durante 15 min (Centronic centrifuge, J.P. Selecta, Barcelona) y el sobrenadante se analizó por espectrofotometría (UV-1603 Shimadzu, Tokio, Japón).

En el **Capítulo IV**, el sobrenadante se analizó a 653 nm y a 666 nm para la cuantificación de clorofila *a* y clorofila *b*, mediante las ecuaciones de Wellburn (1994):

$$\text{Clorofila } a = \frac{\text{VE} [(15.65 \times A^{666}) - (7.34 \times A^{653})]}{\text{PF}}$$

$$\text{Clorofila } b = \frac{\text{VE} [(27.05 \times A^{653}) - (11.21 \times A^{666})]}{\text{PF}}$$

En el **Capítulo VII**, el sobrenadante se analizó a 646 nm y a 663 nm para la cuantificación de clorofila *a* y clorofila *b*, mediante las ecuaciones de Lichtenthaler y Wellburn (1983):

$$\text{Clorofila } a = \frac{\text{VE} [(12.21 \times A^{663}) - (2.81 \times A^{646})]}{\text{PF}}$$

$$\text{Clorofila } b = \frac{\text{VE} [(20.13 \times A^{646}) - (5.03 \times A^{663})]}{\text{PF}}$$

El contenido en clorofilas se expresó en mg por g de peso fresco, donde *VE* es el volumen de extracción (L), A^{666} es la absorbancia a 666 nm, A^{653} es la absorbancia a 653

nm, A^{663} es la absorbancia a 663 nm, A^{646} es la absorbancia a 646 nm y PF es el peso fresco de la muestra (g).

17. Fluorescencia de la clorofila *a*

La medida de la fluorescencia de la clorofila *a*, cuya información está relacionada con la eficiencia de la de la fotosíntesis en la planta, se utiliza para identificar posibles episodios de estrés en hoja. La fluorescencia de la clorofila se midió con un fluorímetro (IMAGIM-PAM M-series, Heinz Walz, Effeltrich, Alemania) según el método descrito por Faize y col. (2011) con algunas modificaciones. Tras la incubación de las hojas en oscuridad durante 30 min, se monitorizó la fluorescencia mínima y máxima de las hojas analizadas. Se llevaron a cabo análisis cinéticos de las curvas que se obtuvieron al aplicar luz actínica ($81 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PAR) y pulsos repetidos de luz saturante ($2700 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PAR durante 0.8 s) aplicados a intervalos de 20 s.

Se analizó la rendimiento cuántico máximo del fotosistema II (F_v/F_m), rendimiento cuántico efectivo del fotosistema II ($Y(II)$), el rendimiento cuántico de la energía de disipación no regulada $Y(NO)$, y el rendimiento cuántico de la energía de disipación regulada $Y(NPQ)$. Se establecieron 2 áreas de estudio de referencia en cada hoja analizada y se analizaron 20 hojas por tratamiento.

18. Contenido en compuestos fenólicos

Para la determinación del contenido en compuestos fenólicos, se tomaron 3 réplicas de 0,5 g de tejido fotosintético liofilizado por tratamiento.

Para la extracción de los compuestos fenólicos las muestras se homogeneizaron en ultraturrax (Ika, Staufen, Alemania) con 16 mL de medio de extracción, compuesto por metanol, NaF 4 mM en agua y ácido fórmico en proporción (48/46/6 v/v) durante 1 min en hielo. El homogeneizado se filtró a través de doble gasa y a continuación se

centrifugó a 13000 x g durante 10 min a 5 °C (Eppendorf 5804R, Hamburgo, Alemania). El sobrenadante se pasó por un filtro de membrana de 0.45 µm (Osmomonic/MSI cameo Nylon filtros, Fisher Scientific, Los Ángeles, CA, EE.UU), para su análisis por HPLC según lo descrito por Llorach y col. (2008) con algunas modificaciones. Para el análisis por HPLC, se inyectaron 20 µL de extracto en un equipo HPLC Agilent Technologies (1220 Infinity LC, Ealdbronn, Alemania) con una bomba (modelo G2490C), un detector de red de diodos (DAD) (modelo G4221A) y un inyector automático (modelo G2490C). Se utilizó una columna C-18 de fase reversa LiChrocart (25 x 0,4 cm, con tamaño de partícula de 5 µm). La elución se realizó utilizando como fase móvil agua: ácido tricloroacético (95,5:0,5 v:v) (A) y acetonitrilo (B) de grado HPLC. El gradiente comenzó con un 5% de B en A, para alcanzar un 30% a los 15 min, 50 % a los 30 min, 60 % a los 36 min, 70 % a los 40 min y un 90 % a los 45 min. El flujo fue de 0,8 mL min⁻¹ y los cromatogramas se registraron a 330 nm y 360 nm en función del tipo de compuesto fenólico.

Para la identificación de los compuestos fenólicos se utilizó un HPLC-MS-MS Agilent Technologies 1200 Series (Waldbronn, Alemania) equipado con un detector de masas (MS) en serie, una bomba HPLC binaria (G1376A), un inyector automático (G1377A), un desgasificador (G1379B), y un detector de diodos (DAD) (G1351D). El detector de masas (MS) estaba constituido por espectrómetro de masas con trampa de iones (Brucker, modelo HCT ultra) equipado con un sistema de ionización por electroespray (ESI) y controlado por un software (ChemStation, Agilent, v. 6.1). Los compuestos fenólicos se identificaron por sus masas moleculares de los fragmentos registrados con los detectores DAD y MS-MS respectivamente.

La cuantificación de los compuestos fenólicos se realizó por comparación con estándares externos (Sigma, Saint Louis, Missouri, EE.UU.). Los derivados de ácidos

hidroxiciámicos se cuantificaron por comparación con ácido clorogénico (ácido 5-*O*-cafeoilquínico) y los flavonoides se cuantificaron por comparación con la rutina (quercetina 3-rutinósido). Los resultados se expresaron en mg por g de peso seco.

19. Análisis estadístico

A lo largo de los diferentes trabajos se llevaron a cabo análisis de la varianza (ANOVA) de una y dos vías. Tras el análisis de la varianza, cuando se observaron diferencias significativas se aplicó el test de diferencia significativa honesta de Tukey (**Capítulos IV y VII**) y el test de diferencia significativa mínima (**Capítulos V y VI**).

En el **Capítulo VII** se llevó a cabo un análisis de la normalidad de los datos previo a su análisis estadístico. En el caso de parámetros con una distribución normal de sus datos, se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) y cuando se observaron diferencias significativas se aplicó el test de diferencia significativa honesta de Tukey. En aquellos parámetros cuyos datos no se ajustaban a una distribución normal, se llevó a cabo el test Kruskal–Wallis y cuando se observaron diferencias significativas se realizaron comparaciones por pares con el test de Kruskal–Wallis.

En todos los trabajos se estableció un nivel de significancia de $P < 0,01$ para los datos microbiológicos y $P < 0,05$ para el resto de parámetros.

A su vez se analizaron correlaciones bivariadas mediante la correlación de Pearson con un intervalo de confianza del 95% (**Capítulos V y VI**).

Estos análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando el programa estadístico PASW Statistics 20 para Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

CAPÍTULO IV

CAMBIOS EN LA FISIOLOGÍA, COMPOSICIÓN FITOQUÍMICA Y ESTRUCTURA DE LECHUGA 'MULTI' CAUSADOS POR ESTRÉS SALINO

Garrido, Y., Tudela, J. A., Marín, A., Mestre, T., Martínez, V., Gil, M. I., 2014. Physiological, phytochemical and structural changes of multi-leaf lettuce caused by salt stress. *J. Sci. Food Agric.* 94, 1592-1599.

Physiological, phytochemical and structural changes of multi-leaf lettuce caused by salt stress

Yolanda Garrido, Juan A Tudela, Alicia Marín, Teresa Mestre, Vicente Martínez, María I Gil

DOI: 10.1002/jsfa.6462

Abstract

BACKGROUND

Environmental stress due to salt has been described to enhance lettuce processability, shelf life and consumer acceptability. Moderate salinity causes altered leaf carotenoid, lignin, phenolic and flavonol levels without noticeable changes in the green colour and morphology of lettuce. The aim of this study was to understand the improvements in processability, due to salt stress, related to textural properties and structural characteristics.

RESULTS

Physiological, phytochemical and structural changes were observed that were of significant relevance to salt stress (50, 100 and 150 mmol L⁻¹ NaCl). Fresh weight per plant, fresh weight per leaf, leaf area, water content, colour saturation, chlorophyll *a* and *b* and the area of the intercellular spaces decreased when the concentration of salt was increased. Solute concentration, elasticity, total and individual phenolic acids and the areas occupied by the palisade and spongy parenchyma cells increased when the concentration of salt was increased.

CONCLUSION

These data illustrate that salt stress can have a positive impact on certain structural parameters, especially tissue elasticity, that can be closely linked to a higher number of cells, of lower size and high leaf strength, explaining the postharvest longevity of lettuce. However, leaf growth and visual quality could be negatively affected by salt stress.

Garrido, Y., Tudela, J. A., Marín, A., Mestre, T., Martínez, V., Gil, M. I., 2014. Physiological, phytochemical and structural changes of multi-leaf lettuce caused by salt stress. *J. Sci. Food Agric.* 94, 1592-1599.

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jsfa.6462/full>

CAPÍTULO V

INFLUENCIA DEL MOMENTO DEL DÍA PARA LA RECOLECCIÓN Y LA DEMORA HASTA EL PROCESADO EN LA CALIDAD DE ESPINACA 'BABY' MÍNIMAMENTE PROCESADA

Garrido, Y., Tudela, J. A., Gil, M. I., 2015. Time of day for harvest and delay before processing affect the quality of minimally processed baby spinach. *Postharvest Biol. Technol.* 110, 9-17.



Time of day for harvest and delay before processing affect the quality of minimally processed baby spinach

Yolanda Garrido, Juan A. Tudela, María I. Gil

[doi:10.1016/j.postharvbio.2015.07.002](https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2015.07.002)

Abstract

The objective of this study was to evaluate if time of day for harvest and delay before processing affected the quality of baby spinach. Three times of the day for harvest (8:30, 13:00 and 17:30 h as H1, H2 and H3, respectively) and three times of delay before processing (DP) (3, 24 and 48 h as DP3, DP24 and DP48, respectively) were studied. Two trials were conducted, one in January and another in April corresponding with winter and spring seasons. Photosynthetic and transpiration rates of baby spinach just before harvest were the highest at midday (H2), coincident with the highest solar radiation and vapor pressure deficit. In winter, the leaf water content was the highest in H1 and H3, while in spring leaves harvested early in the morning (H1) showed the highest leaf water content and more vivid color measured as Chroma. The differences observed were maintained during storage only in spring. Respiration rates did not show differences among harvest times in winter while in spring, respiration rate increased with the progress of harvest time (HT), particularly with shorter DP (DP3 and DP24). Moreover, visual quality of minimally processed baby spinach did not show significant differences among HT in winter, while in spring, the visual quality decreased when HT was advanced. The DP did not affect most of the parameters evaluated during storage, except the decrease in the respiration rate and the increase in the microbiological counts, psycrotrophs and *Pseudomonas*, when DP was increased. Results showed the same tendency for the leaf water content, color, respiration rate and visual quality of baby spinach after storage. Therefore, the best visual quality obtained in H1 corresponded with higher leaf water content and color saturation and a lower respiration rate. According to these results, minimally processed baby spinach could be harvested any time of the day in winter, while it is recommended to harvest it early in the morning in spring. Minimally processed baby spinach can tolerate a delay to processing of at least 48 h without evident symptoms of quality loss.

Garrido, Y., Tudela, J. A., Gil, M. I., 2015. Time of day for harvest and delay before processing affect the quality of minimally processed baby spinach. *Postharvest Biol. Technol.* 110, 9-17.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.postharvbio.2015.07.002>

CAPÍTULO VI

COMPARACIÓN DE SISTEMAS DE PRE-ENFRIAMIENTO DE USO INDUSTRIAL PARA ESPINACA 'BABY' MÍNIMAMENTE PROCESADA

Garrido, Y., Tudela, J. A., Gil, M. I., 2015. Comparison of industrial precooling systems for minimally processed baby spinach. *Postharvest Biol. Technol.* 102, 1-8.



Comparison of industrial precooling systems for minimally processed baby spinach

Yolanda Garrido, Juan A. Tudela, María I. Gil

[doi:10.1016/j.postharvbio.2014.12.003](https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2014.12.003)

Abstract

Leafy greens including baby spinach are particularly prone to rapid dehydration. After harvest, leafy greens should be refrigerated as soon as possible to remove the heat from the field in order to decrease respiration rate and increase shelf-life. Delays between harvest and cooling should be avoided, especially during warm weather to avoid water loss. There is a wide range of precooling systems available for using in fresh produce. However, the best precooling system for baby leaves as raw material for the fresh-cut industry has not been well established. The aim of this study was to compare four precooling systems including room cooling (RC), forced air cooling (FAC), hydro cooling (HC) and vacuum cooling (VC) for their effects on quality and shelf-life of baby spinach. Two separate trials, one in winter and another in spring were carried out. Leaf water content increased after cooling in HC and VC but more significantly in winter while in spring, differences among treatments were not significant. The colour measured as chroma was more vivid in HC and VC just after processing but after storage, no differences among precooling treatments were observed. In winter, there were no significant differences in the respiration rate among precooling systems. However, in spring, HC and VC decreased respiration rate and modified less the headspace gas composition of the packages. *Pseudomonas* counts significantly decreased in HC and VC due probably to the washing effect of the leaf surface without promoting the growth of spoilage microorganisms. Surprisingly, visual quality was significantly lower in VC compared with the rest of precooling treatments due to the higher degree and number of damaged leaves. In conclusion, selection of the precooling system is critical during warm weather because of the high temperature at harvest. Hydro cooling is a good precooling system for baby spinach in spring as it decreases rapidly leaf temperature, decreasing respiration rate and extending shelf life. However, in winter, precooling systems are not as critical because the temperature at harvest was similar to the temperature reached after precooling.

Garrido, Y., Tudela, J. A., Gil, M. I., 2015. Comparison of industrial precooling systems for minimally processed baby spinach. *Postharvest Biol. Technol.* 102, 1-8.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.postharvbio.2014.12.003>

CAPÍTULO VII

FACTORES RESPONSABLES DE LOS CAMBIOS EN CALIDAD DE ESPINACA ‘BABY’ DURANTE LA CONSERVACIÓN BAJO DISTINTAS CONDICIONES DE ILUMINACIÓN

Garrido, Y., Tudela, J. A., Hernández, J. A., Gil, M. I., 2015. Modified atmosphere generated during storage under light conditions is the main factor responsible for the quality changes of baby spinach. *Postharvest Biol. Technol.* 114, 45-53.



Modified atmosphere generated during storage under light conditions is the main factor responsible for the quality changes of baby spinach

Yolanda Garrido, Juan A. Tudela, José A. Hernández, María I. Gil

[doi:10.1016/j.postharvbio.2015.12.001](https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2015.12.001)

Abstract

Minimally processed products are generally exposed to low temperature and uncontrolled light conditions during the supply chain. The positive effect of low temperature on quality of baby spinach is widely reported, but there is little information available about the light effect. The objective of this study was to obtain insight about the cause-effect of light exposure of baby spinach on leaf quality and senescence parameters. Minimally processed baby spinach was stored in passive Modified Atmosphere Packaging (MAP) and in Controlled Atmosphere (CA) under different light conditions. In passive MAP, three very different headspace gas compositions within the bags due to photosynthesis and respiration reactions were generated that strongly affected the quality characteristics. To isolate the light effect from the atmosphere composition influence, and thus understand the mechanisms causing the quality changes, baby spinach was stored under two CA of 0.5 kPa O₂ + 10 kPa CO₂ (low O₂ + high CO₂ levels) and air combined with 2 light conditions (continuous light and darkness). The changes observed under the different light conditions were mainly caused by the differences in gas composition. Under light, MAP with high O₂ partial pressure (pO_2) and low CO₂ partial pressure (pCO_2) was detrimental because of the growth of *Pseudomonas* spp. and the progress in tissue senescence due to oxidative stress, increasing cell damage, lipid peroxidation and chlorophyll degradation. Under darkness, MAP with low pO_2 and high pCO_2 was also detrimental because of the intense off-odour developments, the increase in pH and electrolyte leakage and the reduction in chlorophyll fluorescence. Our results showed that the modified atmosphere generated with exposure to the different light conditions affects the quality of baby spinach mainly because of the high pO_2 under light and high pCO_2 under darkness.

Garrido, Y., Tudela, J. A., Hernández, J. A., Gil, M. I., 2015. Modified atmosphere generated during storage under light conditions is the main factor responsible for the quality changes of baby spinach. *Postharvest Biol. Technol.* 114, 45-53

<http://dx.doi.org/10.1016/j.postharvbio.2015.12.001>

CAPÍTULO VIII

DISCUSIÓN GENERAL

En los puntos de venta es cada vez más habitual encontrar una amplia gama de hortalizas frescas listas para el consumo, que presentan formatos innovadores y que se incluyen en la compra habitual de los consumidores. La amplia variedad de productos disponibles es el reflejo de que las empresas del sector hortofrutícola apuestan cada vez más por la innovación dentro de estos productos cuya venta crece año tras año.

Dentro de este sector, las ensaladas de ‘hojas jóvenes’ listas para el consumo ocupan un lugar destacado debido a la demanda de este producto valorado como ‘Premium’ y al interés por parte de las empresas del sector en ofrecer un producto de máxima calidad.

El objetivo general de esta tesis doctoral ha sido profundizar en la problemática asociada a este alimento y abordar distintas estrategias de intervención para mejorar su calidad y aumentar su vida útil. En esta discusión general se recapitulan los principales resultados obtenidos en el desarrollo de esta tesis doctoral, la cual ha sido dividida en cuatro sub-apartados para tratar cada uno de los objetivos propuestos (**Capítulo II**).

1. Influencia del estrés salino en la calidad de lechuga ‘multi’ como materia prima y posibles implicaciones en la procesabilidad

Los estudios llevados a cabo en el **Capítulo IV** muestran que el estrés salino durante el cultivo de lechugas ‘multi’ afectó tanto a su fisiología como a su calidad como materia prima para IV Gama.

Los resultados muestran que el estrés salino afectó a parámetros relacionados con la estructura física y anatómica de la hoja ya que influye en el crecimiento de la planta y en el balance hídrico, elasticidad y estructura interna de la hoja. Todos los tratamientos salinos (50, 100 y 150 mmol L⁻¹ NaCl) conducen a un menor rendimiento del cultivo con un menor peso fresco por planta, que se corresponde con un menor peso fresco de la hoja y una menor superficie foliar, sin afectar al número de hojas presentes por planta. El efecto negativo del estrés salino sobre el rendimiento de los cultivos ha sido

ampliamente estudiado (Papadopoulos, 1987; Kim y col., 2008; Al-Maskri y col., 2010). En ‘hojas jóvenes’ de lechuga se ha observado que mantienen un crecimiento moderado tras dos días de exposición a altas concentraciones de NaCl (hasta 1 mol L⁻¹) pero ven reducido su crecimiento tras 15 días de exposición a un riego con 200 mmol L⁻¹ de NaCl (Kim y col., 2008). El efecto negativo de la salinidad sobre el crecimiento de las plantas podría explicarse por la reducción en la tasa fotosintética, conductancia estomática y transpiración de las hojas, así como por un desequilibrio nutricional del medio, entre otros factores (Shalhevet y Hsiao, 1986, Ashraf, 2004; Hu y col., 2007). La presencia de una menor superficie foliar en plantas bajo estrés salino puede ser el resultado de una respuesta fisiológica de las plantas frente al estrés, presentado menor superficie de las hojas como mecanismo de protección frente al estrés hídrico causado por una menor disponibilidad de agua (Hasegawa, 2006). Además, los resultados muestran que los tratamientos salinos afectaron al balance hídrico de la hoja, con una reducción del contenido en agua y del potencial osmótico de la hoja en todos los tratamientos salinos. Esto puede deberse a un proceso de deshidratación de los tejidos de la planta debido a un estrés osmótico en el medio (Hasegawa, 2006). Además, se ha observado que lechugas expuestas a NaCl son capaces de acumular Na⁺ en el tejido foliar (Mahmoudi y col. 2010; Neocleus y col., 2014). Por lo tanto, los resultados obtenidos en el potencial osmótico de la hoja podrían deberse a su vez a un ajuste osmótico debido a la acumulación activa de iones en la hoja. Por otro lado, nuestro estudio muestra que la salinidad afectó a la extensibilidad de las paredes celulares, de forma que las plantas expuestas a tratamientos salinos presentaron una mayor elasticidad de las hojas sin que se observaran diferencias entre tratamientos en cuanto a su plasticidad. En ‘hojas jóvenes’ de lechuga se ha observado que el cultivo en condiciones salinas aumenta la plasticidad de las hojas y con ello su extensibilidad

(Clarkson y col., 2003). Los cambios observados en nuestro estudio pueden deberse a un ajuste elástico frente a estrés salino, que implica cambios en las propiedades mecánicas de la pared celular frente a la deshidratación para mantener la presión de turgencia celular (Peltier y Marigo, 1999). Algunos autores consideran que tanto una alta como una baja elasticidad podrían facilitar el mantenimiento de la turgencia celular durante períodos de estrés hídrico (Fan y col., 1994; Marshall y Dumbroff, 1999; Lemcoff y col., 2002). Algunas plantas bajo estrés hídrico reducen la rigidez de sus paredes celulares e incrementan su elasticidad, facilitando así la contracción de los tejidos durante la deshidratación y reduciendo la pérdida de potencial hídrico (Peltier y Marigo, 1999), lo que podría explicar la respuesta observada en plantas de lechuga en nuestro estudio. Además, durante el estrés salino las células podrían acumular Na^+ en su interior, induciendo un estrés iónico que puede modificar la composición de la membrana celular, alterando eventualmente su crecimiento y desarrollo (Ahuja y col., 2010; Mahmoudi y col. 2010).

En cuanto a la anatomía interna de la hoja, los resultados muestran que las plantas expuestas a estrés salino durante el cultivo presentaron células parenquimáticas de menor tamaño (exposición a 50, 100 y 150 mmol L^{-1} NaCl) y una estructura interna del tejido con menor extensión de espacios intercelulares (exposición a 150 mmol L^{-1} NaCl). En este sentido, en romero cultivado bajo estrés salino se observó una respuesta similar, donde se vio reducida el área ocupada por espacios intercelulares mientras que aumentó el área ocupada por tejido (Olmos y col, 2007). Además, en nuestro estudio se registraron síntomas de plasmolisis celular en plantas sujetas a los tratamientos salinos de mayor intensidad (100 y 150 mmol L^{-1} NaCl). La presencia de plasmolisis viene representada por una separación entre la pared celular y la membrana plasmática, la cual ha sido previamente demostrada en plántulas bajo estrés salino (Pareek y col., 1997).

Por otro lado, nuestros resultados muestran que el estrés salino también afectó a la calidad visual y contenido en compuestos antioxidantes de la lechuga. El color de las hojas presentó un verde progresivamente menos vivo a medida que el tratamiento salino fue de mayor intensidad. Además, las lechugas cultivadas bajo los tratamientos salinos de mayor intensidad (100 y 150 mmol L⁻¹ NaCl) presentaron un menor contenido en clorofila *a* y clorofila *b* comparadas con las plantas control. Estos resultados coinciden con trabajos previos que describen el efecto negativo de elevadas concentraciones salinas en el contenido en clorofila, debido a la inhibición de su síntesis y a la activación de su degradación (Salama y col., 1994; Ashraf, 2004). El contenido en clorofila ha sido utilizado como indicador del ‘verdor’ en hortalizas de hoja (Agüero y col., 2011), lo que coincide con nuestros resultados en los que observamos que la viveza del color y el contenido de clorofila mostraron una tendencia decreciente a medida que la intensidad del tratamiento salino fue mayor. Además, las lechugas expuestas a NaCl durante el cultivo presentaron un mayor nivel de compuestos fenólicos y por tanto una mayor capacidad antioxidante. Estos resultados coinciden con trabajos previos publicados en hojas jóvenes de lechuga, donde las plantas expuestas a estrés salino presentaron mayor nivel de carotenos y compuestos fenólicos (Kim y col., 2008; Mahmoudi y col. 2010). Esto puede deberse a que las plantas son capaces de alterar los niveles de metabolitos secundarios para mejorar sus sistemas de defensa contra las agresiones, especialmente en el estrés oxidativo (Wahid y Ghazanfar, 2006). El pardeamiento enzimático es uno de los mayores problemas que ocurren durante el procesado y conservación de lechuga y se produce por la oxidación de compuestos fenólicos produciendo polímeros pardeados (Tomás-Barberán y col., 1997). Sin embargo, un incremento en el nivel de compuestos fenólicos no implica necesariamente un incremento en el pardeamiento del producto envasado. Estudios previos muestran que la actividad de las enzimas causantes

del pardeamiento de la hoja disminuyó durante la conservación de lechuga que previamente fue expuesta a estrés salino durante su crecimiento (Chisari y col., 2010; Scuderi y col., 2011).

Estudios previos muestran que el estrés salino puede ejercer un efecto positivo en la procesabilidad y vida útil de lechuga. En lechuga ‘baby’ se ha observado que el estrés salino aumenta la plasticidad de las paredes celulares, reduce el tamaño de las células epidérmicas, aumenta la presión osmótica del tejido y proporciona un producto con mayor aceptabilidad y vida útil (Clarkson y col., 2003). Además, otros trabajos en lechuga envasada muestran que el estrés salino puede mejorar algunas características como consecuencia de la reducción en la actividad oxidativa y el pardeamiento, así como una reducción en la actividad respiratoria del producto, manteniendo su color y textura (Chisari y col., 2010; Scuderi y col., 2011). Por lo tanto, nuestros resultados muestran que el estrés salino afecta a parámetros potencialmente implicados en la mejora de la procesabilidad y vida útil de la hoja, incluyendo el crecimiento, balance hídrico, elasticidad y estructura interna de la hoja así como su contenido en compuestos antioxidantes. En estudios posteriores a la publicación de nuestros resultados, Bekrhadi y col. (2015) confirmaron nuestros resultados observando que la exposición a salinidad durante el cultivo de albahaca afectó a parámetros como la estructura interna de la hoja con una compactación de sus tejidos, así como un menor contenido en clorofila, un mayor contenido en compuestos fenólicos y una mejora en la calidad del producto durante la conservación, aunque la respuesta dependió de la variedad analizada.

2. Efecto del momento del día de recolección y la demora hasta el procesado en la calidad de la espinaca ‘baby’ mínimamente procesada

Los resultados recogidos en el **Capítulo V** muestran que en las dos estaciones del año evaluadas, el estado de hidratación de la hoja varía a lo largo del día de forma que

su máxima deshidratación coincide con valores elevados de radiación, temperatura y déficit de presión de vapor (DPV), así como con tasas elevadas de fotosíntesis y transpiración de la hoja. La evapotranspiración de la hoja se define como la cantidad total de agua que teóricamente pierde la planta debido a los procesos de evaporación y transpiración (Holdridge, 1959; Allen y col., 1999). Los principales factores climáticos que afectan a la evapotranspiración de la planta son la radiación, temperatura del aire, humedad y velocidad del viento (Allen y col., 1999; Alves y Pereira, 2000). Además, existen estudios que muestran que la tasa de transpiración de la planta aumenta cuando aumenta el DPV ambiental (Rawson y col., 1977; Bunce, 1997; Holbrook, 2006), lo que coincide con nuestros resultados. En nuestro estudio, la tasa de fotosíntesis y transpiración presentaron valores máximos en las horas centrales del día, coincidiendo con lo descrito en estudios previos llevados a cabo en hojas ‘baby’ de rúcula y acelga roja (Clarkson y col., 2005).

En el estudio de primavera, el contenido en agua de la hoja fue menor a medida que avanzó en el día la hora de recolección. Las diferencias en hidratación de la hoja entre las tres cosechas del día se mantuvieron en el producto procesado a lo largo de su conservación, coincidiendo con diferencias en otros parámetros de calidad de la hoja como el color, la calidad visual y la tasa respiratoria del producto. En este sentido, la cosecha de primera de la mañana presentó una mayor hidratación, viveza de color, textura y calidad visual de la hoja, así como una menor tasa respiratoria del producto envasado. Como ya se ha comentado, los resultados recogidos en el **Capítulo IV** muestran que en lechuga ‘multi’ las hojas con mayor hidratación presentan a su vez mayor viveza del color. Además, otros estudios en hortalizas de hoja determinan que elevadas tasas respiratorias de la hoja están relacionadas con una reducción en la calidad visual y vida útil del producto envasado (Cantwell y col., 1998).

El estudio llevado a cabo en invierno muestra que la máxima deshidratación de la hoja se presenta en las horas centrales del día, ya que las condiciones ambientales permiten que la hojas recuperen en parte su hidratación durante la tarde. Sin embargo, las diferencias observadas el día de recolección no se muestran en el producto envasado, de forma que no se observa un efecto claro de la hora de recolección en parámetros como el contenido en agua, color, textura, calidad visual o modificación de la atmósfera del producto en conservación. Las diferencias observadas entre ambas estaciones del año pueden deberse a un efecto de la variedad y/o de las condiciones ambientales (Varoquaux y col., 1996; Gruda, 2005; Lester y col., 2013; Singh y col., 2014).

Por otro lado, en ambas estaciones del año no se observa un claro efecto del momento del día de la recolección en el desarrollo de bacterias alterantes, aunque en general se observa una mayor presencia de psicrotrofos y *Pseudomonas spp.* en la cosecha de primavera. En espinaca ‘baby’ se ha observado que un incremento en el contenido en agua de la hoja cuando las hojas son expuestas a una elevada humedad relativa en el periodo que transcurre desde la cosecha hasta el procesado está acompañado de un mayor crecimiento microbiano (Medina y col., 2012). Los resultados de nuestro estudio muestran que la hora de la recolección afecta al contenido en agua de la hoja, pero no se acompaña de un efecto en el crecimiento microbiano en espinaca ‘baby’ en conservación. Al parecer, el efecto del contenido en agua de la hoja en el crecimiento microbiano depende de si la hidratación de la hoja se produce precosecha o por una exposición postcosecha a elevadas humedades ambientales.

En cuanto al efecto del tiempo de demora desde la cosecha hasta el procesado, nuestros resultados muestran una respuesta diferente en función de la estación del año analizada. En invierno, las diferencias observadas el día de la cosecha desaparecen con el tiempo de demora hasta el procesado, sin que se observe otro efecto claro en las

características del producto envasado por parte de los distintos tiempos de demora analizados. En primavera sin embargo, las diferencias observadas en espinaca ‘baby’ el día de la cosecha se mantienen en el producto envasado sin efecto por parte de los distintos tiempos de demora aplicados. En el producto envasado, el único efecto apreciable es una reducción en la tasa respiratoria y un aumento en el contenido en psicrotrofos y *Pseudomonas spp* a medida que el tiempo de demora hasta el procesado es mayor. Los resultados en el crecimiento microbiológico son esperables, ya que al final de la conservación el tiempo transcurrido desde la recolección varía de 9 hasta 11 días para los distintos tiempos de demora aplicados.

Los resultados de nuestro estudio muestran que el momento del día en el que se produce la recolección puede afectar a la calidad de espinaca ‘baby’ tras su procesado. Como ya se ha comentado, las hortalizas de hoja son un producto muy perecedero con una alta tasa respiratoria y de deshidratación, donde el marchitamiento debido a la pérdida de agua puede causar un deterioro rápido del producto (Cantwell y col., 1998; Wang, 2003). Otros estudios llevados a cabo en hortalizas de hoja muestran que los cambios ambientales a lo largo del día pueden afectar al contenido en agua y calidad de hortalizas de hoja (Moccia y col., 1998; Clarkson y col., 2005; Gent, 2012; Hasperué y col., 2014). En ‘hojas jóvenes’ de rúcula y acelga roja, Clarkson y col. (2005) observaron un aumento en la presión de turgencia en la cosecha del final del día (22:00 h), lo que contribuyó a una hoja más procesable y con mayor vida útil. En lechuga en cultivo hidropónico, el mayor peso fresco se obtuvo en la lechuga recolectada de madrugada (Gent, 2012). Por lo tanto, el efecto de la hora de recolección en la hidratación y calidad de la hoja dependen de factores como el tipo de cultivo y las condiciones ambientales. Nuestros resultados muestran que la mejor calidad del producto se relaciona con las hojas más hidratadas en el momento de la recolección, al

igual que lo observado para otras hortalizas de hoja (Moccia y col., 1998; Clarkson y col., 2005).

3. Efecto de distintos sistemas de enfriado de uso industrial en la calidad de espinaca ‘baby’ mínimamente procesada

Los resultados recogidos en el **Capítulo VI** muestran que las hojas de espinaca ‘baby’ se hidrataron en el periodo transcurrido entre el pre-enfriamiento y el procesado del producto, especialmente en el caso de los tratamientos mediante hidro-enfriamiento (HE) y enfriamiento por vacío (EV). Esta hidratación pudo deberse a las condiciones de alta humedad relativa (HR) durante el almacenamiento del producto, así como por el agua remanente aportada por estos sistemas de pre-enfriamiento. En este sentido, la cosecha de invierno presentó una mayor capacidad de hidratación, ya que se observó una hidratación del producto incluso a lo largo de la conservación. Además, tanto en los ensayos de invierno como en los de primavera, el color de la hoja mostró la misma tendencia en respuesta a los distintos sistemas de enfriado aplicados y se relacionó con el contenido en agua de la hoja. En este sentido, al inicio de la conservación del producto, la viveza del color fue mayor en el producto enfriado mediante los sistemas HE y EV, comparado con los sistemas de enfriamiento en cámara (EC) y por aire forzado (EAF). Sin embargo, estas diferencias no aparecen tras 11 días de conservación. Al inicio de la conservación, la presencia de una mayor viveza del color en las hojas más hidratadas coincide con lo observado en hojas tipo ‘baby’ de lechuga y espinaca, que ha sido descrito en los **Capítulos IV y V** y comentado en los **apartados 1 y 2** de esta discusión. Sin embargo, al final de la conservación del producto no existió una relación clara entre la viveza del color y contenido en agua de la hoja, lo que puede deberse a que el color de la hoja también depende de otros factores que varían durante la conservación como es el contenido en clorofila de la hoja (Agüero y col., 2011).

Como ya se ha comentado anteriormente, mantener la hidratación de la hoja constituye un factor crítico en el caso de hortalizas de hojas (Kader, 1992; Wright, 2004). Se ha descrito en numerosos estudios que la utilización de sistemas de enfriamiento como HE y EV contrarresta la deshidratación de las hojas debido al aporte extra de agua durante el proceso (Sun, 1999; Brosnan y Sun, 2001; Zheng y Sun, 2004), lo que coincide con el contenido en agua de la hoja observado en nuestros resultados. Sin embargo, el exceso de agua en la superficie de las hojas puede promover el desarrollo de microorganismos y reducir la vida útil del producto (Herner y Krahn, 1973; Medina y col., 2012). En espinaca ‘baby’, Medina y col., (2012) observaron que el contenido en bacterias psicrotrofas y *Pseudomonas* spp. antes del lavado fue superior en muestras almacenadas en alta HR comparado con las que fueron almacenadas a menor HR, observándose la misma tendencia al final de la conservación del producto envasado. Nuestros resultados muestran que el contenido en bacterias psicrotrofas y *Pseudomonas* spp. fue mayor en el ensayo de primavera, donde además se registró una disminución en el contenido bacteriano al inicio de la conservación en muestras enfriadas mediante HE y EV, posiblemente por efecto de lavado por el agua aportada en el proceso. En ambos ensayos, a lo largo de la conservación del producto no se observaron diferencias entre las muestras enfriadas mediante los distintos sistemas aplicados, por lo que el agua remanente en la superficie de la hoja que puede derivarse de la utilización de los sistemas de HE y EV no potenció el crecimiento bacteriano ni el desarrollo de podredumbres.

En cuanto a la respiración del producto envasado, en el ensayo de invierno no se registraron diferencias en la composición atmosférica del interior del envase. En primavera sin embargo, las muestras enfriadas mediante los sistemas HE y EV modificaron menos la atmósfera de envasado comparado con EC y EAF, confirmándose

con los datos de menor actividad respiratoria del producto registrados para HE y EV. Numerosos estudios determinan que el enfriamiento del producto tras la cosecha reduce la actividad respiratoria del producto y extiende su vida útil (Paull, 1999; Kitinoja y Thompson, 2010; Thompson y col., 2008). En base a nuestros resultados cabe esperar que los sistemas que más reducen la actividad respiratoria del producto (HE y EV) podrían extender la vida útil de espinaca 'baby'. Las diferencias observadas entre estaciones del año pueden deberse a que en invierno la temperatura de las hojas en el momento de la cosecha fue similar a la alcanzada tras el pre-enfriamiento de las hojas (alrededor de 6 °C), por lo que es probable que no se viera afectada a la actividad respiratoria del producto. En primavera sin embargo, con una temperatura superior en el momento de la cosecha (12 °C), se redujo la tasa respiratoria del producto en aquellos sistemas que redujeron de forma más eficaz la temperatura a través de la masa del producto (HE y EV). Por lo tanto, las diferencias entre ensayos pueden deberse a las diferencias en temperatura en el momento de la cosecha, así como a otros factores como el efecto de la variedad y a otros factores agronómicos propios de la estación del año.

Por otro lado, el daño celular en la hoja fue caracterizado mediante la detección de síntomas como la presencia de plasmólisis (separación entre la membrana plasmática y la pared celular) o una retracción del citoplasma. En otros estudios, estos síntomas han sido identificados en células con morfología de apoptosis similar a muerte celular programada en células senescentes tras la aplicación de un estrés, en respuesta a patógenos o durante el desarrollo del tejido (Levine y col., 1996; Delorme y col., 2000; Kacprzyk y col., 2011; Reape y McCabe, 2013). Además, la presencia de plasmólisis en plantas ha sido demostrada en plantas bajo estrés hídrico, salino y bajas temperaturas (Pareek y col., 1997; Stefanowska y col., 1999). Como ya se ha comentado, aunque el uso de muestras fijadas dificulta la distinción entre células vivas o senescentes, la

detección de estos síntomas morfológicos proporcionó información acerca de la severidad del daño ocasionado por los distintos sistemas de pre-enfriamiento. En este sentido, nuestros resultados muestran que en invierno no aparecieron diferencias significativas entre tratamientos, mientras que en el ensayo de primavera se observó una mayor sensibilidad de las hojas con un mayor nivel de tejido dañado justo tras el enfriamiento en las muestras tratadas con los sistemas EV y EAF. Además, este mayor daño en las hojas se relacionó con una mayor deshidratación del producto justo tras el enfriamiento. Además, en el producto envasado en ambos ensayos se observó una menor valoración en calidad visual y un mayor nivel de hojas dañadas en el caso de las muestras tratadas con EV. He y col. (2004) observaron en lechuga iceberg que el proceso de enfriamiento mediante vacío producía una variación en su ultraestructura, con la detección mediante microscopía electrónica de transmisión de plasmólisis celular, estructura irregular en la membrana plasmática y discontinuidad en el tonoplasto, especialmente en el caso de la aplicación de una reducción de presión rápida. Sin embargo una reducción de presión moderada condujo a una menor variación de la ultraestructura y una mayor calidad y vida útil de la lechuga iceberg (He y col., 2004). Muchos productos son más susceptibles al daño por compresión e impacto cuando están fríos, por lo que la aplicación de EV podría resultar en una mayor fragilidad del producto. Además, el uso de una velocidad de reducción de presión inadecuada puede producir un daño en el tejido por la rápida y forzada entrada de agua en el tejido o afectar significativamente a la pérdida de masa del producto (Thompson y col., 2008; Ozturk y Ozturk, 2009). Por lo tanto, aunque el tratamiento con EV redujo la actividad respiratoria del producto y el agua remanente derivada de su aplicación permitió una posterior hidratación de las hojas, en las condiciones del estudio fue un tratamiento demasiado agresivo para las hojas de espinaca 'baby' como muestran los

resultados de daño celular registrados justo tras la aplicación del tratamiento y la menor calidad sensorial del producto en conservación.

Los distintos parámetros analizados en este estudio muestran una mayor sensibilidad a los distintos tratamientos de pre-enfriamiento aplicados en la cosecha de primavera que en la de invierno. Esto puede deberse a un efecto de la variedad, condiciones ambientales o factores agronómicos propios de la estacionalidad de los cultivos (Varoquaux y col., 1996; Gruda, 2005; Lester y col., 2013; Singh y col., 2014).

4. Influencia de la exposición en distintas condiciones de luz y de atmósfera durante la vida útil de espinaca ‘baby’ mínimamente procesada

Los resultados recogidos en el **Capítulo VII** muestran que en espinaca ‘baby’ envasada en atmósfera modificada (MAP) las distintas condiciones de iluminación aplicadas durante la conservación afectaron a la composición gaseosa del espacio de cabeza. El tratamiento con oscuridad continua registró la mayor modificación de la atmósfera inicial de envasado y el tratamiento de luz continua obtuvo la menor modificación, mientras que el tratamiento con fotoperiodo registró una modificación intermedia. El consumo de O₂ medido como tasa respiratoria de las muestras conservadas en oscuridad fue mayor que aquellas conservadas en luz o fotoperiodo. Estos resultados coinciden con lo descrito en lechuga cortada para IV Gama y conservada a baja temperatura con unas condiciones de radiación lumínica similares, 6 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ obtenida mediante lámparas fluorescentes (Martínez-Sánchez y col., 2011). Además, en otras hortalizas de hojas también se ha observado que radiaciones lumínicas de al menos 30 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ conducen a una menor modificación de la composición gaseosa del espacio de cabeza comparado con la conservación en oscuridad (Glowacz y col., 2014, Xiao y col., 2014). Estos autores atribuyen la menor modificación de la atmósfera en el interior del envase durante la exposición a la luz a

que el consumo de oxígeno por parte del producto es compensado por su producción a causa de la fotosíntesis (Martínez-Sánchez y col., 2011; Glowacz y col., 2014; Xiao y col., 2014). En este estudio, las distintas atmósferas generadas bajo las distintas condiciones lumínicas afectaron a las propiedades sensoriales, el contenido en agua, la fluorescencia de la clorofila y el pH de espinaca 'baby'. El estudio con atmósfera controlada (AC) permitió aislar el efecto de la luz del efecto de la composición atmosférica, y de esta forma profundizar en los mecanismos causantes de los cambios de calidad en el producto. Las condiciones de atmósfera controlada de 0.5 kPa O₂ + 10 kPa CO₂ frenaron los procesos de senescencia de la hoja registrando un menor nivel de células dañadas y una menor extensión de peroxidación lipídica y degradación de la clorofila; sin observarse un efecto por parte de las condiciones de luz aplicadas. De forma general, baja presión parcial de O₂ y elevada de CO₂ reducen la tasa respiratoria y de degradación del producto conservado (Kader y col., 1989). Estudios histológicos llevados a cabo por Tudela y col. (2013) mostraron que espinaca 'baby' conservada con baja presión parcial de O₂ (*p*O₂) y elevada presión parcial de CO₂ (*p*CO₂) presentó menos síntomas de daño celular comparado con hojas conservadas con moderada *p*O₂ y elevada *p*CO₂.

Durante la conservación, el efecto de la exposición a la luz en el contenido en clorofilas de la hoja presenta cierta controversia. Mientras que algunos estudios muestran mayor contenido de clorofilas por la exposición a la luz (Noichinda y col., 2007; Zhan y col., 2012; Costa y col., 2013; Gergoff Grozeff y col., 2013) otros estudios muestran lo contrario (Glowacz y col., 2014). Nuestros resultados muestran que el contenido en clorofilas de espinaca 'baby' se preserva mejor con baja *p*O₂ y elevada *p*CO₂ que en aire, sin que se registre una influencia de las condiciones de luz aplicadas. Numerosos estudios han demostrado que el contenido en clorofilas en

hortalizas de hoja se preserva con una elevada $p\text{CO}_2$ (Herner, 1988; Philosoph-Hadas y col., 1993, Fernández-León y col., 2013), que a su vez frena la aparición de otros síntomas de deterioro de la hoja como la peroxidación lipídica, degradación de proteínas y pudrición de la hoja (Philosoph-Hadas y col., 1993, Lers y col., 1998, Kenigsbuch y col., 2014).

En espinaca, se han observado incrementos de pH en el producto cuando las hojas se conservan con alta $p\text{CO}_2$ (Burgheimer y col., 1967). Se ha descrito que este aumento de pH se debe a la acumulación de compuestos alcalinos y no a la pérdida de ácidos orgánicos (Burg, 2004). En estudios previos, se ha descrito una acumulación de amonio en espinaca ‘baby’ expuesta a CO_2 (Cantwell, 2010, Tudela y col., 2013). La acumulación de amonio puede ser tóxica para la células vegetales (Toivonen, 1997), por lo que se considera un buen indicador de daño por CO_2 en espinaca (Rodríguez y Cantwell, 2002). Los resultados de nuestro estudio en atmósfera controlada muestran que, independientemente de las condiciones de iluminación aplicadas, el nivel de pH fue mayor en baja $p\text{O}_2$ y elevada $p\text{CO}_2$ que en aire debido al efecto del CO_2 . A su vez, en espinaca ‘baby’ en MAP el nivel de pH aumenta cuando la $p\text{CO}_2$ aumenta en el espacio de cabeza, mostrando la mayor $p\text{CO}_2$ en oscuridad. Los resultados obtenidos en AC muestran que el nivel de pérdida de electrolitos se ve afectado principalmente por la composición atmosférica, con altos niveles en baja $p\text{O}_2$ y elevada $p\text{CO}_2$, coincidiendo con los mayores niveles de pH. El incremento en pérdida de electrolitos ha sido tradicionalmente atribuido a la ruptura de membranas celulares. Sin embargo, en espinaca se ha observado que el aumento el nivel de pérdida de electrolitos puede aumentar a causa de una acumulación de amonio en los tejidos, incluso sin que se registre un incremento en la ruptura celular durante la senescencia de la hoja (Rolny y col., 2011). Nuestros resultados en pérdida de electrolitos podrían explicar el daño

causado por el contenido en amonio mientras que los resultados en peroxidación de lípidos y morfología celular podrían reflejar un daño oxidativo de las membranas celulares.

La medida de fluorescencia de la clorofila *a* en hortalizas de hojas proporciona información relacionada con la eficiencia de la fotosíntesis y la energía disipada en el proceso mediante técnicas no destructivas (Maxwell y Johnson, 2000). Esta técnica se utiliza para monitorizar la senescencia durante la conservación de diferentes productos como lechuga, espinaca y canónigo (Schofield y col., 2005; Ferrante y Maggiore, 2007; Baldassarre y col., 2011), así como el desarrollo de pudriciones en lechuga (Simko y col., 2015).

El rendimiento cuántico máximo y rendimiento cuántico efectivo del fotosistema II (PSII) vienen representadas por F_v/F_m y $Y(II)$, respectivamente. Ambos representan la proporción de luz absorbida por la clorofila asociada al PSII que es utilizada en proceso fotoquímicos (Maxwell y Johnson, 2000). En hojas maduras de espinaca conservadas en oscuridad Gergoff Grozeff y col. (2013) observaron que un tratamiento previo con pulsos de luz de baja intensidad ($30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) frenaron el descenso de F_v/F_m durante la conservación. Los resultados de nuestro estudio en AC muestran que el rendimiento cuántico del PSII se preservó mejor en aire independientemente de las condiciones de luz aplicadas, mostrando los niveles más altos de F_v/F_m and $Y(II)$. Además, los mayores niveles de rendimiento cuántico de la disipación de la energía no regulada $Y(NO)$ se registraron en la condiciones de elevada $p\text{CO}_2$, tanto en AC como en MAP. El parámetro $Y(NO)$ representa la fracción de energía disipada pasivamente en forma de calor y fluorescencia. Niveles elevados de $Y(NO)$ reflejan una pérdida en la efectividad de los procesos de fotoprotección del aparato fotosintético (Klughammer y Schreiber, 2008; Bürling y col., 2010). Además, los bajos niveles de eficiencia

fotosintética coincidieron con las condiciones que condujeron a elevados niveles de pH y pérdida de electrolitos, por lo que podría estar relacionado con el efecto tóxico o estresante del CO₂ a nivel celular.

Los resultados del estudio en MAP muestran que la conservación en oscuridad preservó mejor el contenido en agua y la calidad visual de la hoja comparado con la exposición a luz y fotoperiodo. En productos mínimamente procesados, la exposición a la luz normalmente afecta a la hidratación de la hoja ya que aumenta su transpiración debido a la elevada conductancia estomática que acelera la pérdida de agua por parte del tejido (Noichinda y col., 2007; Lester y col., 2010; Zhan y col., 2013; Glowacz y col., 2014; Xiao y col., 2014). En nuestro estudio en AC ni la calidad visual ni el contenido en agua de la hoja se vio afectado por las condiciones de luz aplicadas. El contenido atmosférico del interior de los recipientes fue continuamente humidificado para prevenir la deshidratación causada por el flujo a través del sistema, lo que interfirió en la posible pérdida de agua debido al efecto de la exposición a la luz.

Una baja pO_2 y alta pCO_2 frenó el crecimiento de *Pseudomonas* spp estando estos resultados de acuerdo con los observados en espinaca ‘baby’ conservada con baja pO_2 y alta pCO_2 (Tudela y col., 2013). Esto significa que el crecimiento de *Pseudomonas* spp. no es el responsable de los malos aromas en espinaca ‘baby’ ya que el desarrollo de malos aromas aumento con baja pO_2 y alta pCO_2 donde se registró un contaje microbiano menor. Son necesarios más estudios acerca de los mecanismos que promueven el desarrollo de malos aromas en espinaca ‘baby’ y discutir estrategias para controlarlo ya que continua siendo el mayor problema de este producto (Tudela y col., 2013).

La ausencia de un efecto directo de la exposición a la luz en algunos de los parámetros evaluados en este estudio puede deberse a la baja intensidad lumínica

aplicada ($5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) comparada con otros trabajos donde se aplican al menos $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Sin embargo, los resultados mostraron que una exposición a la luz, incluso de muy baja intensidad, puede afectar al contenido en agua y la actividad respiratoria de espinaca 'baby' y provocar cambios en la calidad del producto. Por lo que la influencia de estas condiciones deben ser tenidas en cuenta durante la cadena de distribución y venta de espinaca de 'baby'.

CAPÍTULO IX

CONCLUSIONES

Influencia del estrés salino en la calidad de lechuga ‘multi’ como materia prima y posibles implicaciones en la procesabilidad.

Tras 10 días de tratamiento, el estrés salino afectó al crecimiento, apariencia visual, color, resistencia física, contenido en pigmentos fotosintéticos y compuestos fenólicos así como a la anatomía interna de las hojas de lechuga. Numerosos estudios avalan que el estrés salino puede mejorar la procesabilidad, vida útil y aceptación de lechuga para IV Gama. En nuestro estudio, se observaron cambios en parámetros potencialmente relacionados con la procesabilidad de lechuga ‘multi’. Los resultados muestran que el estrés salino provoca cambios estructurales que pueden asociarse a una mayor resistencia física, como el aumento en la elasticidad de la hoja y una mayor compactación de los tejidos. Además, los cambios observados en el contenido en agua de la hoja puede mejorar su procesabilidad al reducirse su turgencia y fragilidad, y en consecuencia el posible daño durante el procesado. Además, aumentó el contenido en compuestos fenólicos, aumentando la capacidad antioxidante del producto. Sin embargo, se observaron efectos negativos del estrés salino como una reducción del crecimiento de la lechuga y una menor viveza del color.

Efecto del momento del día de recolección y la demora hasta el procesado en la calidad de espinaca ‘baby’ mínimamente procesada.

La hora del día en la que se realizó la recolección afectó a la tasa de transpiración y en consecuencia al contenido en agua de espinaca ‘baby’. En invierno, las diferencias observadas entre cosechas se redujeron con el tiempo de demora hasta el procesado, mientras que en primavera las diferencias observadas entre las cosechas del día se mantuvieron a lo largo de la conservación del producto. Por lo tanto, el momento del día para la recolección no afectó a la calidad de espinaca ‘baby’ mínimamente procesada en

invierno. Sin embargo, en primavera las hojas de espinaca ‘baby’ cosechadas a primera hora de la mañana (8:30 h) proporcionaron un producto con mayor contenido en agua, viveza del color, textura firme, buena calidad visual así como menor tasa respiratoria. En invierno, el tiempo de demora hasta el procesado redujo las diferencias observadas el día de la cosecha, sin diferencias entre la demora de 24 o 48 h hasta el procesado. Sin embargo, en primavera la mejor calidad del producto cosechado a primera de la mañana se mantuvo con las demoras de 3, 24 o 48 h hasta el procesado. Otros estudios han puesto de manifiesto que la hora del día para la cosecha presenta un efecto variable en diferentes especies y variedades vegetales. Los resultados de nuestro estudio sugieren que las hojas de espinaca ‘baby’ podrían ser cosechadas a cualquier hora del día en invierno, mientras que en primavera se recomienda cosechar a primera hora de la mañana. Además, las hojas de espinaca ‘baby’ tolerarían una demora hasta el procesado de hasta 48 h, sin que se afecte significativamente a su calidad.

Efecto de distintos sistemas de enfriado de uso industrial en la calidad de espinaca ‘baby’ mínimamente procesada.

Según este estudio, el pre-enfriamiento de espinaca ‘baby’ se recomienda especialmente en los periodos cálidos. Los sistema de hidro-enfriamiento (HE) y enfriamiento por vacío (EV) son los sistemas que mejor redujeron la tasa respiratoria y evitaron la pérdida de agua del producto. El mayor contenido en agua de las hojas se relacionó con una mayor viveza en el color. Sin embargo, aunque las hojas se hidrataron en el tiempo posterior a su enfriado mediante EV, en primavera el daño celular registrado justo tras el enfriado refleja la severidad de este sistema para ‘hojas jóvenes’. Además, el agua remanente en la superficie de la hoja derivada de la aplicación de los sistemas de HE y EV no potenció el desarrollo de podredumbres. En primavera, la reducción en la tasa respiratoria de espinaca ‘baby’ en el caso de HE y EV redujo los

cambios en la composición gaseosa del espacio de cabeza en las bolsas, lo que puede ser importante en el diseño del envase. Nuestros resultados muestran que las condiciones de EV aplicadas en este estudio redujeron ligeramente la calidad sensorial del producto debido al aumento del daño mecánico en las hojas por el aumento de su fragilidad y daño celular. Son necesarios más estudios específicos para determinar en este sistema de enfriamiento la tasa óptima de reducción de presión y el tiempo necesario para recuperar la presión atmosférica, y de esta forma prevenir el daño en el tejido provocado por la entrada rápida de agua a causa del vacío generado.

Influencia de la exposición a distintas condiciones de luz y de atmósfera durante la vida útil de espinaca ‘baby’ mínimamente procesada.

En las condiciones de nuestro estudio, la atmósfera modificada es la principal causa de los cambios en calidad observados cuando las hojas de espinaca ‘baby’ se exponen a diferentes condiciones de iluminación durante la conservación. Los efectos beneficiosos o estresantes de la exposición a la luz y a la atmósfera modificada generada dependen del parámetro analizado. En condiciones de exposición a la luz, se generó una menor atmósfera modificada en el envase con elevada presión parcial de O_2 (pO_2) y baja presión parcial de CO_2 (pCO_2). Estas condiciones de atmósfera de conservación fueron perjudiciales con una aceleración del progreso de senescencia del tejido con las características de un estrés oxidativo (células dañadas, peroxidación de lípidos y degradación de clorofila) y un mayor crecimiento bacteriano. En condiciones de oscuridad, se generó una mayor modificación de la atmósfera en el envase con baja pO_2 y elevada pCO_2 . Estas condiciones de atmósfera de conservación fueron también perjudiciales debido al intenso desarrollo de malos aromas, el aumento en el pH y pérdida de electrolitos y la reducción en los valores de eficiencia fotosintética. El único efecto directo observado a causa de la exposición a la luz fue la pérdida de agua y en

consecuencia la disminución de calidad visual de las hojas, aunque en condiciones de atmósfera controlada se previno por la humidificación de la atmósfera. Se recomiendan niveles moderados de O₂ y CO₂ alcanzados en este estudio en las condiciones de fotoperiodo para frenar tanto la senescencia como el daño oxidativo y por CO₂ en hojas de espinaca 'baby' mínimamente procesada.

BIBLIOGRAFÍA

- Acedo, A. L., Jr., 2010. Postharvest technology for leafy vegetables. AVRDC-ADB Postharvest Projects RETA 6208/6376, AVRDC Publication No. 10–733. AVRDC – The World Vegetable Center, Taiwan. http://203.64.245.61/fulltext_pdf/EB/2001-2010/eb0129.pdf (Acceso Mayo, 2016).
- Acosta, J. A., Faz, A., Jansen, B., Kalbitz, K., Martínez-Martínez, S., 2011. Assessment of salinity status in intensively cultivated soils under semiarid climate, Murcia, SE Spain. *J. Arid Environ.* 75, 1056–1066.
- AFHORLA, Asociación Española de Fabricantes de Frutas y Hortalizas Lavadas Listas para su Empleo, 2010. Guía de buenas prácticas de producción de IV Gama. Asociación Española de Frutas y Hortalizas Lavadas, Listas para su Empleo. http://www2.fepex.es/archivos/publico/GuiaBuenasPracticas_IV_Gama_ver2.pdf (Acceso Mayo, 2016).
- Agüero, M. V., Ponce, A. G., Moreira, M. R., Roura, S. I., 2011. Lettuce quality loss under conditions that favor the wilting phenomenon. *Postharvest Biol. Technol.* 59, 124–131.
- Ahuja, I., de Vos, R. C. H., Bones, A. M., Hall, R. D., 2010. Plant molecular stress responses face climate change. *Trends Plant Sci.* 15, 664–667.
- Al-Ati, T., Hotchkiss, J. H., 2002. Application of packaging and modified atmosphere to fresh-cut fruits and vegetables. En: Lamikanra, O (Ed.), *Fresh-cut Fruits Vegetables: Science Technology Market*. CRC Press, Boca Raton, FL, 305–338.
- Allen, R. G., Pereira, L. S., Raes, D., Smith, M., 1999. Crop evapotranspiration. Guidelines for computing crop water requirements. FAO Irrigation and Drainage Paper 56, FAO, Rome.

-
- Allende, A., Aguayo E., Artés, F., 2003. Microbial and sensory quality of commercial fresh processed red lettuce throughout the production chain and shelf life. *Int. J. Food Microbiol.* 91, 109–117.
- Allende, A., Tomás-Barberán, F. A., Gil, M. I., 2006. Minimal processing for healthy traditional foods. *Trends Food Sci.Tech.* 17, 513–519.
- Al-Maskri A., Al-Kharusi L., Al-Miqbali H., Khan M. M., 2010. Effects of salinity stress on growth of lettuce (*Lactuca sativa*) under closed-recycle nutrient film technique. *Int. J. Agric. Biol.* 12, 377–380.
- Alves, I., Pereira, L. S., 2000. Modelling surface resistance from climatic variables? *Agric. Water Manage.* 42, 371–385.
- Andújar, M., Martínez, F., López, A., 2010. Comportamiento de lechugas para IV Gama en el valle del Guadalentín-Lorca (Murcia). *Horticultura* 287, 32–37.
- Anon., 1994. ASHRAE handbook: Methods of precooling fruits, vegetables, and cut flowers. Refrigeration Systems and Applications.
- Artés, F., Artés-Hernández, F., 2003. Etapas decisivas y diseño de instalaciones para la elaboración de productos procesados en fresco. En: Lobo, M. G. y González M (Eds.), Productos Hortofrutícolas Mínimamente Procesados. Edit. Gobierno de Canarias, La Laguna, 57–78.
- Ashraf, M., 2004. Some important physiological selection criteria for salt tolerance in plants. *Flora* 199, 361–376.
- Babic, I., Watada, A. E., 1996. Microbial populations of fresh-cut spinach leaves affected by controlled atmospheres. *Postharvest Biol. Technol.* 9, 187–193.
- Balandrin, M. F., Klocke, J. A., Wurtele, E. S., Bollinger, W. H., 1985. Natural plant chemicals: sources of industrial and medicinal materials. *Science* 228, 1154–1160.

-
- Baldassarre, V., Cabassi, G., Ferrante, A., 2011. Use of chlorophyll *a* fluorescence for evaluating the quality of leafy vegetables. *Aust. J. Crop Sci.* 5, 735–741.
- 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.
- Barth, M. M., Zhuang, H., Saltveit, M. E., 2004. Fresh-cut vegetables. En: Gross, K. C., Wang, C. Y., Saltveit, M. E (Eds.), USDA Agricultural Handbook 66. <http://www.ba.ars.usda.gov/hb66/freshCutVegetables.pdf> (Acceso Mayo, 2016).
- Beaulieu, J. C., Baldwin, E. A., 2002. Flavor and aroma of fresh-cut fruits and vegetables. En: Lamikanra, O. (Ed.), *Fresh-cut Fruits Vegetables: Science Technology Market*. CRC Press, Boca Raton, FL, 391–425.
- Bekhradi, F., Delshad, M., Marín, A., Luna, M. C., Garrido, Y., Kashi, A., Babalar, M., Gil, M. I., 2015. Salt stress on physiological and postharvest quality characteristics of different Iranian genotypes of basil. *Hortic. Environ. Biotechnol.* 56, 777–785.
- 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, Inc., NY, 111–159.
- Bergquist, S. A. M., Gertsson, U. E., Nordmark, L. Y. G., Olsson, M. E., 2007. Effects of shade nettings, sowing time and storage on baby spinach flavonoids. *J. Sci. Food Agric.* 87, 2464–2471
- Beuchat, L. R., Adler, B. B., Clavero, M. R. S., Nail, B. V., 1998. Efficacy of spray application of chlorinated water in killing pathogenic bacteria on raw apples, tomatoes and lettuce. *J. Food Protect.* 61, 1305–1311.

- 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*. McGraw-Hill, Madrid, 103–121.
- Brackett, R. E., 1999. Incidence, contributing factors, and control of bacterial pathogens in produce. *Postharvest Biol. Technol.* 15, 305–311.
- Braidot, E., Petrusa, E., Peresson, C., Patui, S., Bertolini, A., Tubaro, F., Wählby, U., Coan, M., Vianello, A., Zancani, M., 2014. Low-intensity light cycles improve the quality of lamb's lettuce (*Valerianella olitoria* L. Pollich) during storage at low temperature. *Postharvest Biol. Technol.* 90, 15–23.
- Brecht, J. K., Chau, K. V., Fonseca, S. C., Oliveira, F. A. R., Silva, F. M., Nunes, M. C. N., Bender, R. J., 2003. Maintaining optimal atmosphere conditions for fruits and vegetables throughout the postharvest handling chain. *Postharvest Biol. Technol.* 27, 87–101.
- Brosnan, T., Sun, D. -W., 2001. Precooling technique and applications for horticultural products – a review. *Int. J. Refrig.* 24, 154–170.
- Bunce, J. A., 1997. Does transpiration control stomatal responses to water vapour pressure deficit? *Plant Cell Environ.* 20, 131–135.
- Burg, S. P., 2004. Oxygen, carbon dioxide, ammonia and cyanide. Chapter 4. En: Burg, S. P. (Ed.), *Postharvest Physiology and Hypobaric Storage of Fresh Produce*. CABI Publishing, UK, 81–131.
- Burgheimer, F., McGill, J. N., Nelson, A. I., Steinberg, M. P., 1967. Chemical changes in spinach stored in air and controlled atmosphere. *Food Technol.* 21, 109–111.
- Bürling, K., Hunsche, M., Noga, G., 2010. Quantum yield of non-regulated energy dissipation in PSII (Y (NO)) for early detection of leaf rust (*Puccinia triticina*)

- infection in susceptible and resistant wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. *Precis. Agr. 11*, 703–716.
- Cameron, A. C., Talasila, P. C., Joles, D. W., 1995. Predicting permeability needs for modified atmosphere packaging of lightly processed fruits and vegetables. *HortScience 30*, 25–34.
- Cantwell, M., Rovelo, J., Nie, X., Rubatzky, V., 1998. Specialty salad greens: postharvest physiology and shelf-life. *Acta Hort. 467*, 371–377.
- Cantwell M. I., Kasmire R. F., 2002. Postharvest handling systems: Flower, leafy and stem vegetables. En: Kader, A. A. (Ed.), *Postharvest Technology of Horticultural Crops*. University of California, Agriculture and Natural Resources, Publication 3311; Oakland, CA, 407–421.
- Cantwell, M. I., Suslow, T. V., 2002. Postharvest handling systems: Fresh-cut fruits and vegetables. En: Kader, A. A. (Ed.), *Postharvest Technology of Horticultural Crops*. University of California, Agriculture and Natural Resources, Publication 3311; Oakland, CA, 445–463.
- Cantwell, M., Hong, G., Nie, X., 2010. Using tissue ammonia and fermentative volatile concentrations as indicators of beneficial and stressful modified atmospheres for leafy and floral vegetables. *Acta Horticulturae 876*, 165–172.
- Cerdeño, V. J. M., 2011. Demanda de frutas y hortalizas en España. Distribución y consumo 119, 16–43.
http://www.mercasa.es/files/multimedios/1318933366_pag_016-044_Cerdeno.pdf
(Acceso Mayo, 2016).
- Chang, A. C., Yang, T. Y., Riskowski, G. L., 2013. Ascorbic acid, nitrate, and nitrite concentration relationship to the 24 hour light/dark cycle for spinach grown in different conditions. *Food Chem. 138*, 382–388.

- Chisari, M., Todaro, A., Barbagallo, R. N., Spagna, G., 2010. Salinity effects on enzymatic browning and antioxidant capacity of fresh-cut baby Romaine lettuce (*Lactuca sativa* L. cv. Duende). *Food Chem.* 119, 1502–1506.
- Clarkson, G. J. J., O’Byrne, E. E., Rothwell, S. D., Taylor, G., 2003. Identifying traits to improve postharvest processability in baby leaf salad. *Postharvest Biol. Technol.* 30, 287–298.
- Clarkson, G. J. J., Rothwell, S. D., Taylor, G., 2005. End of day harvest extends shelf life. *HortScience* 40, 1431–1435
- 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, 1026–1032.
- Conte, A., Conversa, G., Scrocco, C., Brescia, I., Laverse, J., Eliba, A., Nobile, M. A. D., 2008. Influence of growing periods on the quality of baby spinach leaves at harvest and during storage as minimally processed produce. *Postharvest Biol. Technol.* 50, 190–196.
- Costa, L., Millan Montano, Y., Carrión, C., Rolny, N., Guiamet, J. J., 2013. Application of low intensity light pulses to delay postharvest senescence of *Ocimum basilicum* leaves. *Postharvest Biol. Technol.* 86, 181–191.
- de Frias, J. A., Luo, Y., Kou, L., Zhou, B., Wang, Q., 2015. Improving spinach quality and reducing energy costs by retrofitting retail open refrigerated cases with doors. *Postharvest Biol. Technol.* 110, 114–120.
- Delorme, V. G. R., McCabe, P. F., Kim, D. -J., Leaver, C. J., 2000. A matrix metalloproteinase gene is expressed at the boundary of senescence and programmed cell death in cucumber. *Plant Physiol.* 123, 917–927.
- de Rovira D., 1996. The dynamic flavor profile method. *Food Technol.* 50, 55–60.

- Dias, J. S., 2013. Vegetable breeding for nutritional quality and health benefits. En: Carbone, K. (Ed.), *Cultivar: Chemical Properties, Antioxidant Activities and Health Benefits*. Nova Science Publishers, Inc., Hauppauge, New York, 1–81.
- 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.
- Esteban, R., Fleta-Soriano, E., Buezo, J., Míguez, F., Becerril, J. M., García-Plazaola, J. I., 2014. Enhancement of zeaxanthin in two-steps by environmental stress induction in rocket and spinach. *Food Res. Int.* 65, 207-214.
- Evans, J. A., Scarcelli, S., Swain, M. V. L., 2007. Temperature and energy performance of refrigerated retail display and commercial catering cabinets under test conditions. *Int. J. Refrig.* 30, 398–408.
- Falovo, C., Roupael, Y., Rea, E., Battistelli, A., Colla, G., 2009. Nutrient solution concentration and growing season affect yield and quality of *Latuca sativa* L. var. *acephala* in floating raft culture. *J. Sci. Food Agric.* 89, 1682–1689.
- Faize, M., Burgos, L., Faize, L., Piqueras, A., Nicolas, E., Barba-Espin, G., Clemente-Moreno, M. J., Alcobendas, R., Artlip, T., Hernandez, J. A., 2011. Involvement of cytosolic ascorbate peroxidase and Cu/Zn-superoxide dismutase for improved tolerance against drought stress. *J. Exp. Bot.* 62, 2599–2613.
- Fan, X., Sokorai, K. J. B., 2005. Assessment of radiation sensitivity of fresh-cut vegetables using electrolyte leakage measurement. *Postharvest Biol. Technol.* 36, 191–197.
- Fan, S., Blake, T. J., Blumwald, E., 1994. The relative contribution of elastic and osmotic adjustments to turgor maintenance of woody species. *Physiol. Plant* 90, 408–413.

- Fan, D., Kandasamy, S., Hodges, D. M., Critchley, A. T., Prithiviraj, B., 2014. Pre-harvest treatment of spinach with *Ascophyllum nodosum* extract improves post-harvest storage and quality. *Sci. Hort.* 170, 70–74.
- FDA, U.S. Food and Drug Administration, 2013. Food Code. <http://www.fda.gov/Food/GuidanceRegulation/RetailFoodProtection/FoodCode/default.htm> (Acceso Mayo, 2016).
- Fernández-León, M. F., Fernández-León, A. M., Lozano, M., Ayuso, M. C., González-Gómez, D., 2013. Different postharvest strategies to preserve broccoli quality during storage and shelf life: Controlled atmosphere and 1-MCP. *Food Chem.* 138, 567–573.
- Ferrante, A., Maggiore, T., 2007. Chlorophyll a fluorescence measurements to evaluate storage time and temperature of *Valeriana* leafy vegetables. *Postharvest Biol. Technol.* 45, 73–80.
- Floristán, J.M., 2009. La evolución de las hortalizas en la IV Gama. *Horticultura* 213, 22–25.
- 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.
- Fontana, E., Nicola, S., 2009. Traditional and soilless culture systems to produce corn salad (*Valerianella olitoria* L.) and rocket (*Eruca sativa* Mill.) with low nitrate content. *J. Food Agric. Environ.* 7, 405–410.
- FTNON, 2016. Drying fresh salads, vegetables and herbs. <https://www.ftnon.com/en/processes/drying/drying-fresh-salads-vegetables-and-herbs/> (Acceso Mayo, 2016).
- García-Macías, P., Ordidge, M., Vysini, E., Waroonphan, S., Battey, N. H., Gordon, M. H., Hadley, P., John, P., Lovegrove, J. A., Wagstaffe, A., 2007. Changes in the

- flavonoid and phenolic acid contents and antioxidant activity of red leaf lettuce (Lollo Rosso) due to cultivation under plastic films varying in ultraviolet transparency. *J. Agric. Food Chem.* 55, 10168–10172.
- Garrido, Y., Tudela, J. A., Marín, A., Mestre, T., Martínez, V., Gil, M. I., 2014. Physiological, phytochemical and structural changes of multi-leaf lettuce caused by salt stress. *J. Sci. Food Agric.* 94, 1592–1599.
- Garrido, Y., Tudela, J. A., Gil, M. I., 2015. Comparison of industrial precooling systems for minimally processed baby spinach. *Postharvest Biol. Technol.* 102, 1–8.
- Gent, M. P. N., 2012. Composition of hydroponic lettuce: effect of time of day, plant size, and season. *J. Sci. Food Agric.* 92, 542–550.
- Gergoff Grozeff, G. E., Chaves, A. R., Bartoli, C. G., 2013. Low irradiance pulses improve postharvest quality of spinach leaves (*Spinacia oleraceae* L. cv Bison). *Postharvest Biol. Technol.* 77, 35–42.
- Gil, M. I., Gorny, J. R., Kader, A. A., 1998. Responses of ‘Fuji’ apple slices to ascorbic acid treatments and low-oxygen atmospheres. *HortScience* 33, 305–309.
- 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., Tudela, J. A., 2003. Proceso de elaboración de hortalizas de la IV Gama: ejemplo práctico. En: Lobo, M. G., González, M. (Eds.), *Productos Hortofrutícolas Mínimamente Procesados*. Edit. Gobierno de Canarias, La Laguna, 95–109.
- Gil M. I. Allende, A., Beltrán, D., Selma, V., 2005. Nuevas tendencias de procesado y conservación de alimentos vegetales de IV gama. *CTC Alimentación* 26, 146–151.
- Gil, M. I., Tudela, J. A., Martínez-Sánchez, A., Luna, M. C., 2012. Harvest maturity indicators of leafy vegetables. *Stewart Postharvest Rev.* 8, 1–9.

- Gil, M. I., Tudela, J. A., Luna, M. C., Allende, A., 2013. Water management and its effect on the postharvest quality of fresh-cut vegetables. *Stewart Postharvest Rev.* 9, 1–8.
- Glowacz, M., Mogren, L. M., Reade, J. P., Cobb, A. H., Monaghan, J. M., 2014. High-but not low-intensity light leads to oxidative stress and quality loss of cold-stored baby leaf spinach. *J. Sci. Food Agr.* 95, 1821–1829.
- Gorny, J. R. 2001. A summary of CA and MA requirements and recommendations for fresh-cut (minimally processed) fruits and vegetables. Postharvest Horticulture Series. University of California, Davis, No. 22A, 95-145
- Gorny, J. R. 2003. Packaging Design for Fresh-cut Produce. International Fresh-cut Produce Association, Alexandria, VA, 1–124.
- Gruda, N., 2005. Impact of environmental factor on product quality of greenhouse vegetables for fresh consumption. *Crit. Rev. Plant. Sci.* 24, 227–247.
- Guy, C. L., Li, Q.-B., 1998. The organization and evolution of the spinach stress 70 molecular chaperone gene family. *Plant Cell* 10, 539–556.
- Hasegawa, P. M., 2006. Fisiología del estrés. En: Taiz, L., Zeiger, E. (Eds.), Fisiología Vegetal. Universitat Jaume I, Castelló de la Plana, 1129–1188.
- Hasperué, J. H., Gómez-Lobato, M. E., Chaves, A. R., Civello, P. M., Martínez, G. A., 2013. Time of day at harvest affects the expression of chlorophyll degrading genes during postharvest storage of broccoli. *Postharvest Biol. Technol.* 82, 22–27.
- Hasperué, J., Lemoine, M. L., Chaves, A., Martínez, G., 2014. Effect of time of day for harvest and postharvest treatments on the sugar metabolism of broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*). *Agr. Food Sci.* 1, 48–59.
- He, H., Fingerling, G., Schnitzler, W. H., 2000. Seasonal variations of the glucosinolate amounts in *Brassica campestris* L. spp. *chinensis*. *J. Appl. Botany* 74, 198–202.

- He, S. Y., Feng, G. P., Yang, H. S., Wu, Y., Li, Y. F., 2004. Effects of pressure reduction rate on quality and ultrastructure of iceberg lettuce after vacuum cooling and storage. *Postharvest Biol. Technol.* 33, 263–273.
- Heard, G. M., 2002. Microbiology of fresh-cut produce. En: Lamikanra, O. (Ed.), *Fresh-cut Fruits Vegetables: Science Technology Market*. CRC Press, Boca Raton, FL, 187–248.
- Hernández, J. A., Rubio, M., Olmos, E., Ros-Barceló, A., Martínez-Gómez, P., 2004. Oxidative stress induced by long-term Plum Pox virus infection in peach (*Prunus persica* L. cv. GF305). *Physiol. Plant.* 122, 486–495.
- Herner, R. C. 1988. High CO₂ effects on plant organs. En: Weichmann, J. (Ed.), *Postharvest Physiology of Vegetables*. Marcel Dekker, New York, 239–253.
- Herner, R. H., Krahn, T. R., 1973. Chopped lettuce should be kept dry and cold. *Produce Market Association Yearbook*, Produce Market Association, Newark, DE, 130.
- Hodges, D. M., Forney, C. F., Wismer, W., 2000. Processing line effects on storage attributes of fresh-cut spinach leaves. *HortScience* 35, 1308–1311.
- Hodges, D. M., Toivonen, P. M. A., 2008. Quality of fresh-cut fruits and vegetables as affected by exposure to abiotic stress. *Postharvest Biol. Technol.* 48, 155–162.
- Holbrook, N. M., 2006. El balance hídrico de las plantas. En: Taiz, L., Zeiger, E. (Eds.), *Fisiología Vegetal*. Universitat Jaume I, Castelló de la Plana, 79–115.
- Holdridge, L. R., 1959. Simple method for determining potential evapotranspiration from temperature data. *Science* 130, 572.
- 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. R., Pandjaitan, N., Morelock, T., Gil, M. I., 2002. Antioxidant capacity and phenolic content of spinach as affected by genetics and growing season. *J. Agric. Food Chem.* 50, 5891–5896.
- Hu, Y., Burucs, Z., von Tucher, S., Schmidhalter, U., 2007. Short-term effects of drought and salinity on mineral nutrient distribution along growing leaves of maize seedlings. *Environ. Exp. Bot.* 60, 268–275.
- IFPA, International Fresh-cut Produce Association, PMA, Produce Marketing Association, 1999. Fresh-cut produce handling, Guidelines (3rd edition), 1–40.
- Jacxsens, L., Devlieghere, F., Debevere, J., 2001. Effect of high oxygen modified atmosphere packaging on packaging on microbial growth and sensorial qualities of fresh-cut produce. *Int. J. Food Microbiol.* 71, 197–210.
- 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.
- Johnson, H., 2008. Soilless culture of greenhouse vegetables. Vegetable Research and Information Center, Cooperative Extension, University of California, USA. http://vric.ucdavis.edu/pdf/hydroponics_soillesscultureofgreenhouse%20vegetables.pdf (Acceso Mayo, 2016)..
- Kabir, H., 1994. Fresh-cut vegetables. En: Brods, A. L., Herndon, V. A. (Eds.), Modified Atmosphere Food Packaging. Institute of Packaging Professionals, 155–160.
- Kacprzyk, J., Daly, C. T., McCabe, P. F., 2011. The botanical dance of death: programmed cell death in plants, En: Kader, J. C., Delseny, M. (Eds.), Advances in Botanical Research. Elsevier Ltd, 169–261.

- Kader, A. A., 1986. Biochemical and physiological basis for effects of controlled and modified atmospheres on fruits and vegetables. *Food Technology* 40, 99–100, 102–104.
- Kader, A. A., 1992. Postharvest biology and technology: an overview. En: Kader, A. A. (Ed.), *Postharvest Technology of Horticultural Crops*. University of California, Division of Agricultural Resources, Oakland, CA, Publication 3311, 15–20
- Kader, A. A., 2002. Quality parameters of fresh-cut fruit and vegetable products. En: Lamikanra, O. (Ed.), *Fresh-cut Fruits Vegetables: Science Technology Market*. CRC Press, Boca Raton, FL, 12–19.
- Kader, A. A., Zagory, D., Kerbel, E. L., 1989. Modified atmosphere packaging of fruits and vegetables. *Crit. Rev Food Sci.* 28, 1–30.
- Kenigsbuch, D., Ovadia, A., Shahar-Ivanova, Y., Chalupowicz, D., Maurer, D., 2014. 'Rock-Ad', a new wild rocket (*Diplotaxis tenuifolia*) mutant with late flowering and delayed postharvest senescence. *Sci. Hort.* 174, 17–23.
- Khalid, K. A., Hu, W., Cai, W., Hussien, M. S., 2009. Influence of cutting and harvest day time on the essential oils of lemon balm (*Melissa officinalis* L.). *J. Essent. Oil Bear. Plant* 12, 348–357.
- Kim, H. -J., Fonseca, J. M., Choi, J. -H., Kubota, C., Dae, Y. K., 2008. Salt in irrigation water affects the nutritional and visual properties of romaine lettuce (*Lactuca sativa* L.). *J. Agric. Food Chem.* 56, 3772–3776.
- Kimura, M., Rodriguez-Amaya, D. B., 2003. Carotenoid composition of hydroponic leafy vegetables. *J. Agric. Food Chem.* 51, 2603–2607.
- Kitinoja, L., Thompson, J. F., 2010. Pre-cooling systems for small-scale producers. *Stewart Postharvest Rev.* 2, 1–14.

-
- Klughammer, C., Schreiber, U., 2008. Complementary PS II quantum yields calculated from simple fluorescence parameters measured by PAM fluorometry and the saturation pulse method. *PAM Application Notes 1*, 27–35.
- Ko, N. P., Watada, A. E., Schlimme, D. V., Bouwkamp, J. C., 1996. Storage of spinach under low oxygen atmosphere above the extinction point. *J. Food Sci.* 61, 398–400.
- Kou, L., Luo, Y., Park, E., Turner, E. R., Barczak, A., Jurick, W. M., 2014. Temperature abuse timing affects the rate of quality deterioration of commercially packaged ready-to-eat baby spinach. Part I: sensory analysis and selected quality attributes. *Postharvest Biol Technol.* 91, 96–103.
- Kou, L., Luo, Y., Ingram, D. T., Yan, S., Jurick, W. M., 2015. Open-refrigerated retail display case temperature profile and its impact on product quality and microbiota of stored baby spinach. *Food Control* 47, 686–692.
- Kris-Etherton, P. M., Hecker, K. D., Bonanome, A., Coval, S. M., Binkoski, A. E., Hilpert, K. F., Griel, A. E., Etherton, T. D., 2002. Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *Am. J. Med.* 113, 71–88.
- Kroupitski, Y., Golberg, D., Belausov, E., Pinto, R., Swartzberg, D., Granot, D., Sela, S., 2009. Internalization of *Salmonella enterica* in leaves is induced by light and involves chemotaxis and penetration through open stomata. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 6076–6086.
- Lee, D., 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.

- Lemcoff, J. H., Guarnaschelli, A. B., Garau, A. M., Prystupa, P., 2002. Elastic and osmotic adjustments in rooted cuttings of several clones of *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh. from southeastern Australia after a drought. *Flora* 197, 134–142.
- Lers, A., Jiang, W., Lomaniec, E., Aharoni, N., 1998. Gibberellic acid and CO₂ additive effect in retarding postharvest senescence of parsley. *J. Food Sci.* 63, 66–68.
- Lester, G. E., Makus, D. J., Hodges, D. M., 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.
- Lester, G. E., Makus, D. J., Hodges, D. M., Jifon, J. L., 2013. Summer (Subarctic) versus winter (Subtropic) production affects spinach (*Spinacia oleracea* L.) leaf bionutrients: Vitamins (C, E, Folate, K1, provitamin A), lutein, phenolics, and antioxidants. *J. Agric. Food Chem.* 61, 7019–7027.
- Levine, A., Pennell, R. I., Alvarez, M. E., Palmer, R., Lamb, C., 1996. Calcium-mediated apoptosis in a plant hypersensitive disease resistance response. *Curr. Biol.* 6, 427–437.
- Li, Q. -B., Haskell, D. W., Guy, C. L., 1999. Coordinate and non-coordinate expression of the stress 70 family and other molecular chaperones at high and low temperature in spinach and tomato. *Plant Mol. Biol.* 39, 21–34.
- Li, Q. -B., Haskell, D. W., Zhang, C., Sung, D. -Y., Guy, C., 2000. Diurnal regulation of Hsp70s in leaf tissue. *Plant J.* 21, 373–378.
- Li, Q., Kubota, C., 2009. Effects of supplemental light quality on growth and phytochemicals of baby leaf lettuce. *Environ. Exp. Bot.* 67, 59–64.
- Lichtenthaler, H. K., Wellburn, A. R., 1983. Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. *Biochemical Soc. Trans.* 11, 591–592.

- Lin, X. Y., Liu, X. X., Zhang, Y. P., Zhou, Y. Q., Hu, Y., Chen, Q. H., Zhan, Y. Y., Jin, C. W., 2014. Short-term alteration of nitrogen supply prior to harvest affects quality in hydroponic-cultivated spinach (*Spinacia oleracea*). *J. Sci. Food Agric.* 94, 1020–1025.
- Llorach R., Martínez-Sánchez A, Tomás-Barberán F. A., Gil M. I. Ferreres F., 2008. Characterisation of polyphenols and antioxidant properties of five lettuce varieties and escarole. *Food Chem.* 108, 1028–1038.
- 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., Martínez-Sánchez, A., Selma, M. V., Tudela, J. A., Baixauli, C., Gil, M. I., 2013a. Influence of nutrient solutions in an open-field soilless system on the quality characteristics and shelf life of fresh-cut red and green lettuces (*Lactuca sativa* L.) in different seasons. *J. Sci. Food Agric.* 93, 415–421.
- Luna, M. C., Tudela, J. A., Martínez-Sánchez, A., Allende, A., Gil, M. I., 2013b. Optimizing water management to control respiration rate and reduce browning and microbial load of fresh-cut romaine lettuce. *Postharvest Biol. Technol.* 80, 9–17.
- Luo, Y., He, Q., McEvoy, J. L., Conway, W. S., 2009. Fate of *Escherichia coli* O157:H7 in the presence of indigenous microorganisms on commercially packaged baby spinach, as impacted by storage temperature and time. *J. Food Prot.* 72, 2038–2045.
- McClung, C. R. 2006. Plant circadian rhythms. *Plant Cell* 18, 792–803.
- McDonald, K., Sun, D. -W., 2000. Vacuum cooling technology for the food processing industry: a review. *J. Food Eng.* 45, 55–65.

- McGill, J. N., Nelson, A. I., Steinberg, M. P., 1996. Effects of modified atmospheres on ascorbic acid and other quality characteristics of spinach. *J. Food Sci.* 31, 510–517.
- MAGRAMA, Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, 2015a. Material vegetal: lechuga.
<http://www.magrama.gob.es/app/materialVegetal/fichaMaterialVegetal.aspx?lng=es&IdFicha=2203> (Acceso Mayo, 2016).
- MAGRAMA, Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, 2015b. Material vegetal: espinaca.
<http://www.magrama.gob.es/app/materialVegetal/fichaMaterialVegetal.aspx?lng=es&IdFicha=2530> (Acceso Mayo, 2016).
- Mahmoudi, H., Huang, J., Gruber, M. Y., Kaddour, R., Lachaâl, M., Ouerghi, Z., Hannoufa, A., 2010. The impact of genotype and salinity on physiological function, secondary metabolite accumulation, and antioxidative responses in lettuce. *J. Agric. Food Chem.* 58, 5122–5130.
- Marin, A., Ferreres, F., Barberá, G. G., Gil, M. I., 2015. Weather variability influences color and phenolic content of pigmented baby leaf lettuces throughout the season. *J. Agric Food Chem.* 63, 1673–1681.
- Marshall, J. G., Dumbroff, E. B, 1999. Turgor regulation via cellwall adjustment in white spruce. *Plant Physiol.* 119, 313–319.
- Martínez-Sánchez, A., Gil-Izquierdo, A., Gil, M. I., Ferreres, F., 2008a. 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., Allende, A., Cortés-Galera, Y., Gil, M.I., 2008b. 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., Tudela, J. A., Luna, 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.
- 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.
- Maxwell K., Johnson G. N., 2000. Chlorophyll fluorescence—a practical guide. *J. Exp. Bot.* 51, 659–668.
- 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 (*Spinacia oleracea* L.). *Postharvest Biol. Technol.* 67, 1–9.
- Meilgaard, M., Civille, G. V., Carr, B. T., 1991. Sensory Evaluation Techniques, 2nd edition. CRC Press Inc., Boca Raton, FL, 213–215.
- Millar, A. J., 2004. Input signals to the plant circadian clock. *J. Exp. Bot.* 55, 277–283.
- Miller, A. R., 2003. Harvest and handling Injury: Physiology, biochemistry, and detection. En: Bartz, J. A., Brecht, J. K. (Eds.), *Postharvest Physiology and Pathology of Vegetables*, 2nd Edition. Marcel Dekker, Inc, New York, 177-208,
- Moccia, S., Frezza, D., Chiesa, A., 1998. Time of day at harvest effect on postharvest lettuce quality. *Agric. Trop. Subtrop.* 31, 83–86
- Moghaddam, P. R., Fallahi, J., Shajari, M. A., Mahallati, M. N., 2013. Effects of harvest date, harvest time, and post-harvest management on quantitative and qualitative traits in seedless barberry (*Berberis vulgaris* L.). *Ind. Crop Prod.* 42, 30–36.
- Monje, M., 2014. IV gama: crecimiento lento, pero firme. *Alimarket* 282, 120–125.

- Neocleous, D., Koukounaras, A., Siomos, A. S., Vasilakakis, M., 2014. Assessing the salinity effects on mineral composition and nutritional quality of green and red ‘baby’ lettuce. *J. Food Quality* 37, 1–8.
- Newman, J. M., Hilton, H. W., Clifford, S. C., Smith, A. C., 2005. The mechanical properties of some agronomic and postharvest effects. *J. Mater Sci.* 40, 1101–1104.
- Nicola S., Tibaldi G., Fontana E., 2009. Fresh-cut produce quality: implications for a systems approach. En: Florkowski, W. J., Shewfelt, R. L., Brueckner BandPrussia, S. E. (Eds.), *Postharvest Handling: A Systems Approach* (2nd edition). Academic Press, NewYork, 247–275.
- Nguyen-The, C., Carlin, F., 1994. The microbiology of minimally processed fresh fruits and vegetables. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 34, 371–401.
- 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.
- Nunhems, 2015. Las nuevas Multileaf y Mini Romanas, estrellas en las jornadas de lechuga Nunhems® en Murcia.
http://nunhems.es/www/NunhemsInternet.nsf/id/ES_ES_LTL-Field-Day-Murcia?open
(Acceso Mayo, 2016).
- O’Beirne, D., Francis, G. A., 2003. Reducing pathogen risk in MAP-prepared produce. En: Ahvenainen, R. (Ed.), *Novel Food Packaging Techniques*. Cambridge, Woodhead Publishing Limited, CRC Press LLC UK, Boca Raton, FL, 231–232.
- Oh, M. M., Carey, E. E., Rajashekar, C. B., 2009. Environmental stresses induce health promoting phytochemicals in lettuce. *Plant Physiol. Biochem.* 47, 578–583.

- Olarte, C., Sanz, S., Echavarri, 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.
- Olmos, E., Sánchez-Blanco, M. J., Ferrández, T., Alarcón, J. J., 2007. Subcellular effects of drought stress in *Rosmarinus officinalis*. *Plant Biol.* 9, 77–84.
- Ozturk, H. M., Ozturk, H. K., 2009. Effect of pressure on the vacuum cooling of iceberg lettuce. *Int. J. Refrig.* 32, 402–410.
- 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.
- Pandrangi, S., LaBorde, L. F., 2004. Retention of folate, carotenoids, and other quality characteristics in commercially packaged fresh spinach. *J. Food Sci.* 69, C702–C707.
- Papadopoulos I., 1987. Effects of residual soil salinity resulting from irrigation with sulphate waters on lettuce. *Plant Soil* 97, 171–177.
- Pareek, A., Singla, S. L., Grover, A., 1997. Short-term salinity and high temperature stress-associated ultrastructural alterations in young leaf cells of *Oryza sativa* L. *Ann. Bot.* 80, 629–639.
- Parida, A. K., Das, A. B., 2005. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 60, 324–349.
- Paull, R. E., 1999. Effect of temperature and relative humidity on fresh commodity quality. *Postharvest Biol. Technol.* 15, 263–277.
- Peltier, J. P., Marigo, G., 1999. Drought adaptation in *Fraxinus excelsior* L.: physiological basis of the elastic adjustment. *J. Plant Physiol.* 154, 529–535.
- Philosoph-Hadas, S., Jacob, D., Meir, S., Aharoni, N., 1993. *Acta Horticulturae* 343, 117–122.

- Piagentini, A. M., Guemes, D. R., Pirovani, M. E., 2002. Sensory characteristics of fresh-cut spinach preserved by combined factors methodology. *J. Food Sci.* 67, 1544–1549.
- Poulsen, N., Johansen, A. S., Sorensen, J. N., 1995. Influence of growth conditions on the value of crisphead lettuce. 4. Quality changes during storage. *Plant Foods Hum. Nutr.* 47, 157–162.
- Rawson, H. M., Begg, J. E., Woodward, R. G., 1977. The effect of atmospheric humidity on photosynthesis, transpiration and water use efficiency of leaves of several plant species. *Planta* 134, 5–10.
- Reape, T. J., McCabe, P. F., 2013. Commentary: the cellular condensation of dying plant cells: programmed retraction or necrotic collapse? *Plant Sci.* 207, 135–139.
- Reddy, L., Odhav, B., Bhoola, K. D., 2003. Natural products for cancer prevention: a global perspective. *Pharmacol. Ther.* 99, 1–13
- Rijk Zwaan, 2016a. Convenience Catalogue. http://issuu.com/rijkszwaanint/docs/rijk_zwaan_convenience_catalogus_20?e=4772341/5620603 (Acceso Mayo, 2016).
- Rijk Zwaan, 2016b. Productos & Servicios. Cultivos. Espinaca. http://www.rijkszwaan.es/wps/wcm/connect/RZ+ES/Rijk+Zwaan/Products_and_Services/Products/Crops/Espinaca (Acceso Mayo, 2016).
- Rijk Zwaan, 2016c. Productos & Servicios. Cultivos, Lechuga. http://www.rijkszwaan.es/wps/wcm/connect/RZ+ES/Rijk+Zwaan/Products_and_Services/Products/Crops/Lechuga (Acceso Mayo, 2016).
- Rodriguez, S. C., Cantwell, M., 2002. Efecto de atmósferas controladas en la conservación de espinacas mínimamente procesadas. En: 3er Cong. Iberoamericano de Tecnología Postcosecha y Agroexportaciones, Santiago de Chile, December.

- Rolny, N., Costa, L., Carrión, C., Guiamet, J. J., 2011. Is the electrolyte leakage assay an unequivocal test of membrane deterioration during leaf senescence? *Plant Physiol. Biochem.* 49, 1220–1227.
- Rouphael, Y., Cardarelli, M., Bassal, A., Leonardi, C., Giuffrida, F., Colla, G., 2012. Vegetable quality as affected by genetic, agronomic and environmental factors. *J. Food Agric. Environ.* 10, 680–688.
- Rubio, J. S., Rubio, F., Martínez, V., García-Sánchez, F., 2010. Amelioration of salt stress by irrigation management in pepper plants grown in coconut coir dust. *Agric. Water Manag.* 97, 1695–1702.
- Ruppel, S., Krumbein, A., Schreiner, M., 2008. Composition of the phyllospheric microbial populations on vegetable plants with different glucosinolate and carotenoid compositions. *Microb. Ecol.* 56, 364–372.
- Salama, S., Trivedi, S., Busheva, M., Arafa, A. A., Garab, G., Erdei, L., 1994. Effects of NaCl salinity on growth, cation accumulation, chloroplast structure and function in wheat cultivars differing in salt tolerance. *J. Plant. Physiol* 144, 241–247.
- Salomé, P. A., McClung, C. R., 2005. What makes Arabidopsis tick: Light and temperature entrainment of the circadian clock. *Plant Cell Environ.* 28, 21–38.
- Saltveit, M. E., 1997. Physical and physiological changes in minimally processed fruits and vegetables. En: Tomás-Barberán, F. A., Robin, R. D. (Eds.), *Phytochemistry of Fruits and Vegetables*. Oxford University Press, Oxford, 205–220.
- Saltveit, M. E., 2003. Is it possible to find an optimal controlled atmosphere? *Postharvest Biol. Technol.* 27, 3–13.
- Santos, J., Oliva-Teles, M. T., Delerue-Matos, C., Oliveira, M. B. P. P., 2014. Multi-elemental analysis of ready-to-eat ‘baby leaf’ vegetables using microwave digestion

- and high-resolution continuum source atomic absorption spectrometry. *Food Chem.* 151, 311–316.
- Sapers, G. M., 2003. Washing and sanitizing raw materials for minimally processed fruit and vegetable products. En: Novak, J. S., Sapers, G. M., Juneja, V. K. (Eds.), *Microbial Safety of Minimally Processed Foods*. CRC Press LLC, Boca Raton, FL, 221–253.
- Schelimme, D. V., Rooney, M. L., 1994. Packaging of minimally fruit and vegetables. En: Wiley, R. C. (Ed.), *Minimally Processed Refrigerated Fruits and Vegetables*. Chapman & Hall, New York, 135–182.
- Schofield, R. A., DeEll, J. R., Murr, D. P., Jenni, S., 2005. Determining the storage potential of iceberg lettuce with chlorophyll fluorescence. *Postharvest Biol. Technol.* 38, 43–56.
- 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.
- 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 sativa* L.) are influenced by soil and soilless agricultural production systems. *Postharvest Biol. Technol.* 63, 16–24.
- Seo, M. W., Yang, D. S., Kays, S. J., Kim, J. H., Woo, J. H., Park, K. W., 2009. Effects of nutrient solution electrical conductivity and sulfur, magnesium, and phosphorus concentration on sesquiterpene lactones in hydroponically grown lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Sci. Hort.* 122, 369–374.
- Shackel, K. A., Greve, C., Labavitch, J. M., Ahmadi, H., 1991. Cell turgor changes associated with ripening in tomato pericarp tissue. *Plant Physiol.* 97, 814–816.

- Shalhevet, L., Hsiao, T. C., 1986. Salinity and droughts: a comparison of their effects on osmotic adjustment, assimilation, transpiration and growth. *Irrigat. Sci.* 7, 249–264.
- SIAM, Sistema de Información Agraria de Murcia, 2014. <http://siam.imida.es/apex/f?p=101:1:7600067146806945> (Acceso Mayo, 2016).
- Simko, I., Jimenez-Berni, J. A., Furbank, R. T., 2015. Detection of decay in fresh-cut lettuce using hyperspectral imaging and chlorophyll fluorescence imaging. *Postharvest Biol. Technol.* 106, 44–52.
- Simón, I., Díaz-López, L., Gimeno, V., Nieves, M., Pereira, W. E., Martínez, V., Lidon, V., García-Sánchez, F., 2013. Effects of boron excess in nutrient solution on growth, mineral nutrition, and physiological parameters of *Jatropha curcas* seedlings. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 176, 165–174.
- Singh, S., Agrawal, M., Agrawal, S. B., 2014. Differences in responses of summer and winter spinach to elevated UV-B at varying soil NPK levels. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 21, 6099–6107.
- Smyth, A. B., Song, J., Cameron, A. C., 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.
- Snowdon, A. L. 1990. A Color Atlas of Post-harvest Diseases & Disorders of Fruits and Vegetables. Volume 2: Vegetables. CRC Press, Inc, Boca Ratón, FL, 196–216.
- Stefanowska, M., Kuraś, M., Kubacka-zebalska, M., Kacperska, A., 1999. Low temperature affects pattern of leaf growth and structure of cell walls in winter oilseed rape (*Brassica napus* L., var. *oleifera* L.). *Ann. Bot.* 84, 313–319.

-
- Sun, D. -W., 1999. Effect of pre-wetting on weight loss and cooling times of vegetables during vacuum cooling. ASAE Paper No. 996119, ASAE, 2950 Niles Road, St. Joseph, MI 49085 9659, USA.
- Sun, D. -W., 2000. Experimental research on vacuum rapid cooling of vegetables. En: *Advances in the Refrigeration Systems, Food Technologies and Cold Chain*. Int. Institute Refrig., Paris, 342–347.
- Sun, D.-W., Brosnan, T., 1999. Extension of the vase life of cut daffodil flowers by rapid vacuum cooling. *Int. J. Refrig.* 22, 472–478.
- Sun, D. -W., Zheng, L., 2006. Vacuum cooling technology for the agri-food industry: past, present and future. *J. Food Eng.* 77, 203–214.
- Suslow, T. V., Cantwell, M. 1998. Spinach: Recommendations for maintaining postharvest quality. *Perishables Handling* #94.
<http://postharvest.ucdavis.edu/pfvegetable/Spinach/> (Acceso Mayo, 2016).
- Thompson, J. F., 1998. Pre-cooling and storage facilities. *Agriculture Handbook* Number, 66. <http://www.ba.ars.usda.gov/hb66/precooling.pdf> (Acceso Mayo, 2016).
- Thompson, J. F., Chen, Y. L., 1988. Comparative energy use of vacuum hydro, and forced air coolers for fruits and vegetables. *ASHRAE Trans.* 92, 1427–1433.
- Thompson, J. F., Cantwell, M., Arpaia, M. L., Kader, A., Crisosto, C., Smilanick, J., 2001. Effect of cooling delays on fruit and vegetables quality. *Perishables Hand. Q.* 105, 2–5.
- Thompson, J. F., Mitchell, F. G., Kasmire, R. F., 2002. Cooling horticultural commodities. En: Kader, A. A. (Ed.), *Postharvest Technology of Horticultural Crops*. University of California, Division of Agricultural Resources, Publication 3311, 97–112.

- Thompson, J. F., Mitchell, F. G., Rumsey, T. R., Kasmire, R. F., Crisosto, C. C., 2008. Commercial Cooling of Fruits, Vegetables, and Flowers. University of California, Division of Agricultural Resources, Publication 21567.
- Toivonen, P. M. A., 1997. Non-ethylene, non-respiratory volatiles in harvested fruits and vegetables: their occurrence, biological activity and control. *Postharvest Biol. Technol.* 12, 109–125.
- Toivonen, P. M. A., Brummell, D. A., 2008. Biochemical bases of appearance and texture changes in fresh-cut fruit and vegetables. *Postharvest Biol. Technol.* 48, 1–14.
- Toivonen, P. M., DeEll, J. R., 2002. Physiology of fresh-cut fruits and vegetables. En: Lamikanra, O (Ed.), *Fresh-cut Fruits Vegetables: Science Technology Market*. CRC Press, Boca Raton, FL, 39–58.
- Toivonen, P. M. A., Hodges, D. M., 2011. Abiotic stress in harvested fruits and vegetables. En: Shanker, A., Venkateswarlu, B (Eds.), *Abiotic Stress in Plants – Mechanisms and Adaptations*. Intech Publisher, Rijeka, Croatia, 39–58.
- Tomás-Barberán, F. A., Gil, M. I., Castaner, M., Artes, F., Saltveit M. E., 1997. Effect of selected browning inhibitors on phenolic metabolism in stem tissue of harvested lettuce. *J. Agric. Food Chem.* 45, 583–589.
- Tudela, J. A., Marín, A., Garrido, Y., Cantwell, M., Medina-Martínez, M. S., Gil, M. I., 2013. Off-odour development in modified atmosphere packaged baby spinach is an unresolved problem. *Postharvest Biol. Technol.* 75, 75–85.
- Turatti, 2016. Polar Wind. <http://www.turatti.com/sections-en/machinery/blanching-cooling/polar-wind/> (Acceso Mayo, 2016).
- UNECE, United Nations Economic Commission for Europe, 2012. Standard FFV-58 concerning the marketing and commercial quality control of leafy vegetables. 2012 Edition. https://www.unece.org/fileadmin/DAM/trade/agr/standard/fresh/FFV-Std/English/58Leafy_vegetables_2012.pdf (Acceso Mayo, 2016).

- Van Volkenburgh E., Hunt S., Davies W. J., 1983. A simple instrument for measuring cell-wall extensibility. *Ann Bot* 51, 669–672.
- Varoquaux, P., Mazollier, J., 2002. Overview of the European fresh-cut produce industry. En: Lamikanra, O (Ed.), *Fresh-cut Fruits Vegetables: Science Technology Market*. CRC Press, Boca Raton, 21–43.
- Varoquaux, P., Wiley, R., 1994. Biological and biochemical changes in minimally processed refrigerated fruits and vegetables. En: Wiley, R. C. (Ed.), *Minimally Processed Refrigerated Fruits and Vegetables*. Chapman & Hall, New York, 226–268.
- Varoquaux, P., Mazollier, J., Albagnac, G., 1996. The influence of raw material characteristics on the storage life of fresh-cut butterhead lettuce. *Postharvest Biol. Technol.* 9, 127–139.
- Veit, M., Bilger, T., Muhlbauer, T., Brummet, W., Winter, K., 1996. Diurnal changes in flavonoids. *J. Plant Physiol.* 148, 478–482.
- Viacava, G. E., Roura, S. I., Agüero, M. V., 2010. Improvement of water status methodology for leafy vegetables reduces consumption of time, skilled labor, and laboratory resources. *Food Anal. Methods* 4, 307–312.
- Vidal, N. J., 2011. Lechugas baby leaf y multileaf. *Horticultura global* 294, 30–33.
- Wagstaff, C., Clarkson, G. J. J., Zhang, F., Rothwell, S. D., Fry, S. C., Taylor, G., Dixon, M. S., 2010. Modification of cell wall properties in lettuce improves shelf life. *J. Exp. Bot.* 61, 1239–1248.
- Wahid, A., Ghazanfar, A., 2006. Possible involvement of some secondary metabolites in salt tolerance of sugarcane. *J. Plant Physiol.* 163, 723–730.

- Wang, C. Y., 1993. Approaches to reduce chilling injury of fruits and vegetables. *Hort. Rev.* 15, 63–95.
- Wang, C. Y., 2003. Leafy, floral and succulent vegetables. En: Bartz, J. A., Brecht, J. K. (Eds.), *Postharvest Physiology and Pathology of Vegetables*. Marcel Dekker, Inc., New York, 599–623.
- Wang, Y., Frei, M., 2011. Stressed food—The impact of abiotic environmental stresses on crop quality. *Agric Ecosyst. Environ.* 141, 271–286.
- Wellburn A. R., 1994. The spectral determination of chlorophylls *a* and *b*, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *J Plant Physiol* 144, 307–313.
- Wiley, R. C., 1994. Introduction to minimally processed refrigerated fruits and vegetables. En: Wiley, R. C (Ed.), *Minimally Processed Refrigerated Fruits & Vegetables*. Chapman & Hall, Inc., New York, 1–14.
- Wright, K. P., 2004. Salad Green. En: Gross, K. C., Wang, C. Y., Saltveit, M.E. (Eds.), *The Commercial Storage of Fruits, Vegetables, and Florist and Nursery Stocks*, USDA Agricultural Handbook 66. <http://www.ba.ars.usda.gov/hb66/saladGreens.pdf> (Acceso Mayo, 2016).
- Xiao, Z., Lester, G. E., Luo, Y., Xie, Z. K., Yu, L. L., Wang, Q., 2014. Effect of light exposure on sensorial quality, concentrations of bioactive compounds and antioxidant capacity of radish microgreens during low temperature storage. *Food Chem.* 151, 472–479
- Xie, J., Zhu, J., Lin, Y., 2013. Effect of vacuum pre-cooling on quality changes of spinach during cold storage. *Adv. Mat. Res.* 641-642, 886–889.

-
- Zhan, L., Hu, J., Li, Y., Pang, L., 2012. Combination of light exposure and low temperature in preserving quality and extending shelf-life of fresh-cut broccoli (*Brassica oleracea* L.). *Postharvest Biol. Technol.* 72, 76–81.
- Zhan, L., Hu, J., Ai, Z., Pang, L., Li, Y., Zhu, M., 2013. Light exposure during storage preserving soluble sugar and l-ascorbic acid content of minimally processed romaine lettuce (*Lactuca sativa* L. var. longifolia). *Food Chem.* 136, 273–278.
- 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. QTLs for shelf life in lettuce co-locate with those for leaf biophysical properties but not with those for leaf developmental traits. *J. Exp. Bot.* 58, 1433–1449.
- Zhao, X., Iwamoto, T., Carey, E. E., 2007. Antioxidant capacity of leafy vegetables as affected by high tunnel environment, fertilisation and growth stage. *J. Sci. Food Agric.* 87, 2692–2699.
- Zheng, L. Y., Sun, D. -W., 2004. Vacuum cooling for the food industry – a review of recent research advances. *Trends Food Sci. Technol.* 15, 555–568.
- 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.

