



UNIVERSIDAD CATÓLICA
SAN ANTONIO
UCAM

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD, DE LA
ACTIVIDAD FÍSICA Y DEL DEPORTE

Departamento de Tecnología de la
Alimentación y Nutrición

Efecto de diferentes factores: fertilización,
salinidad y procesado, sobre parámetros objetivos
de calidad en pimiento

Ana Serrano Martínez

Directores: Dra. Estrella Núñez Delicado
Dr. José Antonio Gabaldón Hernández

Murcia, mayo de 2009



AUTORIZACIÓN DE LOS DIRECTORES DE LA TESIS PARA SU PRESENTACIÓN

La Dra. D^a. Estrella Núñez Delicado y el Dr. D. José Antonio Gabaldón Hernández como Directores⁽¹⁾ de la Tesis Doctoral titulada **“Efecto de diferentes factores: fertilización, salinidad y procesado, sobre parámetros objetivos de calidad en pimiento”** realizada por D^a. Ana Serrano Martínez en el Departamento de Tecnología de la Alimentación y Nutrición, **autoriza su presentación a trámite** dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

Lo que firmo, para dar cumplimiento a los Reales Decretos 56/2005 y 778/98, en Murcia a 21 de Mayo de 2009.

Dra. D^a. Estrella Núñez Delicado

Dr. D. José Antonio Gabaldón Hernández

⁽¹⁾ Si la Tesis está dirigida por más de un Director tienen que constar y firmar ambos.

*A Jesús, mi marido, por darle sentido
a mi vida, sin ti, nada de lo que
soy sería posible.*

*A mis padres, por ser mis referentes,
gracias por darlo todo sin
pedir nada a cambio.*

A la memoria de "mi querido Abuelo".

AGRADECIMIENTOS

Aún sabiendo lo difícil que es plasmar en un papel los agradecimientos a todas aquellas personas que de un modo u otro han contribuido a la realización de la Tesis doctoral, me gustaría por lo menos hacer un intento.

En primer lugar deseo expresar mi más sincero agradecimiento a los directores de la Tesis, la Dra. Estrella Núñez Delicado y el Dr. José Antonio Gabaldón Hernández por su ayuda y dedicación durante estos años de trabajo.

A Estrella, por sus largas conversaciones, excelente supervisión y por los valiosos conocimientos científicos transmitidos con estímulo y dedicación, que ha hecho posible el desarrollo de esta Tesis Doctoral.

A Gabaldón, por sus consejos, orientación y poner a mi servicio esa gran cantidad de conocimiento que atesora en su cabeza.

A mi Carmela, "mi hermana", por su gran amistad incondicional, complicidad con la que hemos trabajado y por esos momentos inolvidables que hemos pasado juntas, como esos bailes marcados en el laboratorio entre extracción y extracción.

A Isabelita, por su alegría, gran amistad, ayuda ante los diferentes obstáculos que se han presentado y por esos consejos que nos hacen ser mejores personas.

A Santiaguini, por las constantes muestras de apoyo dentro y fuera de la Universidad, por su gran paciencia con el ordenador sin perder el buen humor y plena dedicación prestada siempre que fue requerida.

A Maite, Patricia y Pilar por su gran calidad humana y por estar siempre dispuestas a ayudarme y preparar esa placa o ese tampón de tinción tan a tiempo.

A mis compañeros de departamento, Antonio Soler y Antonio José, por el apoyo prestado en todo momento.

A Gines, por su buen humor y capacidad para arrancarte una sonrisa cada mañana.

A todas las personas del Departamento de Nutrición que de algún modo han contribuido a la realización de este trabajo.

A D. Gabriel, por su paciencia, amistad y ayuda prestada.

Al IMIDA y al CTC, por la aportación de muestras y por el buen trato recibido, y a Paco y Sese por su ayuda y colaboración.

A Jesús, porque por él he mirado siempre hacia delante.

A mis padres, porque sin su excelente ejemplo y estímulo no hubiera conseguido seguir adelante ni llegar donde estoy. Gracias por apoyarme y animarme a conseguir mis objetivos.

A mi hermano, por la vida que me da.

A mis amigas de toda la vida Raquel, Belén y Carmen, porque sin vuestra amistad, esto no hubiera sido posible. Gracias por escucharme en los momentos más bajos y por la paciencia y el cariño que me habéis demostrado en todo momento.

A la Universidad Católica San Antonio de Murcia, por su colaboración.

ARTÍCULOS PUBLICADOS

El contenido de esta Tesis Doctoral ha sido parcialmente publicado en los siguientes trabajos:

- Pérez-López, A. J.; del Amor, F. M.; **Serrano-Martínez, A.**; Fortea, M. I.; Núñez-Delicado, E. **2007**. Influence of agricultural practices on the quality of sweet pepper fruits as affected by the maturity stage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 87, 2075-2080.
- **Serrano-Martínez, A.**, Fortea, M. I., del Amor, F. M.; Núñez-Delicado, E. **2007**. kinetic characterisation and thermal inactivation study of partially purified red pepper (*Capsicum annuum* L.) peroxidase. *Food Chemistry*. 107, 193-199.
- del Amor, F. M.; **Serrano-Martínez, A.**; Fortea, M. I.; Legua, P.; Núñez-Delicado, E. **2008**. The effect of plant-associative bacteria (*Azospirillum* and *Pantoea*) on the fruit quality of sweet pepper under limited nitrogen supply. *Scientia Horticulturae*. 117, 191-196.
- del Amor, F. M.; **Serrano-Martínez, A.**; Fortea, M. I.; Núñez-Delicado, E. **2008**. Differential effect of organic cultivation on the levels of phenolics, peroxidase and capsidiol in sweet peppers. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 88, 770-777.
- Fortea, M. I.; López-Miranda, S.; **Serrano-Martínez, A.**; Carreño, J.; Núñez-Delicado, E. **2008**. Kinetic characterisation and thermal inactivation study of polyphenol oxidase and peroxidase from table grape (Crimson Seedless). *Food Chemistry*. 113, 1008-1014.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE ABREVIATURAS	15
ÍNDICE DE TABLAS	17
ÍNDICE DE FIGURAS	19
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN	23
1. Introducción	25
1.1. CULTIVO	25
1.1.1. Taxonomía, descripción botánica y distribución mundial	25
1.1.2. Cultivo de pimiento en la Región de Murcia	28
1.1.3. Valor Comercial y Nutricional	30
1.1.3.1. <i>Flavonoides</i>	37
1.1.3.2. <i>No Flavonoides</i>	40
1.2. CULTIVO ECOLÓGICO Y TRADICIONAL	45
1.2.1. Regulación del cultivo ecológico	47
1.2.1.1. <i>Normas de producción</i>	48
1.2.1.2. <i>Normas de transformación</i>	48
1.2.1.3. <i>Etiquetado</i>	49
1.2.1.4. <i>Logotipo</i>	49
1.2.1.5. <i>Control</i>	50
1.2.2. Calidad nutritiva de los productos ecológicos	51
1.2.3. Relación agricultura ecológica-consumidor	52
1.3. USO DE BIOFERTILIZANTES	53
1.4. ESTRÉS SALINO	56
1.4.1. Situación actual	56
1.4.2. Efectos de la salinidad en la planta	57
1.5. ACTIVIDAD PEROXISADA	58
1.5.1. Peroxidasa	59

CAPÍTULO II. OBJETIVOS	63
2. Objetivos	65
CAPÍTULO III. MATERIALES Y MÉTODOS	67
3. Materiales y Métodos	69
3.1. MATERIAL VEGETAL	69
3.1.1. Pimiento cultivado bajo sistema de producción ecológica y tradicional	69
3.1.2. Pimiento cultivado con biofertilizantes	71
3.1.3. Pimiento sometido a diferentes concentraciones de estrés salino	72
3.1.4. Pimiento conservado en V gama	74
3.1.4.1. Descripción del proceso	74
3.2. REACTIVOS	75
3.3. DETERMINACIÓN DE NITRÓGENO TOTAL (N_{TOTAL})	76
3.4. FIRMEZA DEL FRUTO	76
3.5. DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS ORGÁNICOS	76
3.6. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS Y FENOLES TOTALES	77
3.6.1. Proteínas	77
3.6.2. Compuestos fenólicos	78
3.7. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE MEDIANTE EL MÉTODO ORAC- FLUORESCINA (ORAC-FL)	79
3.8. EXTRACCIÓN Y DETERMINACIÓN DE CAROTENOS TOTALES	81
3.9. MEDIDAS DE COLOR	82
3.10. DETERMINACIÓN DE ÁCIDO ASCÓRBICO	83
3.11. EXTRACCIÓN DE PEROXIDASA (POD) DE PIMIENTO	84
3.12. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA	85
3.13. ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA	85
3.14. ESTABILIDAD TÉRMICA	86
3.15. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	86

CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	87
4. Resultados y Discusión	89
4.1. COMPARACIÓN DE DIFERENTES PARÁMETROS DE CALIDAD EN PIMIENTO CULTIVADO BAJO SISTEMA DE PRODUCCIÓN ECOLÓGICA Y TRADICIONAL: CONTENIDO EN PROTEÍNAS, COMPUESTOS FENÓLICOS, VITAMINA C, ACTIVIDAD POD, CAROTENOS Y COLOR	89
4.1.1. Contenido en proteínas	89
4.1.2. Contenido en compuestos fenólicos	90
4.1.3. Contenido en vitamina C	92
4.1.4. Actividad POD	94
4.1.5. Contenido total de carotenos	97
4.1.6. Parámetros de color	98
4.2. COMPARACIÓN DE DIFERENTES PARÁMETROS DE CALIDAD EN PIMIENTO CULTIVADO CON BIOFERTILIZANTES O CON FERTILIZACIÓN QUÍMICA: CONCENTRACIÓN DE N _{TOTAL} , CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DEL FRUTO, ÁCIDOS ORGÁNICOS, POD Y COMPUESTOS FENÓLICOS	101
4.2.1. Concentración de N _{total}	102
4.2.2. Características físicas del fruto	103
4.2.3. Ácidos orgánicos	106
4.2.4. POD y compuestos fenólicos totales	108
4.3. COMPARACIÓN DE DIFERENTES PARÁMETROS DE CALIDAD EN PIMIENTO SOMETIDO A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ESTRÉS SALINO: COMPUESTOS FENÓLICOS, VITAMINA C, CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y ACTIVIDAD POD	111
4.3.1. Compuestos fenólicos	111
4.3.2. Nivel de vitamina C	116
4.3.3. Capacidad antioxidante	120
4.3.4. Actividad POD	124
4.4. EFECTO DE LAS CDs EN DIFERENTES PARÁMETROS DE CALIDAD DE PIMIENTO CONSERVADO EN V GAMA: COMPUESTOS FENÓLICOS, VITAMINA C, CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y COLOR	127

4.4.1. Compuestos fenólicos	127
4.4.2. Nivel de vitamina C	131
4.4.3. Actividad antioxidante	134
4.4.4. Parámetros de color	137
4.5. CARACTERIZACIÓN DE POD DE PIMIENTO	143
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES	155
5. Conclusiones	157
CAPÍTULO VI. BIBLIOGRAFÍA	159
6. Bibliografía	161

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

- AA: ácido L-ascórbico.
- AAPH: 2,2-azobis-[2-metilpropionamida]dihidroclorido.
- ABTS: ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfónico.
- ADHA: ácido dehidroascórbico.
- AUC: área bajo la curva.
- β -CDs: β -ciclodextrinas.
- BPA: aplicación de buenas prácticas agrícolas.
- BSA: albúmina de suero bovino.
- C*: croma.
- CDR: cantidad diaria recomendada.
- CIFEA: Centro Integrado de Formación y Experiencias Agrarias.
- CRAE: Consejería de Agricultura y Agua de la Región de Murcia.
- Da: Dalton.
- DDT: días después del trasplante.
- DPPH: 2,2-difenil-picril-hidrácil.
- Ea: energía de activación.
- ECV: enfermedad cardiovascular.
- FAO: Organización para la Agricultura y la Alimentación de las Naciones Unidas.
- FL: fluoresceína.
- FRAP: reducción del hierro-poder antioxidante.
- FW: peso fresco.
- H₂O₂: peróxido de hidrogeno.
- Ha: hectárea.
- HPLC: cromatografía líquida de alta eficacia.
- IFOAM: Federación Internacional de Agricultura Ecológica.
- INFOAN: federación internacional de Agricultura Ecológica.
- K_M: concentración de sustrato necesaria para alcanzar la mitad de la velocidad máxima.
- L*: luminosidad.
- LDL: lipoproteínas de baja densidad.
- MARM: Ministerio de Medioambiente, Rural y Marino.
- min: minutos.

nm: nanómetro.

OH: grupos hidroxilo.

OMC: Organización Mundial del Comercio.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

ORAC: capacidad de absorción del radical de oxígeno.

ORAC-FL: ORAC-fluoresceína.

POD: peroxidasa.

PPO: polifenol oxidasa.

ROS: especies reactivas de oxígeno.

SDS: dodecil sulfato sódico.

T: tiempo

TRAP: potencial antioxidante total.

Valor D: Tiempo requerido para reducir la actividad enzimática un 10% del valor original.

V_m : velocidad máxima.

xg: equivalentes de gravedad en centrifugación.

β -CD: β -ciclodextrina.

ΔE : delta E.

ϵ : absorptividad molar.

4MN: 4-metoxi- α -naftol.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1. <i>Clasificación de compuestos fenólicos en función de su estructura química</i>	36
Tabla 3.1. <i>Control químico en cultivo ecológico y tradicional en pimiento dulce</i>	70
Tabla 3.2. <i>Control biológico en cultivo ecológico y tradicional en pimiento dulce</i>	71
Tabla 3.3. <i>Planteamiento experimental de las muestras de pimiento (<i>Capsicum annuum</i> L., tipo Lamuyo) sometido a diferentes concentraciones de NaCl</i>	73
Tabla 4.1. <i>Cambios en el contenido en vitamina C durante la maduración de pimiento dulce (<i>Capsicum annuum</i> L., cultivo Almuden) cultivado bajo sistema de producción ecológico y tradicional</i>	93
Tabla 4.2. <i>Cambios de color en las coordenadas CIELAB durante el desarrollo y maduración en pimiento dulce (<i>Capsicum annuum</i> L., cultivo Almuden) bajo sistema de producción ecológica y tradicional</i>	100
Tabla 4.3. <i>Efecto de la fertilización en materia seca de fruto, delgadez y firmeza del pericarpio, y color del fruto maduro en pimiento dulce (<i>Capsicum annuum</i> L.) cultivo Cierva, tipo de California</i>	105
Tabla 4.4. <i>Efecto del tratamiento de fertilización en la concentración de ácidos orgánicos en pimiento dulce en pimiento dulce (<i>Capsicum annuum</i> L.) cultivo Cierva, tipo de California en los estadios de maduración verde y amarillo</i>	107
Tabla 4.5. <i>Efecto del tratamiento de fertilización de POD y compuestos fenólicos totales en pimiento dulce (<i>Capsicum annuum</i> L.) cultivo Cierva, tipo de California en los estadios de maduración verde y amarillo</i>	109
Tabla 4.6. <i>Evolución del color de pimiento de V gama con el tiempo de almacenamiento a 4 °C, en presencia y ausencia de 1% de β-CDs</i>	139
Tabla 4.7. <i>Evolución del color de pimiento de V gama con el tiempo de almacenamiento a 25 °C, en presencia y ausencia de 1% de β-CDs</i>	140
Tabla 4.8. <i>Evolución del color de pimiento de V gama con el tiempo de almacenamiento a 50 °C, en presencia y ausencia de 1% de β-CDs</i>	142
Tabla 4.9. <i>Purificación Parcial de POD de pimiento rojo</i>	145

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. <i>Diversidad de formas y colores de pimientos</i>	25
Figura 1.2. <i>Pimiento Variedad Duque, del tipo Lamuyo</i>	29
Figura 1.3. <i>Pimiento Variedad Del Sol, del tipo California Amarillo</i>	29
Figura 1.4. <i>Pimiento Variedad Italress, del tipo Dulce Italiano</i>	29
Figura 1.5. <i>Oxidación del ácido ascórbico a dehidroascórbico</i>	31
Figura 1.6. <i>Estructura de los carotenoides más representativos encontrados en pimiento</i>	34
Figura 1.7. <i>Estructura básica de los principales grupos de flavonoides</i>	38
Figura 1.8. <i>Estructura básica de los principales ácidos fenólicos</i>	40
Figura 1.9. <i>Estructura del ácido clorogénico (5-cafeoilquínico)</i>	41
Figura 1.10. <i>Estructura general de los estilbenos</i>	42
Figura 1.11. <i>Logotipo de Agricultura Ecológica</i>	50
Figura 1.12. <i>Estructura tridimensional de POD de cacahuete</i>	59
Figura 3.1. <i>Dosis de fertilización acumulada por metro cuadrado en cultivo tradicional de pimiento dulce</i>	69
Figura 3.2. <i>Recta patrón para la cuantificación de proteínas en muestras de pimiento</i>	78
Figura 3.3. <i>Recta patrón para la cuantificación de compuestos fenólicos en muestras de pimiento</i>	79
Figura 3.4. (A) <i>Recta de regresión del net AUC con diferentes concentraciones de Trolox C.</i> (B) <i>Curva de caída de la FL</i>	81
Figura 3.5. <i>Recta patrón para la cuantificación de carotenos totales en muestras de pimiento</i>	82
Figura 3.6. <i>Parámetros de color CIELAB</i>	83
Figura 3.7. <i>Recta patrón para la cuantificación de ácido ascórbico en muestras de pimiento</i>	84

Figura 4.1. <i>Contenido proteico en pimiento cultivado bajo sistema de producción tradicional y ecológico</i>	90
Figura 4.2. <i>Compuestos fenólicos totales en pimiento cultivado bajo sistema de producción tradicional y ecológico</i>	91
Figura 4.3. <i>Electroforesis en gel de poliacrilamida, al 8%</i>	95
Figura 4.4. <i>Actividad específica de POD de pimiento cultivado bajo sistema tradicional y pimiento cultivado bajo sistema ecológico</i>	96
Figura 4.5. <i>Efecto del tipo de cultivo y estado de maduración en carotenoides totales de pimiento dulce</i>	98
Figura 4.6. <i>Efecto del tratamiento de fertilización en la concentración de nitrógeno total en fruto y raíz</i>	103
Figura 4.7. <i>Efecto de la salinidad del agua de riego sobre el contenido en compuestos fenólicos de frutos de pimiento recolectados el día 11/04/08</i>	112
Figura 4.8. <i>Efecto de la salinidad del agua de riego sobre el contenido en compuestos fenólicos de frutos de pimiento recolectados el día 6/06/08</i>	113
Figura 4.9. <i>Efecto de la salinidad del agua de riego sobre el contenido en compuestos fenólicos de frutos de pimiento recolectados el día 25/07/08</i>	113
Figura 4.10. <i>Efecto del estado fisiológico de la planta sobre el contenido de compuestos fenólicos del fruto</i>	115
Figura 4.11. <i>Contenido en vitamina C en pimiento recolectado el día 11/04/08 procedente de plantas sometidas a diferentes concentraciones de NaCl</i>	116
Figura 4.12. <i>Contenido en vitamina C en pimiento recolectado el día 6/06/08 procedente de plantas sometidas a diferentes concentraciones de NaCl</i>	117
Figura 4.13. <i>Contenido en vitamina C en pimiento recolectado el día 25/07/08 procedente de plantas sometidas a diferentes concentraciones de NaCl NaCl ..</i>	117
Figura 4.14. <i>Efecto del estado fisiológico de la planta sobre el contenido de vitamina C del fruto</i>	119
Figura 4.15. <i>Contenido en actividad antioxidante en pimiento recolectado el día 11/04/08 procedente de plantas sometidas a diferentes concentraciones de NaCl</i>	120

Figura 4.16. <i>Contenido en actividad antioxidante en pimiento recolectado el día 6/06/08 procedente de plantas sometidas a diferentes concentraciones de NaCl</i>	121
Figura 4.17. <i>Contenido en actividad antioxidante en pimiento recolectado el día 25/07/08 procedente de plantas sometidas a diferentes concentraciones de NaCl</i>	122
Figura 4.18. <i>Efecto del estado fisiológico de la planta sobre el contenido en actividad antioxidante en pimiento</i>	123
Figura 4.19. <i>UE/g de pimiento recolectado el día 11/04/06 y procedente de plantas sometidas a diferentes concentraciones de NaCl</i>	125
Figura 4.20. <i>UE/g de pimiento recolectado el día 6/06/08 y procedente de plantas sometidas a diferentes concentraciones de NaCl</i>	126
Figura 4.21. <i>UE/g de pimiento recolectado el día 25/07/08 y procedente de plantas sometidas a diferentes concentraciones de NaCl</i>	126
Figura 4.22. <i>Estructura de β-CDs</i>	128
Figura 4.23. <i>Contenido en compuestos fenólicos en pimiento de V gama en ausencia y presencia del 1% de β-CDs almacenados durante 5 meses a 4 °C</i>	129
Figura 4.24. <i>Contenido en compuestos fenólicos en pimiento de V gama en ausencia y presencia del 1% de β-CDs almacenados durante 5 meses a 25 °C</i>	129
Figura 4.25. <i>Contenido en compuestos fenólicos en pimiento de V gama en ausencia y presencia del 1% de β-CDs almacenados durante 5 meses a 50 °C</i>	130
Figura 4.26. <i>Evolución del contenido en compuestos fenólicos en pimiento de V gama almacenado a diferentes temperaturas en presencia y ausencia del 1% de β-CDs</i>	131
Figura 4.27. <i>Contenido en vitamina C en pimiento de V gama en ausencia y presencia del 1% de β-CDs almacenados durante 5 meses a 4 °C</i>	132
Figura 4.28. <i>Contenido en vitamina C en pimiento de V gama en ausencia y presencia del 1% de β-CDs almacenados durante 5 meses a 25 °C</i>	132
Figura 4.29. <i>Contenido en vitamina C en pimiento de V gama en ausencia y presencia del 1% de β-CDs almacenados durante 5 meses a 50 °C</i>	133

Figura 4.30. Evolución del contenido en vitamina C en pimiento de V gama almacenado a diferentes temperaturas en presencia y ausencia del 1% de β -CDs	134
Figura 4.31. Actividad antioxidante de pimiento de V gama en ausencia y presencia del 1% de β -CDs almacenados durante 5 meses a 4 °C	135
Figura 4.32. Actividad antioxidante de pimiento de V gama en ausencia y presencia del 1% de β -CDs almacenados durante 5 meses a 25 °C	135
Figura 4.33. Actividad antioxidante de pimiento de V gama en ausencia y presencia del 1% de β -CDs almacenados durante 5 meses a 50 °C	136
Figura 4.34. Evolución de la actividad antioxidante de pimiento de V gama almacenado a diferentes temperaturas en presencia y ausencia del 1% de β -CDs	137
Figura 4.35. Evolución del ΔE en pimiento de V gama almacenado a diferentes temperaturas en presencia y ausencia del 1% de β -CDs	143
Figura 4.36. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 8 % de POD de pimiento	146
Figura 4.37. Efecto del pH en la actividad POD de pimiento parcialmente purificada en 50 mM de tampón citrato sódico (pH 3,0-5,5) y 50 mM de tampón fosfato sódico (pH 6,0-7,5)	147
Figura 4.38. Efecto de la concentración de ABTS en la actividad POD de pimiento	148
Figura 4.39. Efecto de la concentración de H ₂ O ₂ en la actividad POD de pimiento	148
Figura 4.40. Efecto de la concentración de enzima en la actividad POD de pimiento	149
Figura 4.41. Efecto inhibitor del ácido ascórbico en POD de pimiento usando ABTS como sustrato	150
Figura 4.42. Efecto inhibitor de L-cisteína (■) y metabisulfito (□) en POD de pimiento usando ABTS como sustrato	151
Figura 4.43. Inactivación por calor de POD de pimiento	152
Figura 4.44. Representación de Arrhenius	153

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. CULTIVO

1.1.1. Taxonomía, descripción botánica y distribución mundial

La familia de las Solanáceas engloba una serie de especies caracterizadas por la coincidencia floral y conocidas por su riqueza en alcaloides, entre las que destacan por su interés agrícola y farmacéutico: pimiento, tomate, patata, petunia, tabaco, belladona, estroncio o beleño.

El género *Capsicum* representa a un diverso grupo de plantas, desde el conocido pimiento de carne gruesa o pimiento dulce, cultivado en la Región de Murcia, hasta el pimiento habanero, conocido por ser el más picante de los cultivados en México (Bosland, 1996) (**Figura 1.1**).



Figura 1.1. *Diversidad de formas y colores de pimientos.*

Todas las especies del género *Capsicum* son originarias del hemisferio Oeste, excepto *Capsicum anomalum*, que es originaria de Asia. El número de especies dentro del género *Capsicum* es objeto de considerables debates. En 1953, Heiser y Smith, reclasificaron el género en 4 especies, *annuum*, *frutescens*, *baccatum* y *pubescens* (Heiser y Smith, 1953), y en 1957 estos mismos investigadores determinaron *Capsicum sinense* como una nueva especie perteneciente al mismo género, incrementando así la lista de especies domesticadas. Hoy día, en el género *Capsicum* se incluyen al menos 25 especies silvestres y 5 especies domésticas, pero esto es sólo una estimación. La taxonomía descrita recientemente para el género *Capsicum*, por encima de especie es:

Reino, *Plantae*; División, *Magnoliophyta*; Clase, *Magnoliopsida*; Orden, *Solanales*; Familia, *Solanaceae*; Género, *Capsicum*. Sin embargo, casi todas las variedades cultivadas se engloban dentro de la especie *Capsicum annuum* L. (Milla, 1996).

La planta de pimiento es herbácea y anual, aunque puede rebrotar y volver a producir frutos en su segundo año, si se le hace un poda de rejuvenecimiento antes de que finalice su desarrollo vegetativo (Serrano, 1996). El sistema radical del pimiento es voluminoso y profundo, está formado por una raíz principal pivotante, aunque en terrenos apelmazados o en suelos de textura pesada tiene escaso desarrollo. Dispone, asimismo, de numerosas raíces adventicias que en horizontal llegan a alcanzar de 0,5 a 1 m de longitud. Cultivadas en invernadero y con riego por goteo, las raíces suelen crecer en los primeros 30-40 cm de profundidad. La altura de la planta en invernadero es variable, dependiendo de la variedad y de la fecha de transplante, temprana o más tardía, pero en general oscila entre 1 y 2 m (Jurado, 1999). La planta se desarrolla por un tallo principal de crecimiento limitado, que ramifica en tres o cuatro ramas o tallos secundarios entre los 10 y 40 cm de altura, formando una estructura conocida con el nombre de "cruz" del pimiento. Estas ramas se vuelven a bifurcar de forma dicotómica apareciendo los tallos terciarios y así sucesivamente hasta el final de su ciclo. Los tallos son herbáceos y ligeramente lignificados. Sus hojas son simples y de tacto liso, de borde entero o apenas sinuoso en la base del limbo y glabra. Están formadas por un largo pecíolo que une la hoja con el tallo y el limbo, que es plano, delgado y de forma lanceolada o ovoidada. Estas, se encuentran insertadas en el tallo de forma alterna.

Las flores del pimiento son hermafroditas y alógamas y están formadas por pétalos blancos. Suelen aparecer solitarias en cada nudo del tallo, concretamente en la axila de la hoja y son más o menos pequeñas dependiendo de las variedades. Para que se produzca la floración, es necesario que la planta alcance un grado de madurez, que se consigue cuando tiene alrededor de 10 hojas (Serrano, 1996).

El fruto del pimiento se define botánicamente como una baya, constituida por un grueso y jugoso pericarpio, y un tejido placentario al que se unen las semillas, dando lugar a una estructura de superficie tersa, hueca, voluminosa, llena de aire y con forma de cápsula. Estas características del fruto, así como su tamaño, dependen de la variedad (Nuez y col., 1996). Las semillas de pimiento son redondeadas y ligeramente reniformes, suelen tener de 3 a 5 mm de longitud, se insertan sobre una placentación cónica de disposición central, y son de color amarillo pálido. La facultad

germinativa suele ser de 3 a 4 años. Un gramo puede contener entre 120 y 200 semillas.

A pesar de que el pimiento es originario de América del Sur, zona de Bolivia y Perú, en la actualidad casi la mitad del pimiento consumido mundialmente se produce en el área del Mediterráneo (Namesny, 1996). Su introducción en Europa y subsecuentemente, en África y Asia ha sido históricamente asociada al viaje de Colón a las Américas (Heiser, 1976). El cultivo del pimiento se extiende a casi todas las zonas templadas y cálidas del mundo. Según el Anuario de Producción de la Organización para la Agricultura y la Alimentación de las Naciones Unidas (FAO, 2006), el pimiento ocupa la quinta posición en cuanto a superficie cultivada de productos hortícolas en España, tras el tomate, la cebolla, la sandía y las coles. Por variedades, la superficie cultivada de pimiento varía considerablemente en cada país, en función de los usos y costumbres, volumen y destino de las exportaciones, etc. En España, por ejemplo, se producen pimientos dulces (Lamuyo, California, Italiano, Padrón, etc.), pimientos para conserva (del Piquillo, Morrón, etc), para pimentón (Ñora, Guindillas) y para encurtidos (amarillo de Hungría).

Según los datos publicados por el Ministerio de Medioambiente, Rural y Marino (MARM), en 2008 se cultivaron en el mundo más de 1 millón de Ha de pimiento para su consumo en fresco (MARM, 2008). China es el principal productor mundial, con unos 12 millones de toneladas/año, seguido por México y Turquía con aproximadamente 1.800.000 toneladas/año. Indonesia, España y EEUU ocupan el 4º, 5º y 6º puesto, respectivamente, en producción de pimientos frescos, con cifras en torno al millón de toneladas/año.

En Europa, durante los meses de primavera y verano, se producen grandes cantidades de pimiento, sin embargo, en invierno, sólo se puede cultivar de manera regular en zonas de clima templado como el sureste de España y Canarias. De esta forma, España se ha convertido en el centro de producción más seguro, asentado y profesionalizado de Europa. La cuenca mediterránea es responsable de la producción de casi la mitad del pimiento que se consume en el mundo. Dentro de este área, los principales países productores son, en orden de mayor a menor, Turquía, España e Italia.

1.1.2. Cultivo del pimiento en la Región de Murcia

España es el principal productor europeo de pimiento. Según el MARM, la superficie cultivada en el 2008 fue de 20.200 Ha. La producción temprana (otoño-invierno) de pimiento en España se localiza principalmente en Alicante, Almería, Islas Canarias y Murcia. La Región de Murcia es una de las principales zonas de cultivo, produciendo variedades de gran valor socio-económico como las que se utilizan para su consumo en fresco y se cultivan en invernaderos. En Murcia el 40,5% de la producción final agraria se debe a las especies hortícolas. De las 6.519 Ha de invernadero que ocupan los cultivos hortícolas de la región de Murcia, 1.561 Ha son de pimiento, de las cuales el 99% están situadas en el Campo de Cartagena con una producción media de 9,67 Kg/m² (Consejería de Agricultura y Agua de la Región de Murcia, 2008).

El pimiento para consumo en fresco es, actualmente, junto al tomate y la alcachofa, el cultivo que abarca la mayor parte de la mano de obra que se dedica al sector agrícola en la Región de Murcia. La repercusión social del cultivo de pimiento de carne gruesa en la Región de Murcia es muy importante, especialmente en el Campo de Cartagena, donde el número de productores de pimiento es de 1.455, con una superficie media de 1,23 Ha/productor, lo que indica que la estructura de producción de las explotaciones es familiar. El cultivo del pimiento genera empleo para 3.569 personas en el campo, 1.785 en almacén y 714 empleos indirectos, generando un total de 6.068 puestos de trabajo, lo que supone un importe en mano de obra de 50 millones de €/año. En cuanto al valor de la producción del pimiento, en la campaña 1996-97, ascendió hasta los 130 millones de €.

Las variedades de pimiento cultivadas en Almería y Murcia pueden resumirse fundamentalmente en tres, según la forma del fruto (Nuez *y col.*, 1996): rectangular conocido como "Lamuyo" o largo (**Figura 1.2**); cuadrado, también conocido como "California" (**Figura 1.3**) y cónico o "Dulce Italiano" (**Figura 1.4**). La producción del pimiento "California" se destina, casi en su totalidad, a la exportación, prefiriendo mayoritariamente el mercado nacional el pimiento largo o "Lamuyo".



Figura 1.2. *Pimiento Variedad Duque, del tipo Lamuyo.*



Figura 1.3. *Pimiento Variedad Del Sol, del tipo California Amarillo.*



Figura 1.4. *Pimiento Variedad Italress, del tipo Dulce Italiano.*

El principal destinatario de las exportaciones del pimiento tipo “California” es Alemania; le sigue Inglaterra, país que paga mejor el producto, si bien, es cierto que eleva considerablemente el nivel de calidad. Tras ellos, se encuentran los demás países del centro y norte de Europa y, mediante convenios, Estados Unidos y Canadá. La mayor parte de la producción, más del 95%, se destina al mercado en fresco. Las calidades inferiores son las que van a las industrias conserveras.

En nuestra Región, el cultivo en invernaderos cubiertos con plástico está ampliamente extendido para responder a las exigencias climáticas del pimiento fuera de temporada. Se está pasando de los invernaderos con la estructura tipo parral de porte bajo, caracterizado por una insuficiente ventilación, a otra de porte alto con

mayor volumen y mejor ventilación del tipo “multitunel”. La modernización de los invernaderos y la aplicación de nuevas tecnologías han traído consigo una mejora de la calidad del producto y una mayor seguridad alimentaria.

1.1.3. Valor comercial y nutricional

En general, el interés del consumidor por la calidad y propiedades nutritivas de los productos vegetales se ha incrementado en los últimos años (Kubota y Thomson, 2006). La calidad del producto vegetal es un tema complejo, ya que deben ser consideradas diferentes características como: textura, contenido en minerales y vitaminas, sabor y otras características organolépticas y nutricionales (Gruda, 2005), sin olvidar posibles residuos bióticos y/o abióticos que pueden alterar los frutos como consecuencia de no aplicar unas Buenas Prácticas Agrícolas (BPA).

Los frutos de pimiento han formado parte de la dieta humana desde hace 7.000 años (Macneish, 1964). En los últimos años su comercialización se está incrementando debido al descubrimiento de nuevos usos y al interés del consumidor por este cultivo. Además de servir como alimento, el fruto ha sido ampliamente utilizado como especia y como agente colorante en alimentos y cosméticos (Bosland y Votava, 1999).

El principal componente del pimiento es el agua, seguido de los hidratos de carbono, lo que hace que sea una hortaliza con un bajo aporte calórico. Además, es una buena fuente de fibra y, al igual que el resto de verduras, su contenido proteico es muy bajo y apenas aporta grasa. Su consumo es bastante frecuente debido a la atractiva combinación de color, sabor y valor nutricional que posee. Como hortaliza, los frutos del pimiento se pueden consumir tanto maduros (rojos), como inmaduros (verdes), siendo una fuente importante de vitaminas C y E (Palevitch y Craker, 1995; Daood *y col.*, 1996). En fresco, llegan a contener más del doble de vitamina C de la que albergan frutas como naranja o fresa (Vanderslice *y col.*, 1990) y es una fuente importante de carotenoides (provitamina A) (Krinsky, 1994; Matsufuji *y col.*, 1998; Krinsky, 2001; Vanderslice *y col.*, 1990). Los niveles de vitamina C, carotenoides y compuestos fenólicos pueden variar en función de diferentes factores como: tipo de cultivo, prácticas agrícolas (ecológica y tradicional), estadio de maduración y condiciones de almacenamiento (Lee *y col.*, 2000; Tudela *y col.*, 2002; Howard *y col.*,

2002; Asami *y col.*, 2003; Marín *y col.*, 2004; Zhang *y col.*, 2003; Vian *y col.*, 2006; Howard *y col.*, 2000).

La vitamina C corresponde al grupo de las vitaminas hidrosolubles, y como la gran mayoría de ellas, no se almacena en el cuerpo por un largo período de tiempo, eliminándose en pequeñas cantidades a través de la orina. Por este motivo, es importante su administración diaria, ya que es fácil que se agoten sus reservas. El hombre es incapaz de sintetizar la vitamina C y debe obtenerla de la dieta.

Es una sustancia de color blanco, estable en su forma seca, pero en solución se oxida con facilidad, especialmente a elevadas temperaturas y en presencia de cantidades traza de hierro, cobre y álcalis (Davey *y col.*, 2000). La forma oxidada del ácido ascórbico (AA), el ácido dehidroascórbico (ADHA), también posee actividad vitamínica, ya que la reacción óxido-reducción que involucra al par redox AA-ADHA es reversible (**Figura 1.5**).

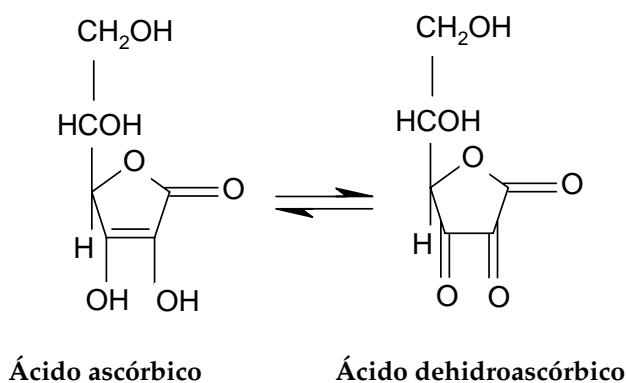


Figura 1.5. Oxidación del ácido ascórbico a dehidroascórbico.

El ácido AA presenta tres funciones fundamentales: cofactor enzimático, captador de radicales libres y donador/aceptor, en la cadena de transporte de electrones tanto en la membrana plasmática como en los cloroplastos.

La vitamina C es un nutriente cuya importancia radica en sus propiedades antioxidantes (Bielski *y col.*, 1975), que previenen procesos degenerativos comunes (Davey *y col.*, 2000), algunos tipos de cáncer (Harris, 1996), enfermedades cardiovasculares, cataratas, problemas del sistema inmune y arteriosclerosis (Saubertlich, 1994). Además, interviene en la formación de colágeno, glóbulos rojos,

huesos y dientes, y favorece la absorción del hierro de los alimentos (Namiki, 1990). Esta vitamina es uno de los componentes más importantes del pimiento, tanto en estado maduro como inmaduro, y muchas variedades pueden aportar la cantidad diaria recomendada (CDR) en 50-100 g de fruto fresco (Bosland y Votava, 2000; Nuez *y col.*, 2003), teniendo un rango de concentraciones que va desde 63 a 243 mg/100 g de peso fresco (FW) (Howard *y col.*, 1994; Howard *y col.*, 2000; Tadesse *y col.*, 2002).

Los carotenoides, son los responsables del color rojo del pimiento y su importancia en la dieta está muy reconocida, tanto por ser los precursores de la vitamina A, como por su capacidad antioxidante en la protección celular (Namiki 1990). Además muestran un potente efecto protector frente a varios tipos de cáncer, en la prevención de úlceras gástricas, estimulación del sistema inmune, prevención de enfermedades cardiovasculares, y protección frente a degeneración macular y cataratas (Krinsky y Johnson, 2005), a la vez que son requeridos para la diferenciación celular humana (Byers *y col.*, 1992).

La concentración de carotenoides en tejidos vegetales depende de las condiciones agronómicas, especialmente exposición a la luz y aporte de nitrógeno. Los principales carotenoides presentes en alimentos son α - y β -caroteno, luteína, licopeno, β -criptoxantina y zeaxantina. Los carotenoides del tipo amarillo β -caroteno y β -criptoxantina son la principal fuente de vitamina A (Wall *y col.*, 2001).

La distribución de carotenoides entre los distintos grupos de plantas no presenta un patrón único. En verduras, los carotenoides mayoritarios son luteína, β -caroteno, violaxantina y neoxantina, en este orden y en pequeñas cantidades también se encuentran zeaxantina, β -criptoxantina y anteraxantina. En frutos, las xantofilas suelen encontrarse en mayor proporción, aunque en algunos casos, los pigmentos mayoritarios son carotenos, como es el caso del licopeno del tomate. Hay que tener en cuenta que el patrón de carotenoides en un mismo fruto varía en función de factores como: variedad, condiciones climáticas y método de cultivo, entre otros. Estos factores han sido ampliamente estudiados para mejorar la retención de color durante el procesado y almacenamiento de los mismos (Mínguez-Mosquera *y col.*, 1993a; Mínguez-Mosquera *y col.*, 1993b; Howard *y col.*, 1998; Markus *y col.*, 1999).

Uno de los cambios más sobresalientes que se producen en la maduración del pimiento, es el paso de color verde de los frutos inmaduros al rojo de los maduros. A nivel fisiológico tiene lugar el desmantelamiento del sistema fotosintético de cada célula del pimiento, convirtiéndose el cloroplasto en cromoplasto.

El color verde del fruto inmaduro es debido principalmente a la presencia de clorofilas. Los carotenos típicos de los cloroplastos, tales como carotenoides oxigenados o xantofilas, violaxantina, neoxantina y luteína (**Figura 1.6**) (Mínguez-Mosquera *y col.*, 1994a; Mínguez-Mosquera *y col.*, 1994b; Hornero-Méndez *y col.*, 2000a; Hornero-Méndez *y col.*, 2000b) pueden variar en su composición y concentración debido a las diferencias en la genética y el grado de la maduración (Davey *y col.*, 1970; Markus *y col.*, 1999).

El principal cambio producido es la degradación de la clorofila, que al no estar ya ligada a su lipoproteína, es susceptible a la acción de los ácidos y la enzima clorofilasa. Los productos resultantes sufren oxidaciones varias, que van rompiendo cada vez más las moléculas, dando lugar a la formación de compuestos de bajo peso molecular, con la característica común de ser incoloros, perdiéndose así el color verde de forma progresiva. Esta transformación de la clorofila va acompañada de la síntesis de carotenoides, siendo los responsables del color rojo final, capsantina, capsorrubina y capsaicina 5,6-epóxido, exclusivos del género *Capsicum*, y los que originan el color amarillo, el resto de pigmentos (zeaxantina, violaxantina, antheraxanthin, β -criptoxantina, β -caroteno, y cucurbitaxanthin A) (Davies *y col.*, 1970) (**Figura 1.6**).

El pimiento rojo contiene una alta cantidad de provitamina A (β -caroteno y β -criptosantina) (Mínguez-Mosquera *y col.*, 1993a), cuyos efectos antioxidantes han sido ampliamente descritos en la literatura (Conn *y col.*, 1992; Palozza y Krinsky, 1992). El licopeno es otro carotenoide abundante en pimiento, con alto poder antioxidante (Di Mascio *y col.*, 1989), que reduce la mortalidad en varios tipos de cáncer (Gerster, 1997; Tsugane *y col.*, 1992; Zhang *y col.*, 1997).

Se han realizado numerosos estudios en pimiento fresco enfocados, la mayoría de ellos, a la determinación de su actividad antioxidante y la influencia del procesado en la concentración de compuestos bioactivos (Howard *y col.*, 2000; Lee *y col.*, 1995; Marin *y col.*, 2004; Mínguez-Mosquera y Hornero-Méndez, 1993b; Simone *y col.*, 1997). Así, Howard *y col.*, en 2000 estudiaron el efecto de la maduración de diferentes tipos de pimiento (*Capsicum annuum* L., *Capsicum frutescens* y *Capsicum chinense*) sobre el contenido en antioxidantes, confirmando que su concentración aumenta con la maduración.

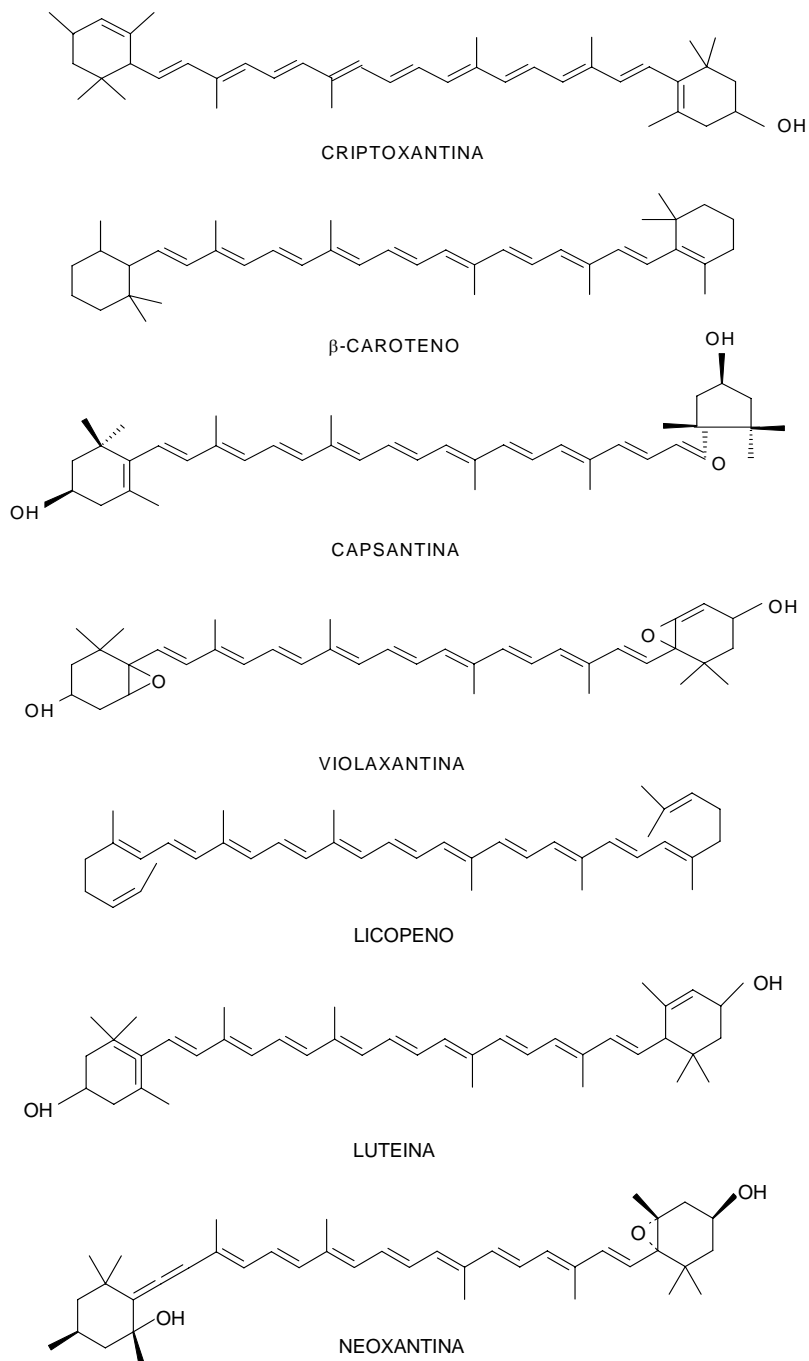


Figura 1.6. Estructura de los carotenoides más representativos encontrados en pimienta.

El color está considerado como uno de los atributos principales de la apariencia de los alimentos, especialmente si está asociado con otros aspectos de la calidad de dicho alimento, como son la maduración o el deterioro visible. Todos los alimentos tienen un rango de color aceptable, que es marcado, en general, por la demanda del consumidor. La estructura de un alimento y la pigmentación son características que, en conjunto, determinan su color y luminosidad. Así, pequeños cambios en uno de estos dos factores, pueden afectar enormemente al color final del alimento y por lo tanto a su aceptación por parte del consumidor.

En la actualidad, se observa un crecimiento sustancial en la utilización de colorantes naturales como aditivos alimentarios. El pimiento rojo (*Capsicum annuum* L.) o pimentón ha sido usado desde tiempos muy remotos como colorante, intensificador o modulador del color de productos alimentarios (Uquiche, y col., 2004).

En el comercio del pimiento y sus productos procesados, por ejemplo el pimentón y las oleorresinas, el color es el parámetro de calidad aplicado con mayor frecuencia, (Perez-Galvez y col., 2004) de ahí que tenga una influencia notable en el precio final del producto.

El intenso color rojo que adquiere el pimiento con la maduración, así como el de sus productos procesados, es debido a los pigmentos carotenoides que contiene. Por otra parte, el ácido ascórbico, presente en cantidades elevadas durante la maduración del fruto, tiene un papel positivo para asegurar su color característico y la estabilidad del mismo en el producto final. Otros factores como la actividad de agua, el tiempo y tipo de procesado y el sistema de secado, también influirán en la estabilidad de los pigmentos y, por tanto, en el color del producto acabado (Kim y col., 2002).

Dentro de los compuestos que le dan sabor y olores característicos al pimiento destacan los compuestos fenólicos y sustancias volátiles. Los compuestos fenólicos que participan en los cambios de sabor y color en la maduración del fruto, son un grupo de metabolitos secundarios, sintetizados por las plantas en respuesta a situaciones de estrés, ya que contribuyen a la defensa frente a microorganismos e insectos y ayudan a preservar su integridad frente a la continua exposición a factores adversos (Harbone y Williams, 2000). Incluyen un amplio rango de estructuras químicas, cuya característica común es la de poseer un anillo bencénico con grupos hidroxilo (OH). La interacción de los OH con los electrones π del anillo bencénico

confiere a la molécula unas propiedades especiales, de las cuales la más característica es la capacidad de captar radicales libres, ya que estos quedan estabilizados por resonancia. La captación de estos radicales, puede modificar los procesos de oxidación mediados por radicales, aspecto importante en cuanto a su actividad biológica. Los *o*-difenoles tienen una elevada capacidad antioxidante, aunque también son inestables, oxidándose a quinonas por vía química o enzimática. Esta inestabilidad se hace remarcable, por ejemplo, durante el procesado o almacenamiento de frutas y hortalizas (Macheix *y col.*, 1990). Otra característica importante de los fenoles, es que son buenos donadores de electrones, de forma que pueden ser oxidados fácilmente por enzimas oxidativas como peroxidasa (POD) o polifenol oxidasa (PPO).

El término de compuestos fenólicos engloba a todas aquellas sustancias que poseen una o varias funciones fenol, nombre popular del hidroxibenceno, unidas a estructuras aromáticas o alifáticas (Croteau *y col.*, 2000). Los compuestos fenólicos que contienen más de un grupo fenólico se denominan en general polifenoles, para distinguirlos de los fenólicos simples. Atendiendo a su estructura básica, los compuestos fenólicos se pueden dividir en dos grandes grupos: flavonoides y no flavonoides (Waterhouse, 2002). (Tabla 1.1).

Tabla 1.1. Clasificación de compuestos fenólicos en función de su estructura química.

Flavonoides	No Flavonoides
Antocianos	Ácidos fenólicos
Flavonoles	- hidroxibenzoicos
Flavan-3-oles	- hidroxicinámicos
Proantocianidinas (taninos no hidrolizables)	Taninos hidrolizables
Flavonas	Estilbenos
Flavanonas	
Isoflavonas	

1.1.3.1. Flavonoides

Los flavonoides son compuestos de bajo peso molecular que comparten un esqueleto común de difenilpiranos (C₆-C₃-C₆), compuesto por dos anillos fenilos (A y B) unidos a través de un anillo C de pirano (heterocíclico). Los átomos de carbono en los anillos C y A se enumeran del 2 al 8, y los del anillo B desde el 2' al 6' (Kühnau, 1976).

Los flavonoides forman el grupo de compuestos fenólicos más importante por su gran variabilidad estructural y presencia en la mayoría de alimentos de origen vegetal (**Figura 1.7**). Están implicados en las propiedades organolépticas de frutas y hortalizas, tales como el sabor (Tomás-Barberán y Espín, 2001) y se encuentran en el vino tinto, té, frutas y hortalizas verdes, fundamentalmente pimiento, uva y lechuga (Hasler, 1998; Trichopoulou y Vasilopoulou, 2000). También pueden consumirse en forma de suplementos nutricionales, junto con ciertas vitaminas y minerales.

En plantas, los flavonoides habitualmente se encuentran ligados a moléculas de carbohidratos. A este tipo de combinación, núcleo flavonoide básico unido a una o varias unidades de carbohidratos se les denomina glicósidos y en ausencia de moléculas de carbohidratos se les denomina agliconas. Los glicósidos son más solubles en agua y menos reactivos frente a radicales libres que sus respectivas agliconas.

Los frutos rojos son ricos en antocianos, los cereales en taninos y ligninas, los cítricos en flavononas, la soja en isoflavonas, etc. Sin embargo, la fuente, ingesta y biodisponibilidad de flavonoides está muy influenciada por factores como: estación del año, luz, grado de madurez, preparación y procesado del alimento (Aherne y O'Brien, 2002).

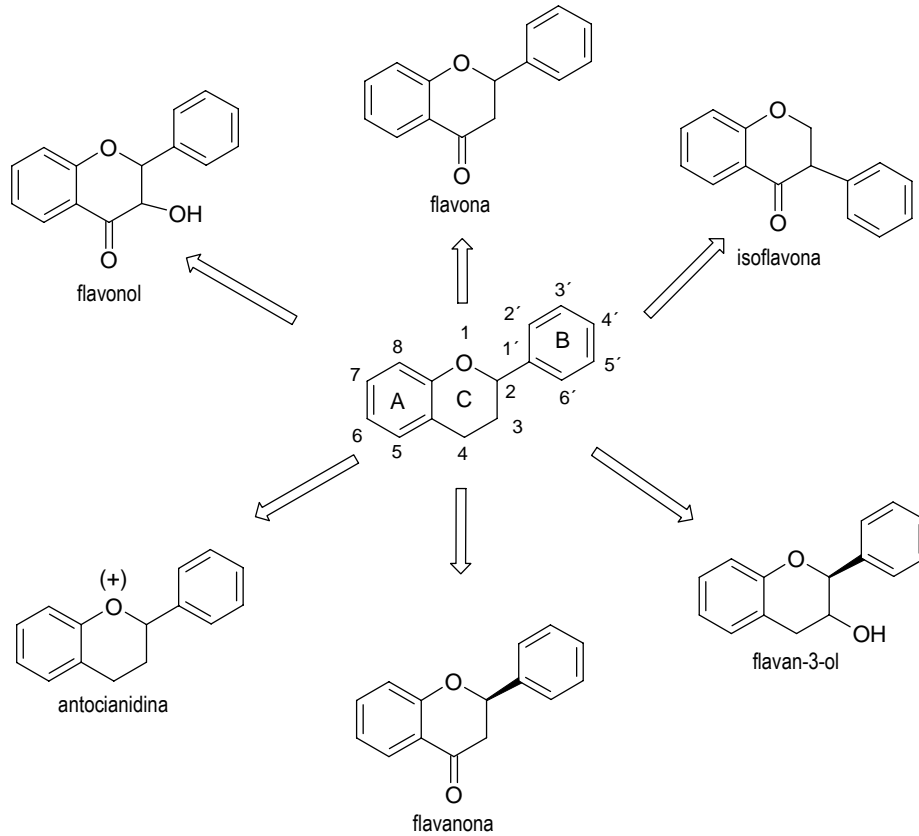


Figura 1.7. Estructura básica de los principales grupos de flavonoides.

Antocianos

Son pigmentos naturales, solubles en agua, responsables del color de la mayoría de los frutos, flores y hojas. Los frutos rojos, violetas y azules deben su color a los antocianos o antocianinas, aunque existen excepciones, como es el caso de los tomates o el pimiento rojo, donde el color es debido a los carotenos (Perez López *y col.*, 2007). Así, son un parámetro de vital importancia para establecer la calidad y aceptabilidad de muchas frutas (Hrazdina, 1982).

Flavonoles

Los flavonoles son inducidos por la luz solar ya que son compuestos pantalla, que absorben parte de la radiación solar (360 nm), atenuando el efecto de los rayos ultravioleta en la planta (Price *y col.*, 1995; Kolb *y col.*, 2001). Por ello, los más de 200

flavonoles descritos, se encuentran en los tejidos externos de muchas frutas y hortalizas, como el pimiento (Willians y Harbone, 1994). En frutas podemos encontrar alrededor de 50 flavonoles distintos, fundamentalmente glicósidos de 4 agliconas: kaempferol, quercetina, miricetina e isoramnetina, estando ampliamente descrita su presencia en pimiento (Lee *y col.*, 1995).

El flavonol más común es la quercetina, la cual se encuentra en altas concentraciones en cebolla (*Allium cepa*) (Hertog *y col.*, 1992a). Normalmente se encuentra en forma de diferentes glicósidos, siendo el más abundante la quercetina-3-rutinosido, también llamado rutina o quercetina-3-ramnoglucósido. Otros flavonoles que habitualmente se ingieren en la dieta son kaempferol (brócoli) y mirecitina (bayas).

Flavan-3-oles y proantocianidinas

Los flavan-3-oles, también llamados catequinas o taninos, generalmente se encuentran como agliconas o esterificadas con ácido gálico, siendo las más comunes la (+)-catequina y (-)-epicatequina. No aparecen de forma mayoritaria en frutas, sino que lo hacen excepcionalmente. Las frutas con mayor contenido en catequinas son: albaricoques, cerezas, moras y uvas. Además de estas frutas, las fuentes principales de catequinas son el té y el vino tinto (Arts *y col.*, 2000). Las proantocianidinas son los productos de condensación de los flavan-3-oles, los cuales se unen por enlaces covalentes $4 \rightarrow 8$ y $4 \rightarrow 6$.

Flavonas y flavanonas

Las flavonas son estructuralmente muy parecidas a los flavonoles, solamente difieren en la ausencia del grupo hidroxilo en la posición 3 del anillo C (**Figura 1.7**). Las principales flavonas en la dieta son apigenina y luteolina, y las fuentes de las mismas se limitan a pimiento verde, apio y perejil (Hertog *y col.*, 1992a; Hertog *y col.*, 1992b; Justesen *y col.*, 1998).

En cuanto a las flavanonas, son flavonas sin la instauración entre C2 y C3 (**Figura 1.7**), lo que produce un centro quiral en C2. Están representadas por naringenina y hesperidina. La principal fuente de éstas la encontramos en cítricos, con una concentración de hesperidina de 125-250 mg por litro de zumo (Rouseff *y col.*, 1987).

Isoflavonas

La soja es la principal fuente de isoflavonas, las cuales se encuentran representadas por daidzeína y genisteína (Reinli y Block, 1996). Éstas han recibido una considerable atención debido a su propiedades estrógenicas y su supuesto papel en la prevención del cáncer de mama y la osteoporosis (Tapiero *y col.*, 2002).

1.1.3.2. No flavonoides

Bajo esta denominación, encontramos generalmente los ácidos fenólicos (benzoico y cinámico) y otros derivados fenólicos como los estilbenos.

Ácidos fenólicos

El término ácido fenólico, en general designa a los fenoles que presentan un grupo funcional carboxílico. Éstos a su vez se pueden dividir, en función de su patrón carbonado, en ácidos hidroxibenzoicos y ácidos hidroxicinámicos (**Figura 1.8**). Ambas estructuras se pueden encontrar con diferentes niveles de hidroxilación, (Clifford, 2000; Tomás-Barberán y Clifford, 2000).

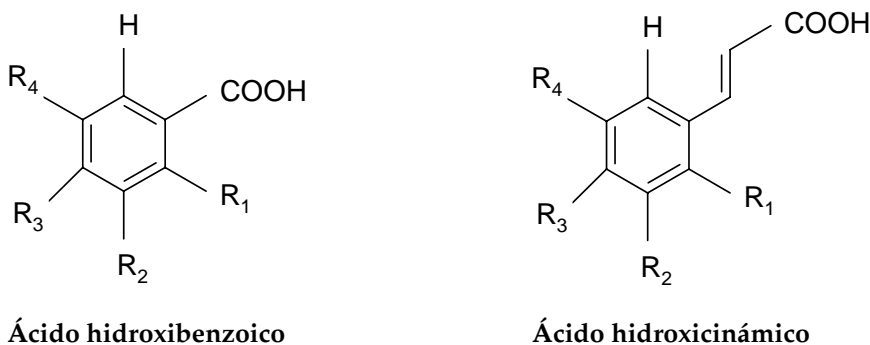


Figura 1.8. Estructura básica de los principales ácidos fenólicos.

El contenido de ácidos hidroxibenzoicos en frutas y hortalizas es generalmente bajo (Tomás-Barberán y Clifford, 2000), excepto en frutas rojas, rábano negro, cebollas y piel de patata (Herrmann, 1989; Törrörent *y col.*, 1997; Lewis *y col.*, 1998). Los principales ácidos hidroxibenzoicos son ácido gálico, ácido protocatéquico,

ácido *p*-hidroxibenzoico y 4- hidroxibenzoico.

Los derivados del ácido cinámico se encuentran principalmente representados por los ácidos cafeicos, ferúlico, sinápico y *p*-cumárico, siendo el más representativo el ácido cafeico (Macheix *y col.*, 1990). Estos ácidos raramente se encuentran en forma libre, generalmente aparecen esterificados con ácido quínico, tartárico o con carbohidratos. Los ésteres del ácido quínico se denominan ácidos clorogénicos, siendo el más común el 5-cafeoilquínico o ácido clorogénico (**Figura 1.9**).

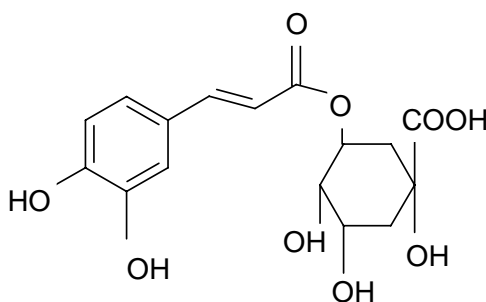


Figura 1.9. Estructura del ácido clorogénico (5-cafeoilquínico).

Taninos hidrolizables

Son moléculas de elevado peso molecular (500-3000 Da) por lo general solubles en agua, derivadas de la β -1,2,3,4,6-pentagalactoglucosa que, en esencia, consiste en ésteres de ácido gálico y glucosa. Las uniones tipo éster se rompen bajo condiciones suaves de hidrólisis (ácidas, básicas o enzimáticas), de ahí que se denominen taninos hidrolizables.

Dependiendo de los productos de hidrólisis diferenciamos entre:

- Galotaninos, cuando su hidrólisis libera ácido gálico.
- Elagitaninos cuando su hidrólisis libera ácido elágico.

Estos compuestos se encuentran muy distribuidos en el Reino Vegetal, siendo las principales fuentes de la dieta las nueces, fresas, frambuesas, zarzamora, granada y sus derivados como zumos y mermeladas (Espín y Tomás-Barberán, 2006).

Estilbenos

Los estilbenos son fitoalexinas, es decir, metabolitos secundarios producidos por las plantas en respuesta a alguna agresión externa como tratamientos químicos,

infecciones fúngicas o bien exposición a luz ultravioleta, confiriéndole a la planta una mayor resistencia. Son moléculas ampliamente distribuidas en el Reino Vegetal, sin embargo su presencia en la dieta es poco significativa, restringiéndose básicamente a las uvas, el vino tinto, los cacahuets y a diferentes bayas del género *Vaccinium* (Burns *y col.*, 2002; Lyons *y col.*, 2003; Gürbüz *y col.*, 2007). Químicamente son 1,2-diariletenos. Por lo general, en el anillo A presentan dos grupos hidroxilos en posición *meta* y/o *para* (**Figura 1.10**). Los estilbenos más representativos son el resveratrol y su glucósido piceido, el piceatanol, así como los dímeros y trímeros de resveratrol que dan lugar a las viniferinas.

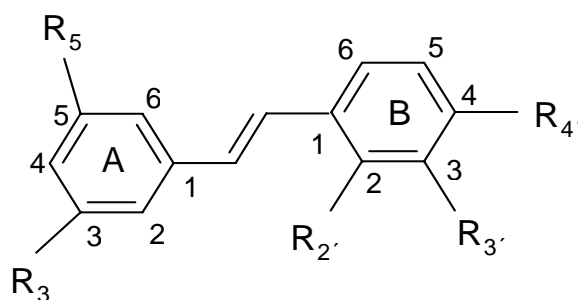


Figura 1.10. Estructura general de los estilbenos.

El resveratrol es uno de los polifenoles más estudiados en los últimos años debido al creciente interés por sus propiedades promotoras de la salud, ya que se ha demostrado que tiene una gran capacidad antioxidante *in vitro* (Espin y Wichers, 2000) y en cultivos celulares, donde actúa como un potente inhibidor de la formación de radicales implicados en enfermedades cardiovasculares, carcinógenas y degenerativas (Jang y Pezzuto, 1999.; Martínez y Moreno, 2000).

Se conoce muy poco sobre la identificación y acumulación de compuestos fenólicos en pimiento. La investigación en la identificación y acumulación de estos compuestos en pimiento es escasa, a pesar de que es un fruto que presenta una cantidad moderada de flavonoides y ácidos fenólicos en la piel. El pimiento posee derivados del ácido hidroxicinámico, O-glicosilflavonoides y en menor concentración C-glicosilflavonoides (Materska *y col.*, 2003). La mayoría de los estudios se han centrado en el análisis de las agliconas (luteolina y quercetina) de los flavonoides tras una hidrólisis ácida (Howard *y col.*, 2000; Lee *y col.*, 1995). Sukrasno y Yeoman (1993)

identificaron en pimiento picante (*Capsicum frutescens* var. cayena) derivados del ácido cinámico tales como los glucósidos del ácido *p*-cumárico, cafeico y 3,4-dimetoxicinamoilglucósidos, además de cuatro flavonoides, dos de ellos identificados como 3-O-ramnosilquercetina y 7-O-glucosilluteolina.

En general, los compuestos fenólicos poseen elevada capacidad antioxidante (Cao *y col.*, 1996; Wang *y col.*, 1996; Eastwood, 1999), inhibiendo la oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL) que juegan un papel importante en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares (ECV), como por ejemplo la aterosclerosis (Frankel *y col.*, 1993; Teissedre *y col.*, 1996; Das *y col.*, 1999; Covas *y col.*, 2000; Gimeno *y col.*, 2000; Serafini *y col.*, 2000; Teissedre y Waterhouse, 2000).

Las propiedades anteriormente citadas guardan relación, en parte, con las conclusiones de un estudio llevado a cabo por Renaud y De Lorgeril en 1992, en el que se comparó la tasa de mortalidad por ECV y el nivel de colesterol sérico en distintas poblaciones del mundo (Renaud y De Lorgeril, 1992). La correlación fue altamente positiva para las poblaciones estudiadas, excepto para Toulouse, la cual mostraba los mismos niveles de colesterol en sangre que Glasgow, pero una tasa de mortalidad por ECV mucho menor. Esta aparente discrepancia entre el riesgo de sufrir ECV (nivel alto de colesterol en sangre) y muerte por ECV se denominó "Paradoja Francesa". Tras el estudio minucioso de las variables que podrían contribuir a esta discrepancia se encontró el elevado consumo de vino tinto en Toulouse como presunto responsable de la citada paradoja. Estudios posteriores han corroborado que el elevado contenido polifenólico del vino tinto le confiere carácter cardioprotector (De Gaetano y Cerletti, 2001; Wollin y Jones, 2001; De Gaetano *y col.*, 2002). Por otra parte, los compuestos fenólicos también muestran actividad: i) antitumoral interfiriendo en las etapas de iniciación, promoción y progresión del cáncer (Damianaki *y col.*, 2000); ii) antimicrobiana (Capasso *y col.*, 1995); iii) hepatoprotectora (Wagner, 1986); iv) antienvjecimiento (Rice-Evans, 2001) y v) antialérgica (Di Carlo *y col.*, 1999).

Los radicales libres están implicados en la etiología de estas enfermedades. La causa de las alteraciones fisiológicas es el daño oxidativo originado en el ADN, los lípidos y las proteínas, por las especies reactivas de oxígeno (Diplock *y col.*, 1998, Ginsburg 1998). Es por ello, que los compuestos antioxidantes, al neutralizar la acción de los radicales libres, desempeñan una función importante en la prevención de estas enfermedades.

La actividad antioxidante, *in vitro* (Cao *y col.*, 1998; Dávalvos *y col.*, 2004) puede ser determinada por varios métodos:

- Potencial Antioxidante Total (TRAP)
- 2,2 - difenil – picril - hidracil (DPPH)
- ácido 2,2` - azino-bis(3-etilbenzotiazolina) - 6-sulfónico (ABTS)
- Reducción del Hierro - Poder Antioxidante (FRAP)
- Capacidad de Absorción del Radical de Oxígeno (ORAC)

El fundamento de todos ellos se basa en determinar cómo un agente oxidante induce daño oxidativo a un sustrato oxidable, daño que es inhibido o reducido en presencia de un antioxidante. Esta inhibición es directamente proporcional a la actividad antioxidante del compuesto o la muestra.

El método ORAC, es el único que combina en una sola cantidad tiempo y velocidad de inhibición del daño oxidativo (Prior *y col.*, 2003).

El ensayo ORAC-fluoresceína (ORAC-FL) es un método fluorimétrico que mide la degradación oxidativa de la fluoresceína (FL) tras la mezcla con el radical 2,2 – azobis - [2-metilpropionamida] dihidroclorido (AAPH). La caída de fluorescencia por la oxidación de la FL es menor, cuanto mayor sea concentración de antioxidantes en el medio de reacción (Lucas-Abellán *y col.*, 2008).

El método ORAC es el más usado para determinar la actividad antioxidante de muestras biológicas por cuatro razones:

- Utiliza el sistema AUC, área bajo la curva, combinando a la vez tiempo y grado de inhibición del radical libre cuando actúa sobre él un antioxidante (Cao *y col.*, 1995).
- Puede actuar sobre distintos tipos de radicales libres. Esto es de vital importancia en muestras biológicas, pues su capacidad antioxidante dependerá del tipo de radical libre utilizado en el ensayo (Cao *y col.*, 1996).
- Es un método fluorimétrico, evitando posibles interferencias por compuestos coloreados que pudieran existir en la matriz, como ocurre en los métodos espectrofotométricos, basados en la medida de absorbancia a una determinada longitud de onda.
- Puede medir tanto compuestos antioxidantes lipofílicos como hidrofílicos.

1.2. CULTIVO ECOLÓGICO Y TRADICIONAL

Las prácticas agrícolas convencionales, basadas en el tipo de agricultura intensiva tradicional, consiguen un alto rendimiento de la cosecha mediante el uso de fertilizantes químicos y productos fitosanitarios, la utilización de la irrigación y la mecanización. Sin embargo, aunque mediante estas prácticas se evitan fluctuaciones en las cosechas, no podemos obviar la preocupación existente con respecto a las graves repercusiones biológicas y medio ambientales que llevan asociadas (Robertson *y col.*, 2000).

La repercusión social ante este problema es evidente, y la calidad y la seguridad alimentaria del sector hortícola son consideradas en la actualidad aspectos prioritarios tanto para el consumidor como para la administración. Para solucionar los problemas derivados de la agricultura tradicional surge la agricultura ecológica, basada en el empleo de prácticas agrícolas racionales y respetuosas con el medio ambiente, como vía de obtención de alimentos que proporcionen buenos rendimientos, alta calidad y bajos niveles de contaminación (Becharrell y MacFie, 1991; Bourn y Prescott, 2002). La agricultura ecológica, también conocida como orgánica o biológica, tiene sus orígenes a principios del siglo XX y, aunque hace años resultó ser un movimiento marginal, actualmente es considerada como una alternativa a la agricultura convencional y está ampliamente establecida a nivel geográfico.

Este tipo de agricultura utiliza de forma óptima los recursos naturales y excluye el empleo de productos químicos de síntesis y fertilizantes, pasando a confiar en métodos biológicos o naturales para el control de plagas y enfermedades (Carpenter-Boggs *y col.*, 2000). Este cambio de metodología en la agricultura también es debido, en gran parte, a la toma de conciencia de “que somos lo que comemos”, es decir, el papel que la nutrición ejerce sobre la salud humana, ya que recientemente se han identificado cambios en la composición nutricional de frutas y verduras cultivadas bajo un sistema de producción ecológica, frente a los cultivados bajo un sistema de producción tradicional (Worthington, 2001).

En la agricultura ecológica existe una continua experimentación y modificación de prácticas, herramientas, semillas y calendarios. Tiende a ser conservadora por el sentido de seguridad derivado de seguir prácticas con mayor probabilidad de éxito, tales como el uso de cultivos múltiples en lugar de

monocultivos, y el uso de heterogeneidad genética en lugar de genotipos uniformes. Puede servir para sistemas extensivos e intensivos de aprovechamiento; para autoconsumo y producción comercial; y puede adaptarse a diferentes formas de organización social.

La principal diferencia entre la agricultura ecológica y tradicional radica en el uso de fertilizantes. Mientras que en la agricultura tradicional se utilizan fertilizantes químicos, en la ecológica se emplean fertilizantes orgánicos como el estiércol, abono, aguas residuales, etc.

Otra diferencia entre los dos sistemas de cultivo es el uso de productos fitosanitarios. En la agricultura tradicional, se utilizan los productos disponibles en el mercado (autorizados por la legislación), mientras que la agricultura ecológica permite sólo el empleo de unos pocos como por ejemplo, el sulfato de cobre (INFOAM, 1998).

La comisión del Codex Alimentarius considera a la agricultura ecológica ("Organic farming", incluyendo los conceptos "biological" y "ecological") en su documento Guidelines for the Production, Processing, Labelling and Marketing of Organically Produced Foods, Codex Alimentarius Commission, CAC/GL32, 1999, point 7], como un sistema de producción holístico, que promueve y estimula la salud del agroecosistema, incluyendo la biodiversidad, los ciclos biológicos y la actividad biológica del suelo. Enfatiza en el uso de buenas prácticas de manejo cuando se utilizan elementos externos a la granja, promoviendo en la medida de lo posible el empleo de métodos biológicos y mecánicos, en oposición a la utilización de productos orgánicos de síntesis.

Esta definición es también la que considera la Comisión Europea en su documento: "Organic Farming: Guide to Community rules" (Le Guillou y Scharpé, 2001).

El marco legal de la producción agrícola ecológica, inscrito dentro de la política de calidad alimentaria, se recoge en el Reglamento CEE nº 2092/91 del Consejo sobre la producción ecológica. En España, este tipo de agricultura se encuentra regulada desde 1989, año en el que se aprobó el Reglamento de la Denominación Genérica "Agricultura Ecológica" y su Consejo Regulador, que vino aplicándose hasta su entrada en vigor, el 1 de enero de 1993.

1.2.1. Regulación del cultivo ecológico

En la actualidad existen tres organismos internacionales encargados de regular la agricultura ecológica con el fin de facilitar el comercio internacional:

- IFOAM (Federación Internacional de Agricultura Ecológica) cuyos estándares básicos “Pliegos de Condiciones Marco de la Agricultura Ecológica y de la Transformación” se aprobaron en 1998. Establece las bases para el desarrollo de los Reglamentos propios de las organizaciones nacionales.
- Comisión del Codex Alimentarius (programa común de la FAO y la Organización Mundial de la Salud (OMS)) que en 1999 adoptó las “Directrices para la producción, elaboración, etiquetado y comercialización de alimentos producidos orgánicamente”. Estas normas establecidas por el Codex Alimentarius sirven de referencia para la elaboración de leyes a nivel mundial.
- Unión Europea, cuyos estándares fueron aprobados en el Reglamento (CEE) nº 2092/91 del consejo de 24 de junio de 1991 (actualizado en Junio de 2008) sobre la producción ecológica y su indicación en los productos agrarios y alimenticios, (Le Guillou y Scharpé, 2001).

Este reglamento de la UE establece unas condiciones mínimas para todos los Estados miembros con respecto a la producción agrícola ecológica. Se aplica a los productos vegetales y animales no transformados, a los productos agrícolas transformados destinados a la alimentación humana, que han sido preparados básicamente a partir de uno o más ingredientes de origen vegetal y/o animal, así como a los piensos para animales que lleven en el etiquetado, en la publicidad o en los documentos comerciales, indicaciones que sugieran que el producto se ha obtenido mediante el método de producción ecológica definido en el Reglamento.

Las disposiciones del citado reglamento son de obligado cumplimiento tanto para productores como para transformadores de productos ecológicos y en él se especifican normas de producción, normas de transformación, etiquetado, logotipo y control.

1.2.1.1. Normas de producción

El periodo mínimo de conversión de una parcela de agricultura convencional en una de agricultura ecológica es al menos de dos años antes de la siembra. Este periodo de conversión comienza a partir de la fecha en la que el propietario de la explotación comunica el comienzo de su actividad a la autoridad competente.

La fertilidad y la actividad biológica del suelo deben mantenerse o incrementarse mediante el cultivo de leguminosas, de abono en verde y de plantas de enraizamiento profundo, siguiendo un programa de rotación anual. Esta medida puede completarse incorporando a la tierra estiércol procedente de explotaciones ganaderas ecológicas y materias orgánicas, transformadas en compost o sin transformar, que provengan de microorganismos no modificados genéticamente y autorizados en la agricultura general del Estado miembro correspondiente, para mejorar el estado general del suelo o el nivel de elementos nutritivos de la tierra o los cultivos.

En el caso de que estos medios no sean suficientes para lograr una nutrición adecuada de los vegetales o acondicionar la tierra, siendo necesario incorporar fertilizantes orgánicos o minerales, los únicos fertilizantes que se pueden utilizar son básicamente minerales poco solubles, que no se obtienen mediante síntesis química.

La protección de las plantas contra parásitos, enfermedades y malas hierbas, debe llevarse a cabo mediante selección de especies y variedades adecuadas, aplicación de programas de rotación de cultivos, empleo de medios mecánicos de cultivo y quema de malas hierbas.

Sólo en el caso de que exista un peligro inmediato del cultivo se podrá recurrir al uso de los productos fitosanitarios recogidos en el Reglamento 2092/91.

1.2.1.2. Normas de transformación

Las normas que rigen la transformación de los productos agrícolas ecológicos en alimentos, especifican que al menos el 70% de los ingredientes de origen agrario deben proceder de productos obtenidos con arreglo a las normas enunciadas en el Reglamento (CEE) nº 2092/91, quedando prohibido el uso al mismo tiempo, de un

ingrediente producido ecológicamente y el mismo ingrediente producido de manera convencional.

En él también se establece una gran limitación al empleo de ingredientes de origen no agrario y de auxiliares tecnológicos permitidos para la elaboración de alimentos a partir de productos ecológicos. Las limitaciones se extienden a la aplicación de determinados tratamientos tecnológicos como el uso de radiaciones ionizantes y el empleo de organismos modificados genéticamente o productos derivados de los mismos.

1.2.1.3. Etiquetado

El etiquetado y la publicidad sólo pueden hacer mención al método de producción ecológica cuando se indique claramente que se refiere a un método de producción agraria, debiendo ir acompañado de una referencia a los ingredientes de origen agrario de que se trate.

La normativa establece que sólo se puede hacer referencia al método de producción ecológica en la denominación de venta, cuando al menos el 95% de los ingredientes hayan sido obtenidos por este método. En el caso de que el porcentaje de ingredientes obtenidos a través de producción ecológica sea menor del 70% en el producto final, no se podrá hacer referencia a la misma en ningún caso y si la cantidad de ingredientes ecológicos se encuentra entre el 70 y 95%, sólo se podrá hacer referencia a este método de producción en la lista de ingredientes.

1.2.1.4. Logotipo

Únicamente pueden llevar el logotipo y la indicación de control, algunos productos recogidos por el Reglamento (CEE) n° 2092/91, y particularmente, los que cumplan todas las condiciones siguientes:

- Contener al menos un 95% de ingredientes producidos según las normas de la agricultura ecológica.
- Haber estado sometidos al régimen de control previsto por el Reglamento durante todo el proceso de producción y elaboración.

- Comercializarse como alimentos preenvasados o venderse directamente en envases sellados.
- Llevar la etiqueta, el nombre y/o la razón social del productor, elaborador o vendedor, así como el número de código del organismo de certificación.

El logotipo comunitario (**Figura 1.11**) debe ajustarse a los modelos indicativos en el Reglamento (CE) n° 331/2000, donde se especifican las condiciones de presentación y utilización del mismo.



Figura 1.11. Logotipo de Agricultura Ecológica.

1.2.1.5. Control

Todas las actividades de producción, elaboración o importación de productos agrícolas y alimentos que aludan a la producción ecológica, deben ser notificadas a la autoridad competente del Estado miembro, así como someterse, de forma obligatoria, al sistema de control específico establecido por el mismo con el fin de garantizar la trazabilidad de los productos.

El programa de control ha de cumplir los requisitos mínimos establecidos en el Anexo III del Reglamento (CEE) n° 2092/91 y puede ser aplicado tanto por organismos públicos como privados siempre y cuando, en este último caso, sean autorizados por la autoridad competente.

En España todos los aspectos relacionados con la agricultura están transferidos a las Comunidades Autónomas. Tal como se define en el Real Decreto 1852/93, a ellas corresponde la designación de la autoridad competente y los

organismos de control, así como la creación de la Comisión Reguladora de Agricultura Ecológica, en el que participan el sector, los consumidores y la Administración General del Estado y la de las Comunidades Autónomas, para el asesoramiento en esta materia.

Dentro de la Comunidad Autónoma de la Región de Murcia, la certificación y el control de la agricultura ecológica corresponde al Consejo de Agricultura Ecológica de la Región de Murcia, en cuyo Reglamento de régimen interno se recogen las disposiciones del Reglamento (CEE) n° 2092/91 del Consejo, de 24 de junio de 1991, sobre la producción agrícola ecológica y su indicación en los productos agrarios y alimenticios.

1.2.2. Calidad nutritiva de los productos ecológicos

La calidad nutritiva está relacionada con la capacidad de los alimentos de proporcionar determinados nutrientes que favorezcan el estado de salud, y eviten la aparición de enfermedades provocadas por deficiencias concretas.

La calidad nutritiva de los productos ecológicos depende de diferentes factores como la variedad de cultivo, características del suelo, clima, tipo e intensidad de fertilización, manejo global del sistema, etc. En la agricultura ecológica, la fertilización orgánica y el adecuado manejo del suelo originan una mineralización en sincronía con las necesidades nutritivas de las plantas, lo que se traduce en un intervalo de nutrientes más amplio y equilibrado que cuando se aplican los fertilizantes industriales solubles de la agricultura tradicional (Molina y Pérez, 2003).

Uno de los principales beneficios de los productos ecológicos, para la salud de los consumidores, es la ausencia de residuos de productos fitosanitarios de síntesis, ya que su uso no está permitido en el cultivo ecológico y sólo se podrían encontrar trazas en el producto debido a una contaminación accidental (lluvia, agua de riego, entre otros). De cualquier manera, los controles tan estrictos que se llevan a cabo tanto en la explotación como en la transformación y producto acabado, aseguran que el producto ecológico llega al consumidor sin residuos de plaguicidas, aunque somos conscientes que en alimentación, el riesgo cero no existe. Así, en el caso de que ocurra una contaminación accidental, siempre encontraremos una concentración inferior al límite máximo de residuos legislado y menor, a su vez, a la que pueda

detectarse en el producto obtenido siguiendo prácticas agrícolas tradicionales (Molina y Pérez, 2003).

1.2.3. Relación agricultura ecológica-consumidor

Las actividades comerciales internacionales están actualmente reguladas por los acuerdos adoptados en la Organización Mundial del Comercio (OMC).

En este marco, adquiere especial importancia el papel del Codex Alimentarius, dependiente de la FAO y de la OMS, como entidad responsable de la elaboración de normas que respondan a los objetivos de proteger la salud de los consumidores y asegurar prácticas equitativas en el comercio de alimentos. Pero para que la cadena alimentaria y el comercio funcionen correctamente, se requiere un denominador común, el factor de seguridad de los alimentos, que constituye el condicionante de la demanda económica de todos los mercados y la garantía de continuidad de los productos alimenticios en ellos.

Las fuertes crisis alimentarias vividas por la sociedad europea han provocado que los sistemas de producción, industriales, comerciales y de seguridad existentes, hayan sido puestos en duda y sometidos a presiones sin precedentes, con repercusiones en todos los operadores, sectores económicos, administrativos y políticos.

Este fenómeno ha provocado un aumento del interés por los productos ecológicos, lo que ha sido determinante para la consolidación de la agricultura ecológica como alternativa a la producción agrícola tradicional. Esta nueva orientación del consumo, está directamente relacionada con la creciente tendencia hacia la adquisición de productos alimentarios de calidad superior, naturales y con un adecuado nivel nutritivo (Beharrell y Mcfie, 1991).

A pesar de que es una opción valorada por los consumidores, un estudio realizado en la Comunidad de Madrid, reveló que existe un gran desconocimiento de los productos ecológicos, motivado fundamentalmente por la falta de información y, hasta ahora, por la reducida oferta de estos productos en el mercado, que además se distribuyen por canales poco convencionales. Sin embargo, aunque su aspecto no fuese tan atractivo, el 66,7% de los consumidores los consumiría por su sabor, salubridad, respeto al medio ambiente y novedad (Albardíaz *y col.*, 1996). A pesar de

estos resultados, hay que tener en cuenta la dificultad que, según Beharrell y Mcfie, 1991, representa para el consumidor la diferenciación entre la calidad científica (objetiva) y la apreciada por él (subjetiva).

En cuanto a la comercialización de la producción ecológica en España, desde sus inicios, se ha orientado a la exportación, y en el caso del mercado interno, ha sido desarrollada a través de canales especializados, siendo difícil para el consumidor encontrarlos disponibles en los pequeños y medianos comercios a los que suele acudir (Alonso *y col.*, 2002a), representando un inconveniente para el consumidor, ya que ha de desplazarse hasta los puntos de venta de estos productos si desea adquirirlos.

En relación con los precios de venta, se detecta una “excesiva bonificación” por las diferencias existentes entre el producto convencional y el ecológico. Estos precios más caros responden a unos mayores costes de producción y a la percepción de éstos como productos “diferenciados” por el consumidor.

En general, se cree que los alimentos ecológicos son más saludables que los alimentos producidos mediante técnicas tradicionales (Shepherd *y col.*, 2005), siendo además más compatibles con el medio ambiente (Woese *y col.*, 1997). En la bibliografía podemos encontrar más de 150 estudios que comparan la calidad nutricional de los productos convencionales y ecológicos en hortalizas, demostrando la existencia de niveles más altos de ácido ascórbico (vitamina C) y niveles más bajos de nitratos en los productos ecológicos (Woese *y col.*, 1997; Bourn y Prescott, 2002; Brandt y Mølgaard, 2001).

En resumen, los alimentos ecológicos están alcanzando grandes cotas de mercado y ya es posible encontrar alimentos producidos ecológicamente en muchos supermercados de Europa y Norteamérica.

1.3. USO DE BIOFERTILIZANTES

El exceso de fertilización química es una práctica agrícola que está provocando serios problemas ecológicos y económicos. Anualmente, se aplican millones de toneladas de fertilizantes químicos en la agricultura, de los cuales, las plantas son capaces de aprovechar solo una parte, mientras que el resto se pierde debido al proceso de lixiviación, o bien queda inmovilizado en el suelo. Por otra

parte, el exceso de fertilización, lejos de garantizar la productividad y calidad de las cosechas, causa fenómenos adversos en los cultivos como el desequilibrio nutricional, inhibición del crecimiento y acumulación de sustancias indeseables tales como el nitrato.

El nitrato existe en forma natural en los suelos y aguas, y es un nutriente imprescindible para plantas y microorganismos. Sin embargo, gran parte de los nitratos de las aguas provienen del exceso de fertilización. La presencia de niveles elevados de nitratos en los alimentos y el agua, puede provocar graves repercusiones en la salud de los consumidores. La ingestión de nitratos y su reducción posterior a nitritos, causa en el organismo la conversión de la hemoglobina en metahemoglobina, lo que reduce la capacidad del organismo para captar y ceder oxígeno, problema que afecta particularmente a la población infantil. Este fenómeno es bien conocido desde hace años (American Academy of Pediatrics 1970; Sanchez- Echaniz, *y col.*, 2001). El nitrito también es capaz de reaccionar con las aminas en el organismo, produciendo nitrosaminas, sustancias de reconocido carácter carcinogénico (Vermeer *y col.*, 1998). Otro problema de salud asociado al consumo de nitratos, es el incremento de volumen de la glándula tiroides y los desórdenes en su funcionamiento (Tajtakova *y col.*, 2006).

El fósforo es otro elemento de vital importancia en la fertilización química y puede contribuir notablemente a la contaminación. Se encuentra en el suelo formando tres fracciones; una inorgánica soluble, otra inorgánica insoluble, y una fracción orgánica insoluble.

Para reducir los efectos adversos de la fertilización química (acumulación de nitratos en el agua y los alimentos, contaminación por el uso excesivo de fertilizantes tanto químicos como orgánicos o eutrofización de los recursos hídricos), se está recurriendo cada vez con más frecuencia al uso de productos de origen biológico, que unido a la aplicación de buenas prácticas agrícolas (BPA), reduce la contaminación, facilita la recuperación de suelos y posibilita una explotación agrícola más racional.

Uno de los biofertilizantes existentes en el mercado es Biopron[®], compuesto por dos rizobacterias: *Azospirillum brasilense* y *Pantotea dispersa*. Estas bacterias son capaces de colonizar las raíces de las plantas y fijar nitrógeno, solubilizar fosfatos así como otros minerales del suelo, producir fitohormonas, sideróforos, y otras sustancias enraizantes y estimulantes del crecimiento vegetal; poniendo a disposición de las plantas los elementos nutritivos necesarios para su desarrollo. Por otro lado,

este biofertilizante tiene un efecto positivo sobre la mejora de las características del suelo, disminuyendo la salinidad y mejorando la estructura del mismo. Se trata de potenciar los mecanismos de la naturaleza para reducir, e incluso eliminar, la fertilización química. Biopron[®] es un producto no solo diseñado para la reducción de la fertilización nitrogenada, sino que permite además reducir la mayoría de los fertilizantes químicos empleados en la actualidad. Por esta vía se logra una reducción drástica de la contaminación ambiental y la posibilidad del lavado de los diferentes componentes del abonado. Por otra parte, una nutrición más sana de la planta, hace que se reduzcan también los contenidos de nitratos en hojas y frutos. Todo esto conduce a la producción de alimentos más saludables mediante la aplicación de una agricultura respetuosa con el medio ambiente.

La región del suelo próxima a la raíz, es relativamente rica en nutrientes debido a la actividad fotosintética de la planta (Lynch y Whipps, 1991). Por ello, la rizosfera es una zona que cuenta con una gran población microbiana activa, capaz de causar diferentes efectos, tanto favorables como desfavorables, en el crecimiento de la planta (Nelson, 2004). Las rizobacterias, fueron descritas por primera vez por Kloepper y Schroth (1978), como bacterias del suelo que colonizan las raíces de las plantas y favorecen su crecimiento. *Azospirillum* y *Pantoea* están definidas como bacterias del suelo promotoras del crecimiento de un gran número de especies vegetales de importancia agroeconómica (Bashan *y col.*, 2004). Estas rizobacterias son capaces de actuar sobre cualquier tipo de planta, independientemente de que ésta haya estado o no previamente expuesta a la bacteria (Dobbelaere *y col.*, 2003).

Aunque las rizobacterias estimulan el crecimiento de la planta por mecanismos directos o indirectos, todavía no se conoce con exactitud su mecanismo de acción (Bashan *y col.*, 2004; Glick, 1995). Los mecanismos directos de promoción del crecimiento de la planta por rizobacterias, pueden ser demostrados en ausencia de patógenos o de otros microorganismos de la rizosfera, mientras que los mecanismos indirectos están relacionados con la capacidad de estas bacterias para reducir los efectos nocivos de patógenos sobre el rendimiento del cultivo (Nelson, 2004). Las rizobacterias aumentan directamente el crecimiento de la planta por varios mecanismos: fijación de nitrógeno atmosférico que es transferido a la planta, producción de sideróforos que quelatan hierro y lo convierten en disponible para la raíz, solubilización de minerales tales como fósforo y síntesis de fitohormonas (Glick, 1995; Dobbelaere *y col.*, 2001). También se ha demostrado que la presencia de

rizobacterias en la raíz de la planta favorece la absorción de minerales por la raíz, ya que aumenta el flujo de iones hasta su superficie (Bashan y Levanony, 1991; Bertrand *y col.*, 2000).

Azospirillum sp. es conocida principalmente por su capacidad para producir hormonas, poliaminas y aminoácidos en cultivos (Thuler *y col.*, 2003). Además, está involucrada en la fijación de nitrógeno, y el aumento de la actividad glutamato deshidrogenasa y glutamina sintetasa (Ribaudo *y col.*, 2001). *Azospirillum brasilense* produce grandes cantidades de ácido indolacético extracelular, favoreciendo así la elongación de la raíz y aumentando el área superficial y la materia seca (El-Khawaw y Adachi, 1999; Molla *y col.*, 2001). Los efectos de estos microorganismos sobre la planta dependen, en gran medida, de la especie y genotipo (Sensoy *y col.*, 2007), tipo de suelo y prácticas agrícolas, tales como la aplicación de fertilizantes (Gryndler *y col.*, 2001).

En la actualidad, un gran número de plantas son cultivadas en invernaderos en condiciones óptimas, con altos niveles de nutrientes. Esta práctica impide cualquier desequilibrio o falta de nutrientes en la rizosfera, pero aumenta la liberación de nutrientes al medio ambiente. Este hecho es especialmente importante en el caso del nitrato, principal anión que contribuye a la productividad de los cultivos (Mohr y Schopfer, 1995). Para disminuir esta contaminación, es necesario reducir la fertilización del suelo con nitrógeno, y una alternativa válida consiste en el empleo de biofertilizantes, como rizobacterias, para aumentar la eficiencia en el uso de los nutrientes y así, estimular el crecimiento de la planta.

1.4. ESTRÉS SALINO

1.4.1. Situación actual

La salinidad se define como la acumulación de sales solubles en el suelo, a tales niveles que se ve afectada la producción agrícola, el medio ambiente y el bienestar económico (Rengasamy, 2006). El Na^+ y el Cl^- son respectivamente, el catión y el anión predominante en la mayoría de las zonas salinas, aunque en localizaciones específicas, Ca^{2+} , Fe^{2+} y Mg^{2+} pueden causar también problemas de salinidad (Greenway y Munns, 1980). La distribución de las zonas afectadas por la salinidad

está muy relacionada con factores ambientales. Así, en los climas áridos o semiáridos, la salinidad constituye el principal factor limitante de la fertilidad de los suelos y de la productividad de los cultivos (Wollenweber *y col.*, 2005).

Aunque la salinidad es un fenómeno natural donde quiera que la evaporación exceda a la precipitación, la actividad humana, es decir, el riego, contribuye notablemente a esta salinidad (Kijne, 2006). En la actualidad, cerca de la mitad de las zonas regables presentes en la tierra están bajo la influencia de la salinidad, debido a la baja calidad del agua de riego (Szabolcs, 1994; Ghassemi *y col.*, 1995; Munns, 2002; Regasamy, 2002; Hillel y Vlek, 2005).

En la cuenca mediterránea, 16 millones de Ha están afectadas por la salinidad, incluyendo las casi 840.000 Ha presentes en la península Ibérica. En España, a partir de la década de los 60, se produjo un fuerte incremento de la producción hortícola. Este incremento se basó fundamentalmente en el empleo de materiales de plástico en la agricultura, que permitieron aprovechar las excelentes condiciones climáticas de las que goza el sur de la península. Sin embargo, este aumento e intensificación de los cultivos también desencadenó una gran demanda en el consumo de agua y, consecuentemente, se tuvieron que movilizar recursos hasta entonces no utilizados, tales como aguas de pozos de salinidad moderada-alta. La sobreexplotación de todos estos recursos ha originado que en amplias zonas de Almería, Murcia y la Comunidad Valenciana, se haya producido un agotamiento de los acuíferos, propiciando en algunos casos la intrusión de agua marina, con una creciente salinidad de las aguas de riego.

1.4.2. Efectos de la salinidad en la planta

El daño que la sal origina en las plantas, se debe a un efecto osmótico y otro específico que causa desequilibrios nutricionales, toxicidad y estrés oxidativo (Flowers y Yeo, 1986; Goyal *y col.*, 2003; Greenway y Munns, 1980; Munns, 1993; Zhu, 2002). Estos factores, separados o combinados entre sí, tienen efectos adversos en el desarrollo de las plantas, los cuales han sido ampliamente descritos a diferentes escalas: molecular (Yeo, 1998; Hasegawa *y col.*, 2000; Maggio *y col.*, 2001; Zhu, 2002; Tester y Davenport, 2003), bioquímico (Ashraf y Harris, 2004; Parida y Das, 2005), fisiológico (Munns *y col.*, 2000; Munns, 2002), y de planta completa (Munns y

Termaat, 1986). En numerosas ocasiones, es difícil distinguir si los cambios fisiológicos y bioquímicos observados en las plantas sometidas a estrés salino, son debidos a los efectos de la sal, o bien responden a mecanismos de adaptación (Ashraf y Harris, 2004).

La acumulación de iones específicos en la célula es otro efecto perjudicial que la salinidad ejerce sobre las plantas (Munns, 2002). Esta acumulación de iones da lugar a desequilibrios nutricionales, toxicidad y estrés oxidativo (Gorham *y col.*, 1985; Grattan y Grieve, 1999, Zhu, 2001).

Algunos de los efectos tóxicos que el Na^+ y el Cl^- provocan en las plantas son: i) inhibición de la fotosíntesis cuando altas concentraciones de estos iones se acumulan en los cloroplastos (Greenway y Munns, 1980; Paranychianakis y Chartzoulakis, 2005), ii) modificación de la anatomía foliar y la ultraestructura de los cloroplastos (Mitsuya *y col.*, 2000; Parida y Das, 2005) y iii) modificación de la asimilación de los carbohidratos (Arbona *y col.*, 2005). Además, el Na^+ es tóxico para el metabolismo celular y desajusta el funcionamiento de algunas actividades enzimáticas, como pueda ser POD (Degl'Innocenti *y col.*, 2005). La causa de ello podrían ser los daños generados por el estrés oxidativo, derivado de la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en las plantas sometidas a diferentes tipos de estrés ambiental, entre ellos la salinidad. Estas especies podrían dar lugar a la peroxidación de los lípidos de membrana, oxidación de proteínas y disrupción del fotosistema II (Zhu, 2001; Mittler, 2002). De esta forma, las plantas con sistemas antioxidantes más efectivos se adaptarán mejor a los ambientes salinos.

1.5. ACTIVIDAD PEROXSIDASA

Las frutas y hortalizas mínimamente procesadas sufren importantes cambios cualitativos y cuantitativos desde la cosecha hasta su consumo. Estos cambios implican la pérdida de valor nutritivo y características organolépticas, debido a la oxidación de los compuestos fenólicos por enzimas oxidativas (Degl'Innocenti *y col.*, 2005). Sin embargo, también hay casos en los que la oxidación de fenoles por las enzimas oxidativas potencia tanto el sabor como el color de determinados alimentos, como ocurre en el té, café o cacao (Harbowy, 1997).

En general, las principales enzimas responsables de estas reacciones de oxidación de compuestos fenólicos son polifenoloxidasas (PPO) y peroxidasa (POD) (Chisari *y col.*, 2008).

1.5.1. Peroxidasa

Peroxidasa (hydrogen-peroxide oxidoreductase, E.C.1.11.1.7) es, junto con PPO, una oxidorreductasa ampliamente distribuida en frutas y verduras, siendo responsable del pardeamiento enzimático de las mismas. Su acción en la oxidación de sustratos está limitada por la biodisponibilidad de compuestos aceptores de electrones como radicales superóxidos, peróxido de hidrógeno e hidroperóxidos (Figura 1.12).

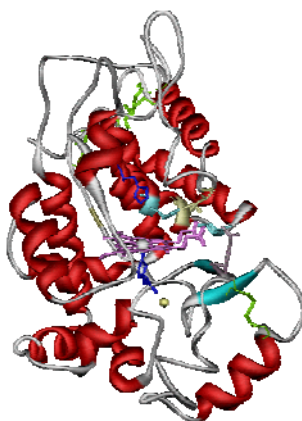


Figura 1.12. Estructura tridimensional de POD de cacahuete (Veich, 2004).

Es altamente específica respecto a su sustrato peróxido, siendo el H_2O_2 el más común; sin embargo, su especificidad respecto al sustrato donador de electrones es muy baja (Adams, 1978).

En presencia de H_2O_2 , POD oxida a un amplio rango de compuestos fenólicos como guayacol, pirogallol, ácido clorogénico, catequina, catecol, aminas aromáticas y ácido ascórbico (Onsa *y col.*, 2004). La oxidación de esta gran variedad de compuestos ha llevado a la conclusión de que POD está asociada a pérdidas de color, flavor y valor nutricional de alimentos vegetales frescos y procesados (Nebesky *y col.*, 1950; Bruemmer *y col.*, 1976; Kamps *y col.*, 1984; Robinson, 1987). Debido a su alta

termoestabilidad, esta enzima también está relacionada con el procesado de alimentos. De hecho, es utilizada como indicador de la correcta realización del tratamiento térmico, debido a su elevada concentración en la mayoría de los tejidos vegetales, estabilidad térmica y fácil medida (Lu y Whitaker, 1974; Anthon y Barrett, 2002).

Su ubicuidad, versatilidad bioquímica e intervención en un buen número de funciones en la planta, así como la existencia de una gran variedad de métodos para su análisis, ha permitido realizar numerosas investigaciones acerca de su naturaleza, mecanismo de acción y posibles funciones desempeñadas en las plantas (Gaspar *y col.*, 1982).

Se han purificado y estudiado peroxidasas de numerosas fuentes vegetales: patata (Leon *y col.*, 2002), melón (Rodríguez-López *y col.*, 2000), coles de bruselas (McLellan y Robinson, 1987), hojas de té (Kvaratskhelia *y col.*, 1997), zanahoria (Nair y Showalter, 1996), mango (Khan y Robinson, 1993), papaya (Da Silva *y col.*, 1990), espinaca (El Shamei, 1988), tomate (Jen *y col.*, 1980; Signoret y Crouzet, 1982), espárrago (Wang y Luh, 1983), fresa (Civello *y col.*, 1995) y pimiento (Serrano-Martínez *y col.*, 2008). En todos los casos, se ha evidenciado la existencia de varias isoenzimas, que difieren en peso molecular, estabilidad térmica, pH óptimo, especificidad de sustrato y papel fisiológico.

Las peroxidasas son holoenzimas compuestas por una apoenzima, generalmente una glicoproteína, unida no covalentemente a grupo prostético de naturaleza ferriporfirínica. Su mecanismo de reacción se caracteriza por la presencia de dos ciclos catalíticos alternativos: un ciclo oxidasa, en el que a partir de oxígeno molecular y a través de la oxidación de determinados compuestos, presentes habitualmente en las células vegetales, se genera peróxido de hidrógeno; y un ciclo peroxidasa propiamente dicho en el que el peróxido generado mediante el ciclo oxidasa, puede ser empleado para llevar a cabo oxidaciones de naturaleza peroxidativa (Dawson, 1988). Esta alternancia de ciclos oxidasa/peroxidasa podría explicar las especiales propiedades catalíticas y la gran versatilidad bioquímica que presenta esta enzima.

El estudio de la localización subcelular de la actividad peroxidasa contribuye al esclarecimiento del papel fisiológico desempeñado por esta enzima en la planta. Así, la existencia de un ciclo oxidasa, mediante el cuál la enzima genera uno de sus sustratos (peróxido de hidrógeno), explica por qué su localización y, por lo tanto su

funcionalidad, no queda restringida a aquellos compartimentos subcelulares en los que el peróxido se genera de manera continua, como son los cloroplastos, mitocondrias, peroxisomas y glioxisomas. Es más, dichos orgánulos no tienen actividad peroxidasa o bien los niveles de enzima son extremadamente bajos (Eltner, 1982). Paradójicamente, peroxidasa se encuentra localizada a nivel de la pared celular del citoplasma y de la vacuola, siendo la concentración de peróxido sumamente baja en estos compartimentos celulares (Ros-Barceló y Muñoz, 1992).

Debido al peculiar mecanismo de acción de esta enzima, la cantidad de posibles sustratos es muy elevada y está implicada en multitud de procesos fisiológicos. Sin embargo, *in vivo*, su funcionalidad depende de factores como, la presencia de inhibidores endógenos localizados junto a la enzima, como pueden ser los difenoles, que pueden actuar como atrapadores efectivos de radicales libres o antioxidantes. Se sabe que las peroxidasas están implicadas en diversos procesos fisiológicos, tales como: germinación, dominancia apical, crecimiento, desarrollo y maduración del fruto, degradación de clorofilas, senescencia, abscisión (por su papel en la biosíntesis del etileno) y letargo. También se sabe que está implicada en la reacción frente a diferentes situaciones externas desfavorables como: resistencia a parásitos y patógenos a través de los procesos de lignificación o, de producción de fenoles oxidados en los cuales interviene (Serrano-Martínez *y col.*, 2008).

Es interesante resaltar que durante el almacenamiento del material vegetal, las peroxidasas también participan en el metabolismo oxidativo produciendo pardeamientos, degradación de pigmentos, etc; con la consiguiente merma en la calidad final del mismo.

CAPÍTULO II. OBJETIVOS

2. OJETIVOS

El objetivo principal de ésta Tesis, es evaluar el efecto de diferentes factores (tipo de fertilización, salinidad del agua de riego y procesado) sobre distintos parámetros objetivos de calidad de pimiento.

Para la consecución de este objetivo principal, se contemplan los siguientes objetivos parciales:

1. Estudiar el efecto del tipo de producción, ecológica y tradicional, sobre diferentes parámetros de calidad de pimiento.
2. Estudiar el efecto del uso de biofertilizantes sobre diferentes parámetros de calidad de pimiento.
3. Estudiar el efecto del estrés salino sobre diferentes parámetros de calidad de pimiento.
4. Estudiar el efecto de la adición de β -CDs a pimiento de V gama, sobre diferentes parámetros de calidad.
5. Caracterización cinética y estabilidad térmica de POD de pimiento (*Capsicum annuum* L.).

CAPÍTULO III. MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIAL VEGETAL

3.1.1. Pimiento cultivado bajo sistema de producción ecológica y tradicional

Las plantas de pimiento dulce (*Capsicum annuum* L.) cultivo Almuden, tipo Lamuyo, fueron transplantadas de vivero a invernadero el día 14 de Diciembre de 2005. El invernadero se dividió en 8 lisímetros independientes con los dos tratamientos objeto de estudio. Cada lisímetro tenía 7,6 m de longitud y 6,5 m de ancho, con 7 líneas de irrigación por goteo, haciendo uso de su propio fertilizante y unidad de control de riego. La finalidad de usar lisímetros fue evitar cualquier interferencia o contaminación entre los tratamientos. Cada lisímetro contenía un total de 126 plantas, provistas de un gotero individual que les suministra un caudal de riego de 4 L/h. El horario de riego se aplicó de acuerdo a la evaporación en tanque evaporimétrico clase A, estando éstos situados dentro del invernadero. Antes de realizar el transplante, cada lisímetro fue abonado con 4 kg/m² de estiércol de oveja. El invernadero disponía de un control automático de humedad relativa por sistema de nebulización.

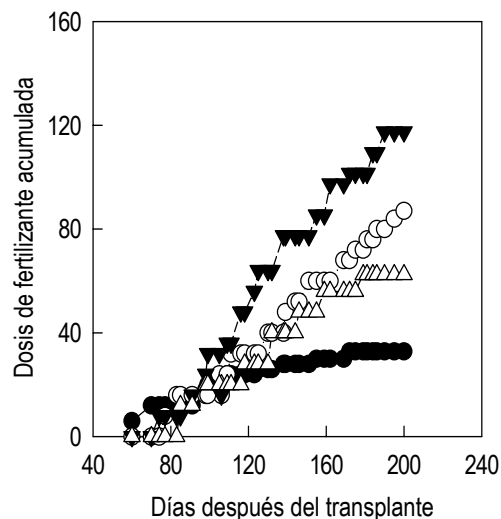


Figura 3.1. Dosis de fertilización acumulada por metro cuadrado en cultivo tradicional de pimiento dulce (●) ácido fosfórico 75% (mL), (○) nitrato cálcico (g), (▼) nitrato potásico (g) y (Δ) sulfato de magnesio (g).

El tratamiento de cultivo tradicional consistió en la aplicación de fertilizantes (Figura 3.1) y productos fitosanitarios sintéticos (Tablas 3.1 y 3.2) desde el momento en que la plaga fue detectada, mientras que al cultivo ecológico solo se le adicionó agua y productos naturales para controlar dichas plagas.

Tabla 3.1. Control químico en cultivo ecológico y tradicional en pimiento dulce.

Días después del trasplante	Cultivo tradicional	Cultivo ecológico
97	Pimetrozina Sales potásicas de ácidos grasos	Sales potásicas de ácidos grasos
104	Azufre	Azufre
132	Abamectina	
147	Abamectina	Azufre
154	Ciproconazol	Azufre
170	Piriproxifen Kresoxim-metil	Azufre
185		Aceite de neem
189	Ciproconazol Azufre	Azufre
197		Aceite de neem
202		Aceite de neem
210		Azufre

Tabla 3.2. Control biológico en cultivo ecológico y tradicional en pimiento dulce.

Días después del trasplante	Cultivo tradicional	Cultivo ecológico
63		<i>Aphidius colemani</i>
69		<i>Amblyseius cucumeris</i> <i>Aphidius colemani</i>
100		<i>Orius laevigatus</i> <i>Aphidius colemani</i>
118		<i>Phytoseiulus persimilis</i> <i>Aphidius colemani</i>
128		<i>Eretmocerus mundus</i> <i>Aphidius colemani</i> <i>Amblyseius californicus</i> <i>Orius laevigatus</i>
149		<i>Phytoseiulus persimilis</i>
154		<i>Aphidius colemani</i> <i>Aphidoletes aphidimyza</i> <i>Phytoseiulus persimilis</i>
163		<i>Phytoseiulus persimilis</i> <i>Amblyseius californicus</i> <i>Orius laevigatus</i>
189	<i>Bacillus thuringiensis</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>
210		<i>Bacillus thuringiensis</i>

3.1.2. Pimiento cultivado con biofertilizantes

Las plantas de pimiento dulce (*Capsicum annuum* L.), cultivo Cierva, tipo California, fueron transplantadas de un vivero a un invernadero ubicado en San Javier (Murcia, España), el día 18 de enero de 2006. El trasplante se realizó en sacos de plástico conteniendo fibra de coco como sustrato (cultivo sin suelo). En cada saco había 3 plantas, cada una de ellas contenía un gotero con un caudal de 4L/h. Las plantas fueron regadas con una solución nutritiva compuesta por los siguientes iones

(mM/L): 12/ NO_3^- , 1,5/ H_2PO_4^- , 3/ SO_4^{2-} , 7/ K^+ , 4,25/ Ca^{2+} , y 2/ Mg^{2+} en el caso del cultivo control, o bien, con una solución nutritiva con bajos niveles de nitrógeno (mM/L): 7/ NO_3^- , 2/ H_2PO_4^- , 4/ SO_4^{2-} , 6/ K^+ , 3,75/ Ca^{2+} , y 1,75/ Mg^{2+} . El porcentaje de drenaje de la disolución nutritiva se mantuvo al 30% para ambos tratamientos en todo el ciclo de cultivo. Como inóculo, se utilizó un preparado comercial (Biopron®), que contiene *Azospirillum brasilense*, cepa M3, y *Pantoea dispersa*, cepa C3, inmovilizados en un soporte sólido, suministrado por Probelte S.A. (Murcia, España). Este producto garantiza y certifica la composición biológica de ambas cepas, con un contenido mínimo de 10^9 ufc/g (ufc: unidades formadoras de colonias). Se aplicó una dosis de Biopron® de 15 g por planta (45 g por saco de sustrato), tres días antes del trasplante.

3.1.3. Pimiento sometido a diferentes concentraciones de estrés salino

Las plantas de pimiento *Capsicum annuum* L., tipo Lamuyo, variedad *Hermínio*, tipo *B₁*, procedentes de un semillero comercial, fueron transplantadas el 28 de diciembre de 2007 a un invernadero localizado en el Centro Integrado de Formación y Experiencias Agrarias (CIFEA) de Torre Pacheco (Murcia).

Se colocaron 3 plantas por cada saco de sustrato (fibra de coco, marca *Cocopeat*) (cultivo sin suelo), que median 1 x 0,16 x 0,18 m. En cada saco se depositaron 3 piquetas con goteros autocompensantes y antidrenantes de 4 L/h de caudal. En el invernadero se dispuso de 3 sectores de riego (S1, S2 y S3), aplicando a cada uno de ellos una disolución nutritiva con diferente concentración de NaCl: 0 mM (S1); 20 mM (S2) y 40 mM (S3).

Las soluciones salinas S1, S2 y S3 se aplicaron a las plantas de pimiento desde un tiempo determinado después del trasplante (DDT) (50, 100 y 150 días) hasta el final del experimento, según el patrón descrito en la **Tabla 3.3**. Este patrón de aplicación dió lugar a un total de 7 tratamientos distintos (T1-T7). Los frutos de pimiento maduros fueron recogidos en tres fechas diferentes (11/04/08, 6/06/08 y 25/07/08), con el fin de poder evaluar el efecto del tiempo que la planta estuvo sometida a cada tratamiento, sobre la calidad de los frutos obtenidos (**Tabla 3.3**).

Tabla 3.3. Planteamiento experimental de las muestras de pimiento (*Capsicum annuum* L., tipo Lamuyo) sometido a diferentes concentraciones de NaCl.

Tratamientos	28/12/07	16/02/08	06/04/08	11/04/08	26/05/08	06/06/08	25/07/08
	Transplante	50 DDT	100 DDT	Recolección	150 DDT	Recolección	Recolección
T1	S1:Control	S1:Control	S1:Control	Sin tratamiento	S1:Control	Sin tratamiento	Sin tratamiento
T2	S1:Control	S2: NaCl 20 mM	S2: NaCl 20 mM	55 días tratamiento	S2: NaCl 20 mM	111 días tratamiento	160 días tratamiento
T3	S1:Control	S1:Control	S2: NaCl 20 mM		S2: NaCl 20 mM	61 días tratamiento	110 días tratamiento
T6	S1:Control	S1:Control	S1:Control		S2: NaCl 20 mM		60 días tratamiento
T4	S1:Control	S3: NaCl 40 mM	S3: NaCl 40 mM	55 días tratamiento	S3: NaCl 40 mM	111 días tratamiento	160 días tratamiento
T5	S1:Control	S1:Control	S3: NaCl 40 mM		S3: NaCl 40 mM	61 días tratamiento	110 días tratamiento
T7	S1:Control	S1:Control	S1:Control		S3: NaCl 40 mM		60 días tratamiento

*DDT: Días después del transplante.

3.1.4. Pimiento conservado en V gama

La denominación de V gama engloba, esencialmente, a las hortalizas cocidas presentadas al vacío y a los platos cocinados, preparados de antemano y listos para calentarlos y consumirlos. También se incluye la V gama de hortalizas, donde tienen cabida todos los productos a base de vegetales que, habiendo sufrido un tratamiento térmico, se les garantiza una conservación mínima de 6 semanas (Tirilly y Bourgeois, 2002). Estos productos están experimentando un creciente desarrollo, ya que responden a las demandas de consumidores e industriales. Son productos listos para el consumo, seguros en el plano microbiológico y satisfactorios en el plano organoléptico.

Entre las hortalizas de V gama más demandadas se encuentra el pimiento, cuyo proceso de elaboración engloba las siguientes tareas: selección de materias primas, elaboración de los productos, evaluación de los factores de penetración de calor, estimación de los datos cinéticos y térmicos, determinación de los parámetros de pasteurización, tiempos, elección de extractos o aditivos y ensayos microbiológicos sobre los productos elaborados.

Dentro de la conserva de pimiento, el producto típico es el asado, cuyo proceso de elaboración consta de las siguientes etapas: asado y pelado químico, descorazado (eliminación de placenta y semillas), cortado en tiras, enlatado en su jugo, pasteurizado y enfriado.

3.1.4.1. Descripción del proceso

El pimiento asado en tiras fue suministrado por una empresa de la Región de Murcia. Tras las etapas de pelado y descorazado, se envasó en bandejas de plástico. Posteriormente fue esterilizado en autoclave con sobrepresión y enfriando con agua. El pH del pimiento fue 4,8 y el del líquido de gobierno 2,56. Se llenaron las bandejas con un peso medio de pimiento de 320 g y se les añadió el líquido de gobierno a 95 °C, hasta un peso neto medio de 427 g. Las bandejas se termosellaron aplicando un vacío de -0,55 bares y se esterilizaron en un autoclave estático provisto de un sistema de duchas de agua caliente, a una temperatura de 98 °C y 0,8 bares de presión total. En una de las bandejas, se introdujo una sonda que nos indicó la temperatura en el

interior de la bandeja durante todo el proceso de esterilización y enfriamiento, que se llevó a cabo por un sistema de duchas de agua fría.

Para poder evaluar el efecto de las ciclodextrinas (CDs) en la estabilización de las características organolépticas del producto, se elaboraron dos tipos de muestras:

- pimienta en su jugo: con un 5 % de ácido cítrico en el líquido de gobierno.
- pimienta en su jugo con β -CDs: el líquido de gobierno contenía, además del ácido cítrico, un 1% de β -CDs.

Una vez elaboradas las barquetas, en presencia y ausencia del 1% de β -CDs, se almacenaron a diferentes temperaturas: 4, 25 y 50 °C (18 barquetas por temperatura de almacenamiento y tipo de muestra). El tiempo de almacenamiento fue de 5 meses, analizándose las barquetas cada mes (por triplicado) hasta el final del ensayo.

Para su análisis, las barquetas fueron abiertas y su contenido (pimienta + líquido de gobierno) se homogeneizó durante 1 min en un Ultra Turrax (Ika, Staufen, Germany). Ese homogenizado se filtró y se utilizó para analizar: compuestos fenólicos, vitamina C, capacidad antioxidante y color.

3.2. REACTIVOS

Los reactivos químicos fueron suministrados por Sigma (Madrid, España). El Triton X-114 se obtuvo de Fluka y se preparó al 25% (p/v) en tampón fosfato sódico 100 mM, pH 7,3, antes de ser utilizado.

Las soluciones de peróxido de hidrógeno se prepararon diariamente, y su concentración se calculó mediante la ley de Lambert Beer, utilizando como coeficiente de extinción molar $\epsilon_{240} = 39,4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Nelson y Kiesow, 1972).

El preparado comercial Biopron[®], fue suministrado por Probelte S.A. (Murcia, España).

Las β -ciclodextrinas fueron adquiridas a TCI Europa N.V. (Zwijndrecht, Bélgica).

3.3. DETERMINACIÓN DE NITRÓGENO TOTAL (N_{TOTAL})

La determinación de N_{total} se realizó mediante el método Dumas, mediante la combustión de la muestra en un analizador LECO FP-528 (*Leco Corporation, St Joseph, MI. U.S.A.*).

Este método consiste en el análisis por combustión de la materia seca del material vegetal. Las muestras de pimiento molido se colocaron en una estufa a 70 °C, al menos 3 días, antes de su análisis. En una cápsula de papel filtro, se pesaron, aproximadamente entre 0,3 y 0,35 g de muestra, que posteriormente se prensaron mediante un prensador hidráulico, y se introdujeron en un carrusel metálico "auto-sampler". El carrusel se colocó en su lugar correspondiente y una vez conectado el aparato, este fue girando hasta dejar caer cada muestra para ser incinerada.

Este método determina cuantitativamente la cantidad de N_{total} en material vegetal usando un horno de inducción y un detector de conductividad térmica. Las muestras se incineraron a aproximadamente 850 °C, con helio. El método tiene un límite de detección de 0,01% de nitrógeno (base seca).

3.4. FIRMEZA DEL FRUTO

La firmeza del fruto fue determinada sobre la piel del mismo, utilizando un penetrómetro FT011 Bertuzzi, equipado con una sonda de 8 mm de diámetro.

3.5. DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS ORGÁNICOS

La concentración de ácidos orgánicos fue determinada en el zumo de pimiento. Para ello 6 frutos fueron cortados y licuados. El licuado se centrifugó a 12.857 \times g durante 20 min a 5 °C. El sobrenadante se filtró a través de un filtro de nylon de 0,45 μ m y se utilizó para la determinación de ácidos orgánicos mediante HPLC (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA). Para ello, se inyectaron 10 μ L de extracto a 30 °C, en una columna Supelcogel C610H (30 cm \times 7,8 mm) protegida con una precolumna Supercogel C610H (5 cm \times 4,6 mm) (Supelco, Inc., Bellefonte, PA). La detección se realizó a 210 nm, utilizando un detector UV HP 1100. La fase móvil

estaba compuesta por ácido fosfórico al 0,1% y la velocidad de flujo fue de 0,5 mL/min. El tiempo empleado por muestra fue de 40 min.

3.6. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS Y FENOLES TOTALES

La concentración de proteínas y fenoles también se determinó en el zumo de pimiento, obtenido tal y como se ha descrito en el apartado anterior (3.5).

3.6.1. Proteínas

La concentración de proteínas fue determinada mediante el método de Bradford (1976), utilizando suero de albúmina bovina (BSA) como patrón.

Este método está basado en la unión entre el colorante azul brillante de Coomassie G-250 y las proteínas, pasando de color rojo a color azul (Reisner *y col.*, 1975). El complejo proteína-colorante tiene una gran absorción a 595 nm, alcanzando así una gran sensibilidad en la detección de proteínas. Es una técnica muy rápida (aproximadamente 5 min), permitiendo así un gran ahorro de tiempo, con respecto a otros métodos de valoración de proteínas.

Las muestras, incluyendo los patrones de BSA, fueron diluídas con agua destilada hasta un volumen de 100 μ L, posteriormente, se añadió a cada tubo 5 mL del reactivo de Bradford, con fenol al 0,5% (v/v), para evitar interferencias con los compuestos fenólicos de la muestra. Seguidamente se enrasan los tubos hasta 10 mL con agua destilada y se agitaron.

La absorbancia a 595 nm de los tubos patrón y las muestras, fue medida en cubetas de 1 mL frente a un blanco que contenía los anteriores reactivos, pero sin proteínas, en un tiempo comprendido entre 5 y 15 min después de haber agitado bien los tubos. La absorbancia de los tubos con BSA fue representada frente a la concentración de albúmina, obteniendo así la recta patrón que posteriormente fue usada para extrapolar la concentración de proteínas de las muestras (Figura 3.2).

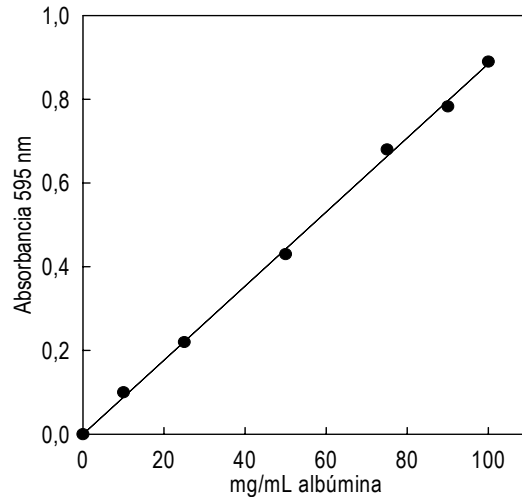


Figura 3.2. *Recta patrón para la cuantificación de proteínas en muestras de pimienta. Se utilizó BSA como estándar.*

3.6.2. Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos fueron determinados mediante el método de Folin-Denis (Kidron *y col.*, 1978), en presencia de Na_2CO_3 . Las muestras fueron preparadas añadiendo 250 μL de muestra, 1,25 mL de reactivo de Folin, 3,75 mL de Na_2CO_3 al 20% (p/v) y agua destilada hasta un volumen final de 25 mL. Tras incubarlas 2 h a 25 $^\circ\text{C}$, se midió la absorbancia a 765 nm, frente a un blanco que contenía los anteriores reactivos, pero sustituyendo la muestra por agua destilada. Los valores de absorbancia fueron extrapolados a mg/mL de ácido gálico a partir de una recta de calibrado realizada con concentraciones crecientes de dicho ácido, comprendidas entre 0 - 1,6 mg/mL (**Figura 3.3**).

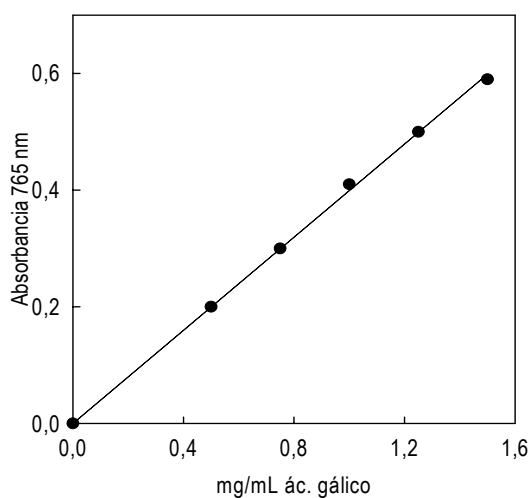


Figura 3.3. *Recta patrón para la cuantificación de compuestos fenólicos en muestras de pimienta. Se utilizó ácido gálico como estándar.*

3.7. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE MEDIANTE EL MÉTODO ORAC- FLUORESCÉINA (ORAC-FL)

Con este ensayo se mide la degradación oxidativa de la FL tras la mezcla con el radical 2, dihidrocloruro 2'- diazobis (2-aminopropano) (AAPH).

La solución stock de FL (4 μ M) fue preparada en tampón fosfato sódico 75 mM, pH 7,4, conservándola a -20 °C durante un máximo de cuatro semanas. A partir de este stock de FL, se prepararon disoluciones diarias de trabajo a una concentración final de 6 nM.

La concentración de la disolución stock de ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox C) utilizada para la elaboración de la recta patrón fue de 0,25 mM.

La disolución stock de AAPH, 127 mM, se preparó diariamente en tampón fosfato sódico 75 mM, pH 7,4.

Las determinaciones se realizaron en un lector de microplacas Synergy HT multi-detec microplate reader de biotek Instruments, Inc. (Winooski, VT, USA).

Se emplearon microplacas de 96 pocillos de poliestireno negro con el fondo transparente, de Nalge Nunc Internacional (Roskilde, Denmark). La fluorescencia se leyó por la parte inferior de la placa a una longitud de onda de excitación de 485/20

nm, utilizando un filtro de emisión de 528/20 nm. El detector de placas se controló mediante el software KC4, versión 3.4.

La capacidad de absorción del radical se determinó por el método descrito por Dávalos *et al.*, con algunas modificaciones. El volumen final de cada pocillo fue de 200 μL ; 100 μL de FL (con una concentración final de 3 nM), de 0 a 70 μL de muestra, 30 μL de AAPH (con una concentración final de 19 mM) y el resto, hasta completar los 200 μL , de tampón fostato sódico, 75 mM, pH 7,4.

La mezcla de reactivos en ausencia del AAPH se incubó a 37 °C durante 30 min, dispensando inmediatamente después la solución del radical, usando para ello una pipeta multicanal. La microplaca se introdujo en el lector, y se midió la fluorescencia cada 1'14", durante 120', agitándose automáticamente en cada medida. Se realizó un blanco que contenía FL y AAPH, usando tampón fosfato sódico en lugar de muestra antioxidante y 8 soluciones de concentraciones crecientes de Trolox C (compuesto antioxidante de referencia) para obtener la recta de calibrado (6,25 - 31,25 μM) (**Figura 3.4.A**).

Todas las medidas se realizaron por triplicado. Para evitar posibles efectos adversos por aumento de la temperatura, sólo se utilizaron los 60 pocillos interiores de la placa, dejando los exteriores con 200 μL de agua destilada. Los resultados fueron expresados como fluorescencia relativa con respecto a la lectura inicial. El área bajo la curva de FL (AUC) fue calculada mediante la ecuación:

$$AUC = 1 + \sum_{i=1.14}^{i=120} f_i / f_0$$

Donde f_0 es la lectura de la FL inicial a 0 min y f_i es la lectura de la FL a tiempo i . El net AUC de cada muestra se obtuvo restándole al AUC correspondiente el AUC del blanco. Los resultados de actividad antioxidante fueron expresados como μmoles de Trolox C por g de muestra.

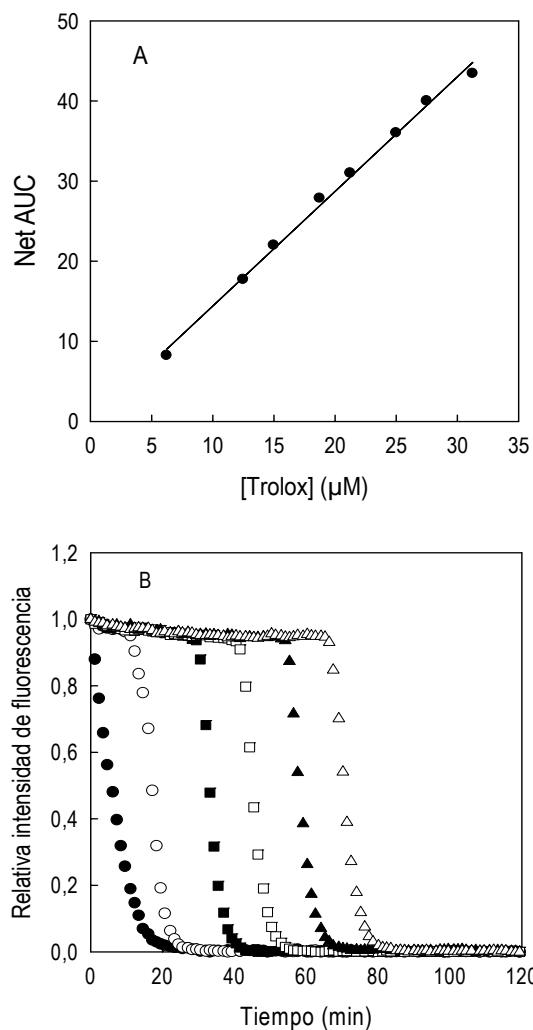


Figura 3.4. (A) *Recta de regresión del net AUC con diferentes concentraciones de Trolox C.* $NET\ AUC = AUC_{muestra} - AUC_{blanco}$. (B) *Curva de caída de la FL inducida por AAPH en presencia de concentraciones crecientes de Trolox C.*

3.8. EXTRACCIÓN Y DETERMINACIÓN DE CAROTENOS TOTALES

Como método de extracción se utilizó el propuesto por Almela *y col.*, en 1991, con pequeñas modificaciones.

Se homogeneizaron 0,5 g de pimiento deshidratado con 50 mL de disolvente orgánico (hexano/acetona/etanol, 50:25:25 v/v). El homogenado se centrifugó durante 5 min a 5.054 \times g, a una temperatura de 5 °C. La capa superior de hexano, coloreada, fue recuperada y enrasada hasta 25 mL con el mismo disolvente orgánico.

Para analizar el contenido total de carotenos, 1 mL de muestra se diluyó en proporción 1:1 (v:v) con hexano y se determinó la absorbancia de la mezcla a 450 nm, utilizando como estándar β -caroteno comercial (**Figura 3.5**).

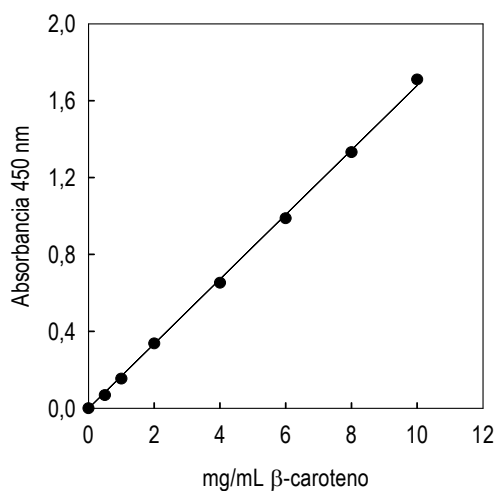


Figura 3.5. Recta patrón para la cuantificación de carotenos totales en muestras de pimiento. Se utilizó β -caroteno como estándar.

3.9. MEDIDAS DE COLOR

Las medidas de color se determinaron sobre zumo de pimiento, obtenido tal y como se describe en la sección 3.5. En este caso, el licuado se pasó a través de un tamiz de 45 μ m.

Las medidas de color, como coordenadas CIELab, (L^* , a^* y b^*), se realizaron en un colorímetro Hunterlab Colorflex® (Hunterlab, Reston, Virginia, U.S.A).

El parámetro L^* indica luminosidad y los parámetros a^* y b^* son las coordenadas de cromaticidad, verde-rojo y azul-amarillo, respectivamente. L^* es una medida aproximada de luminosidad, que es la propiedad según la cual cada color puede ser considerado como equivalente a un miembro de la escala de grises, entre

negro y blanco, tomando valores dentro del rango 0 (negro) - 100 (blanco). El parámetro a^* toma valores positivos para los colores rojizos y negativos para los verdosos, mientras que b^* toma valores positivos para los colores amarillentos y negativos para los azulados (Pérez-López *y col.*, 2007).

El parámetro C^* es el croma [$C^* = \sqrt{(a^{*2}) + (b^{*2})}$], siendo 0 en el centro de una esfera de color y aumenta, según lo hace la distancia del centro. Finalmente, el ángulo HUE, es el ángulo matiz $h_{ab} = \text{arc tg} \left(\frac{b^*}{a^*} \right)$ expresado en grados. Se define como inicio en el eje $+a^*$; 0° sería (rojo), 90° $+b^*$ (amarillo), 180° $-a^*$ (verde) y 270° $-b^*$ (azul). El valor ΔE representa la correlación espacial de los valores a^* , b^* y L^* en la esfera CIELab expresada como $\Delta E = \left[(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2 \right]^{1/2}$ (McGuire, 1992) (Figura 3.6).

Los análisis se realizaron por triplicado.

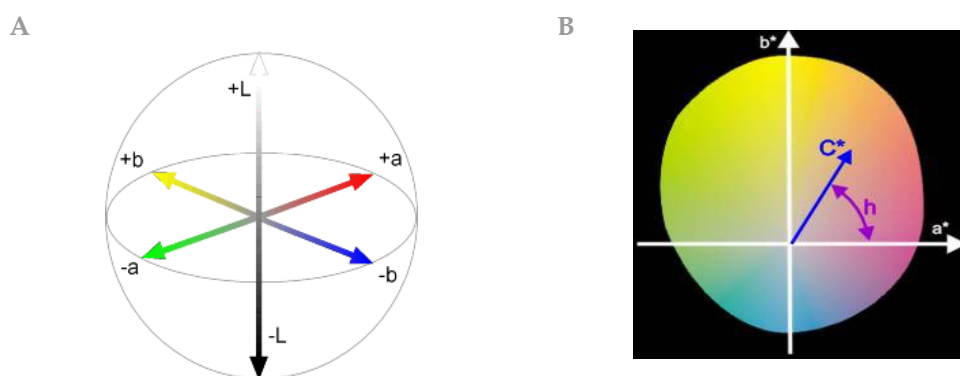


Figura 3.6. *Parámetros de color CIELab: A) Representación tridimensional de los parámetros cromáticos y B) Coordenadas de color CIELab en el plano.*

3.10. DETERMINACIÓN DE ÁCIDO ASCÓRBICO

Las muestras de pimienta (10 g), se mezclaron con 50 mL de agua desionizada y se homogeneizaron en un Ultra Turrax (Ika, Staufen, Germany) durante 5 min. Se pesaron 5 g del homogenado, adicionando 25 mL de la solución extrantante (metafosfórico al 0,5%). A continuación se agitaron en oscuridad durante 20 min, pasando finalmente por un filtro de $0,45 \mu\text{m}$.

La determinación de vitamina C fue llevada a cabo mediante HPLC (Merck–Hitachi, Darmstad, Germany) usando una columna C-18 de fase reversa LiChrospher 100 RP-18 LichroCART 205-4 HPLC-Cartridge con un tamaño de partícula de 5 μm . Se midieron a 245 nm, utilizando un detector de diodos Shimadzu SPD-M6A UV (Shimadzu, Kyoto, Japan). La fase móvil estaba compuesta por: agua:metanol:tampón acetato:dimetilhexilamina en una proporción 94,5:4:1,5:0,15 (v:v:v:v). La velocidad de flujo fue de 1 mL/min. La linealidad de la recta patrón fue comprobada en un rango de concentraciones de ácido ascórbico desde 0,005 a 0,16 mg/mL (**Figura 3.7**). Todas las muestras se analizaron por triplicado.

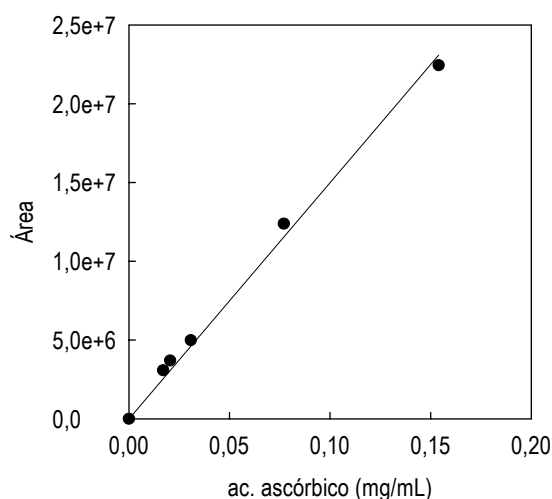


Figura 3.7. Recta patrón para la cuantificación de ácido ascórbico en muestras de pimienta. Se utilizó ácido ascórbico como estándar.

3.11. EXTRACCIÓN DE PEROXIDASA (POD) DE PIMIENTO

La POD de pimienta fue extraída y parcialmente purificada usando el método descrito por Núñez-Delgado *y col.*, 2003, con algunas modificaciones.

Se pesaron 50 g de material vegetal y fue homogeneizado con 100 mL de tampón fosfato sódico 100 mM, pH 7,3 en un Ultra Turrax (Ika, Staufen, Germany). Este homogenado se filtró a través de 4 capas de gasa y, posteriormente fue sometido a separación de fases inducida por temperatura mediante la adición de Triton X-114 a

4 °C, hasta tener una concentración final de detergente del 4% (p/v). La mezcla se mantuvo a 4 °C durante 15 min y, posteriormente, se calentó a 37 °C durante el mismo periodo de tiempo. En este punto del ensayo, la disolución adquiere turbidez debido a la formación, agregación y precipitación de micelas de detergente, conteniendo proteínas hidrofóbicas y compuestos fenólicos.

Esta disolución turbia se centrifugó a 10.000 xg durante 15 min, a 25 °C. Después de desechar el pellet y la fase rica en detergente, el sobrenadante (fase pobre en detergente), conteniendo POD de pimiento, se llevó al 30 % de saturación con sulfato amónico, y se mantuvo en agitación continua a 4 °C durante 1h. Pasado este tiempo, la disolución se centrifugó a 60.000 xg durante 30 min a 4 °C y el pellet fue eliminado. Al sobrenadante se le añadió sulfato amónico para conseguir un 80% de saturación, agitando durante 1h a 4 °C. Tras centrifugar 30 min a 60.000 xg, el precipitado obtenido se disolvió en un volumen mínimo de tampón fosfato sódico 100 mM, pH 7,3.

El contenido final de sal fue eliminado por diálisis y finalmente la enzima se almacenó a -20 °C.

3.12. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

La actividad de POD fue determinada espectofotométricamente, en un espectrofómetro Shimadzu modelo UV-1063, usando como sustrato [ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina)-6-sulfónico] ABTS, a 414 nm ($\epsilon_{414} = 31,1 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) (Rodríguez-López *et al.*, 2000). Una unidad enzimática es la cantidad de enzima que produce 1 μmol del radical ABTS^{\bullet} por minuto.

El medio de reacción estándar a 25 °C contenía, en tampón citrato sódico 50 mM, pH 4,5, 1 ng/mL de POD de pimiento parcialmente purificada, 1 mM de ABTS, 6 mM de H_2O_2 y 0,2 mM de Tropolona en un volumen final de 1 mL.

3.13. ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA

La electroforesis nativa en gel de poliacrilamida se realizó según el método descrito por Angleton and Flurkey (1984). Se llevó a cabo con un 8% de acrilamida en

el gel. Las muestras fueron diluidas 1:1 con tampón de muestra, que contenía glicerol al 10%, azul de bromofenol al 0,01% y Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8. Las muestras no fueron desnaturalizadas por calor antes de ser aplicadas sobre el gel. La electroforesis en gel de poliacrilamida fue realizada a temperatura ambiente en una cubeta Mini PROTEAN II de Bio-Rad, conectada a una fuente de electroforesis (Bio-Rad). Se llevó a cabo a 180 V y la duración de ésta, bajo las condiciones ya mencionadas, fue aproximadamente de 60 min. Para determinar la actividad POD, los geles se tiñieron con 100 mL de tampón acetato sódico 50 mM, pH 5,0, que contenía 0,45 mM de H₂O₂ y 1 mM de 4-metoxi- α -naftol (4MN).

3.14. ESTABILIDAD TÉRMICA

Para estudiar la estabilidad térmica de POD de pimiento, se incubaron alícuotas de los extractos enzimáticos, a diferentes temperaturas, (30, 40, 50 y 60 °C) en un baño termostatzado durante un tiempo determinado. Posteriormente se enfriaron en hielo a 4 °C y se analizaron inmediatamente después a 25 °C.

3.15. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Todos los datos se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) y a un test multivariante Tukey, que se utilizó para determinar las diferencias significativas entre los distintos tipos de cultivo de pimiento. La interpretación de los resultados se representó con $p \leq 0,05$. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el soporte informático SPSS 12.0 (SPSS Ciencias, Chicago, USA). En el caso de actividad POD, los datos experimentales representan la media de al menos 3 determinaciones independientes, cada una de las cuales se realizó por duplicado. Para realizar el ajuste de los datos se utilizó el programa Sigmaplot 9.0 software package (Jandel Scientific, Germany).

CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. COMPARACIÓN DE DIFERENTES PARÁMETROS DE CALIDAD EN PIMIENTO CULTIVADO BAJO SISTEMA DE PRODUCCIÓN ECOLÓGICA Y TRADICIONAL: CONTENIDO EN PROTEÍNAS, COMPUESTOS FENÓLICOS, VITAMINA C, ACTIVIDAD POD, CAROTENOS Y COLOR.

4.1.1. Contenido en proteínas

El valor proteico de un alimento corresponde a su capacidad para satisfacer las necesidades del consumidor en nitrógeno y aminoácidos y asegurar así un crecimiento y mantenimiento convenientes.

La determinación del contenido en proteínas de pimiento, se llevó a cabo utilizando el método Bradford, (ver sección 3.6.1 de Materiales y Métodos). Se comparó el contenido en proteínas de pimiento ecológico y tradicional en dos estadios de maduración (verde y rojo), con el fin de estudiar el efecto de la maduración y el tipo de cultivo en el contenido proteico del pimiento.

Como se observa en la **Figura 4.1**, el contenido proteico aumentó con la maduración, mostrando aproximadamente el doble contenido en proteínas en el estadio de maduración rojo que en el verde. Este patrón se repitió en los dos sistemas de cultivo estudiados: ecológico y tradicional.

Son escasos los trabajos dedicados al estudio de la evolución del contenido en proteínas con la maduración en vegetales. Los resultados obtenidos para pimiento fueron similares a los descritos para níspero, en cuyo caso la cantidad de proteínas aumentó también considerablemente con la maduración del fruto (Aydin y Kadioglu, 2001).

El tipo de cultivo, es otro de los factores que pueden afectar al contenido proteico en frutas y verduras (Delgado *y col.*, 2004; Anttonen y Karjalainen, 2006). En nuestro caso, el pimiento cultivado bajo sistema de producción ecológico (**Figura 4.1**, barras verdes oscuras), no mostró diferencias significativas ($p \leq 0,05$) respecto al contenido proteico del pimiento cultivado bajo sistema de producción tradicional (**Figura 4.1**, barras verdes claras), en los dos estadios de maduración estudiados. Sin embargo, se observó una tendencia al alza en el contenido proteico en pimiento ecológico respecto al tradicional.

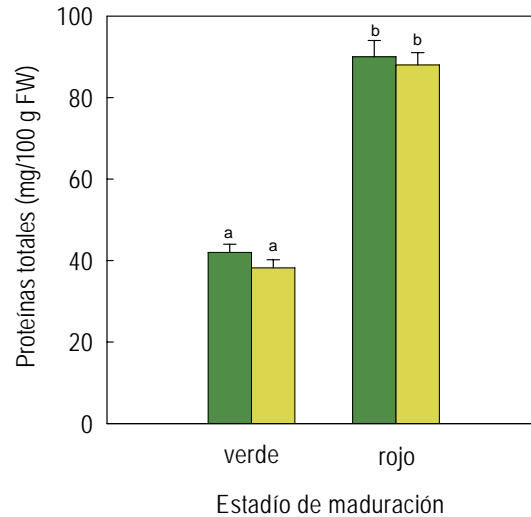


Figura 4.1. Contenido proteico (mg/100 g FW) en pimiento cultivado bajo sistema de producción tradicional (barras verdes claras) y ecológico (barras verdes oscuras).

4.1.2. Contenido en compuestos fenólicos

El nivel de compuestos fenólicos en alimentos de origen vegetal es importante, ya que intervienen no solo en su calidad nutricional, sino que también contribuyen a darle sus propiedades organolépticas y sensoriales, como el color y el flavor (Lancaster, 1992; Iglesias *y col.*, 1999). La utilización de pesticidas y fertilizantes químicos modulan la naturaleza y concentración de compuestos fenólicos sintetizados en vegetales (Daniel *y col.*, 1999; Carbonaro y Mattera, 2001). Por otra parte, también el estadio de maduración afecta a la concentración de compuestos fenólicos (Serrano-Megías *y col.*, 2006), ya que estos niveles vienen determinados por la edad fisiológica de la planta y las situaciones de estrés a las que haya estado sometida. También es importante tener en cuenta sus posibles efectos beneficiosos para la salud del consumidor, relacionados con su capacidad antioxidante y su función como atrapadores de radicales libres (Hergtog *y col.*, 1992a; Hergtog *y col.*, 1993; Keli *y col.*, 1996; Knekt *y col.*, 1996; Rimm *y col.*, 1996).

En este trabajo, se comparó el nivel de compuestos fenólicos de pimiento ecológico y tradicional en dos estadios de maduración: verde y rojo. Como se observa en la **Figura 4.2**, el contenido en compuestos fenólicos, de pimiento verde, fue significativamente menor ($p \leq 0,05$) que el de pimiento rojo, en ambos tipos de cultivo, tradicional (**Figura 4.2**, barras verdes claras) y ecológico (**Figura 4.2**, barras verdes oscuras). Este resultado indicó un incremento en el contenido de compuestos fenólicos con la maduración del pimiento, independientemente del sistema de producción utilizado para su cultivo, estos resultados son similares a los descritos en la bibliografía para algunas variedades de pimiento (Marín *y col.*, 2004).

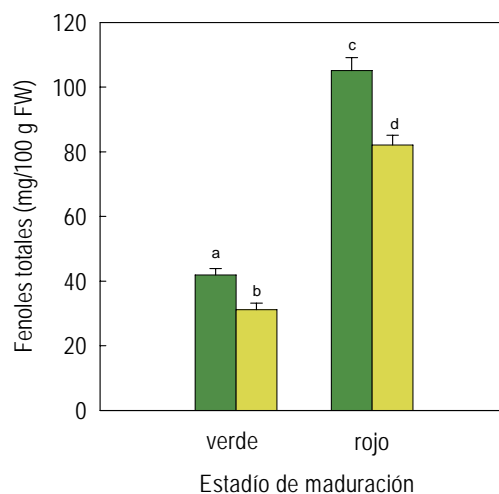


Figura 4.2. *Compuestos fenólicos (mg/100 g FW) en pimiento cultivado bajo sistema de producción tradicional (barras verdes claras) y ecológico (barras verdes oscuras).*

Estos resultados concuerdan con los descritos para otras variedades de pimiento dulce (Howard *y col.*, 2000), en los que el nivel de compuestos fenólicos aumentó con la maduración. Sin embargo, contrastan con los obtenidos para pimiento de padrón (Estrada *y col.*, 2000), y uva (Sánchez-Ferrer *y col.*, 1989) en los que el nivel de compuestos fenólicos desciende con la maduración del fruto.

El tipo de cultivo, también puede afectar al contenido en compuestos fenólicos de frutas y verduras (Delgado *y col.*, 2004; Anttonen y Karjalainen, 2006). El pimiento cultivado bajo sistema de producción ecológico (**Figura 4.2**, barras verdes

oscuras), mostró un mayor contenido en compuestos fenólicos ($p \leq 0,05$) que el cultivado bajo sistema de producción tradicional (**Figura 4.2**, barras verdes claras), en los dos estadíos de maduración estudiados.

Los resultados obtenidos para pimiento concuerdan con los descritos en alimentos de origen vegetal como: maíz (Asami *y col.*, 2003), fresa (Häkkinen y Törrönen, 2000), frambuesa (Howard *y col.*, 2003), melocotón y pera (Carbonaro *y col.*, 2002). Sin embargo, contrastan con los obtenidos para pasas negras (Anttonen y Karjalainen, 2006), ciruelas amarillas (Lombardi-Boccia *y col.*, 2004) y lechuga (Young *y col.*, 2005), en cuyos casos, los cultivos ecológicos mostraron niveles de compuestos fenólicos inferiores a los cultivos tradicionales.

El tipo de fertilización puede explicar las diferencias obtenidas en el contenido en compuestos fenólicos entre cultivo ecológico y tradicional por dos motivos: en primer lugar, en el cultivo ecológico los nutrientes son suministrados a través de una rotación de cultivo, estiércol o subproductos vegetales. El nitrógeno orgánico es transformado en inorgánico por la microflora del suelo; por lo que es difícil de controlar la disponibilidad de los nutrientes para la planta. Recientemente se ha demostrado que una menor disponibilidad de nitrógeno conduce a un incremento en la síntesis de fenilpropanoides (Fritz *y col.*, 2006). En segundo lugar, estos resultados pueden ser explicados ya que en el sistema de producción ecológico la planta no ha sido tratada con pesticidas sintéticos para controlar las plagas, por lo tanto, la síntesis de fenoles aparece como respuesta al ataque por patógenos (Carbonaro *y col.*, 2002; Howard *y col.*, 2003).

4.1.3. Contenido en vitamina C

El nivel de vitamina C en vegetales depende de diferentes factores, entre los que se incluyen: variedad, tipo de cultivo y estadío de maduración (Lee y Kader, 2000; Howard *y col.*, 2002; Tudela *y col.*, 2002). En este trabajo se determinó el contenido en vitamina C en pimiento cultivado bajo sistema de producción ecológico y tradicional en dos estadíos de maduración: verde y rojo. El nivel de vitamina C determinado en pimiento, estuvo en el rango descrito en la bibliografía (63-243 mg/100 g FW) (Zapata y Dufour, 1992; Howard *y col.*, 2000; Tadesse *y col.*, 2002) (**Tabla 4.1**).

Tabla 4.1. Cambios en el contenido en vitamina C durante la maduración de pimiento dulce (*Capsicum annuum* L., cultivo Almuden) cultivado bajo sistema de producción ecológico y tradicional.

Tipo de cultivo	Estadío de maduración	Vitamina C (mg/100 g FW)
Ecológico	verde	100,13 ^b ±2,12
	rojo	148,85 ^d ±2,41
Tradicional	verde	77,96 ^a ±1,73
	rojo	120,65 ^c ±1,82

Los valores de la tabla son la media de 3 repeticiones. Los datos que aparecen con las mismas letras no mostraron diferencias significativas $p \leq 0,05$ para el atributo evaluado (Test Tukey).

El análisis de vitamina C en pimiento por HPLC, mostró un aumento en la concentración de esta vitamina con la maduración, en los dos sistemas de producción estudiados (Tabla 4.1). En el caso de pimiento cultivado bajo sistema de producción ecológico, el contenido en vitamina C aumentó de 100,13 ± 2,12 mg/100 g FW para pimiento verde a 148,85 ± 2,41 mg/100 g FW para pimiento rojo, lo que supone un aumento del 50% en el contenido de vitamina C.

En el caso de pimiento cultivado bajo sistema de producción tradicional el contenido en vitamina C aumentó de 77,96 ± 1,73 mg/100 g FW para pimiento verde a 120,65 ± 1,82 mg/100 g FW para pimiento rojo. En ambos casos (ecológico y tradicional) el aumento del contenido en vitamina C fue del 50% al pasar del estadio de maduración de verde a rojo.

Estos resultados están de acuerdo con los descritos anteriormente para otras variedades de pimiento (Howard *y col.*, 1994; Osuna-García *y col.*, 1998; Howard *y col.*, 2000; Marín *y col.*, 2004). Este incremento puede estar asociado con el papel del ascorbato como agente fotoprotector (Smirnoff y Wheeler, 2000), ya que la cantidad e intensidad de luz durante el crecimiento influye en el nivel de ácido ascórbico del fruto (Lee y Kader, 2000). La mayor cantidad de horas de exposición a la luz, podría explicar el aumento en el contenido de ácido ascórbico de pimiento rojo frente a pimiento verde, es decir, el aumento del contenido en vitamina C con la maduración (Tabla 4.1).

Los resultados obtenidos para pimiento cultivado bajo sistema de producción tradicional son similares a los descritos para pimiento cultivo Vergasa (Marín *y col.*, 2004) y tomate (Yahia *y col.*, 2001).

Por otra parte, también se comparó el contenido en vitamina C de pimiento cultivado bajo sistema de producción ecológico y tradicional, con el fin de determinar si el sistema de producción influye en dicho parámetro (**Tabla 4.1**). Como se observa en la **tabla 4.1**, el nivel de vitamina C en pimientos cultivados bajo sistema de producción ecológico fue más alto que el encontrado en pimientos cultivados bajo sistema de producción tradicional, en los dos estadios de maduración estudiados. Así, en el caso de pimiento verde, el contenido en vitamina C fue un 22% más alto para pimiento cultivado bajo sistema de producción ecológico que para el cultivado bajo sistema de producción tradicional y en el caso de pimiento rojo, el contenido en vitamina C fue un 19% más alto para pimiento cultivado bajo sistema de producción ecológico que para el cultivado bajo sistema de producción tradicional. Estos resultados son similares a los descritos para fresa y maíz (Wang *y col.*, 1996).

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, podemos concluir que tanto el estadio de maduración, como el sistema de cultivo, afectan a los niveles de vitamina C en pimiento.

4.1.4. Actividad POD

Peroxidasa, es una enzima oxidativa que cataliza la oxidación de compuestos fenólicos en presencia de H_2O_2 (Dunford y Stillman, 1997). Está implicada en diferentes procesos fisiológicos como la oxidación de compuestos fenólicos, lignificación como respuesta ante el ataque por patógenos (Ray *y col.*, 1998), catabolismo de auxinas, reacciones de detoxificación de H_2O_2 y metabolismo de capsaicinas (Gaspar *y col.*, 1985; Bernal *y col.*, 1993a; Bernal *y col.*, 1993b; Bernal *y col.*, 1995). Un aumento de la actividad POD en los tejidos vegetales está asociado a un proceso de resistencia por parte de la planta (Breusegem *y col.*, 2001). La actividad de POD también ha sido asociada con el metabolismo de la avenantramida (fitoalexina presente en hojas de avena infectadas con hongos) observándose un aumento de la actividad POD en plantas infectadas. Esta inducción de la actividad POD está descrita en muchas especies vegetales, como maíz (Cadena-Gómez y Nicholson, 1987), trigo

(Flott *y col.*, 1989), cebada (Kerby y Somerville, 1989), arroz (Chittoor *y col.*, 1997), semillas de soja (Graham y Graham, 1991) y pimiento (Alcaraz *y col.*, 1995).

En este trabajo, se estudiaron los niveles de actividad POD en pimiento dulce cultivado bajo sistema de producción ecológico y tradicional, para dos estadios de maduración, verde y rojo. La enzima fue parcialmente purificada mediante el método descrito por Núñez-Delgado *y col.*, en 2003, con algunas modificaciones. El método consistió en la combinación de partición de fases con Triton X-114 y el fraccionamiento con sulfato amónico entre el 30 y el 80%. La enzima obtenida apareció como una sola banda electroforética para pimiento verde cuando se utilizó 4MN como sustrato (**Figura 4.3, A y C**), independientemente del sistema de cultivo utilizado. Sin embargo, en el caso del pimiento rojo, la enzima obtenida apareció como una doble banda electroforética en ambos tipos de cultivo (**Figura 4.3, B y D**).

Los resultados presentados en la **Figura 4.3**, muestran que el tipo de agricultura ecológica o tradicional no afecta a la forma isoenzimática de POD sintetizada en los diferentes estadios de maduración de pimiento estudiados. Existe una banda electroforética de POD en el estadio de maduración rojo (**Figura 4.3, B y D**), que está ausente en el estadio de maduración verde (**Figura 4.3, A y C**), para ambos tipos de cultivo, ecológico y tradicional.

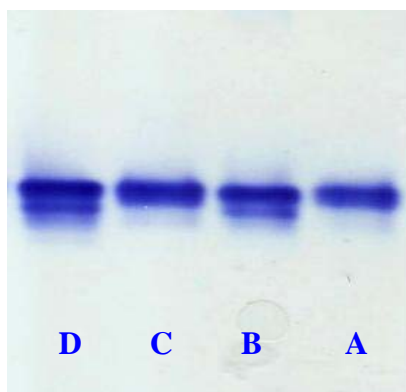


Figura 4.3. *Electroforesis en gel de poliacrilamida, al 8%. Teñido con 0,45 mM de H₂O₂ y 1 mM de 4-metoxi- α -naftol (4MN) en 50 mM de tampón acetato sódico pH 5,0. (A) POD de pimiento verde tradicional, (B) POD de pimiento rojo tradicional, (C) POD de pimiento verde ecológico y (D) POD de pimiento rojo ecológico.*

Estos resultados indicaron que la actividad POD está correlacionada con el proceso de maduración del pimiento, ya que aparece una nueva banda isoenzimática cuando el pimiento cambia de verde a rojo, a pesar del descenso observado en la actividad específica de la enzima (**Figura 4.4**).

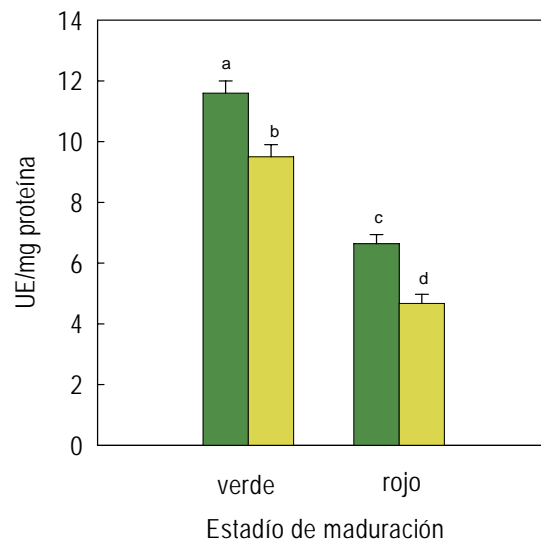


Figura 4.4. *Actividad específica de POD de pimiento cultivado bajo sistema de producción tradicional (barras verdes claras) y pimiento cultivado bajo sistema de producción ecológico (barras verdes oscuras). El medio de reacción a 25 °C contenía en tampón citrato sódico 50 mM pH 4,5, 1 ng/mL de POD parcialmente purificada, 1 mM de ABTS, 6 mM de H₂O₂ y 0,2 mM de Tropolona.*

La disminución en los niveles de actividad específica de POD con la maduración del pimiento puede estar relacionado con el aumento de carotenoides y compuestos fenólicos (Kanner y Mendel, 1977; Zorn *y col.*, 2003) en el paso de verde a rojo ya que esta enzima está implicada en el metabolismo de dichos compuestos.

El tipo de cultivo puede influir en los niveles de enzimas oxidativas tales como PPO (Núñez-Delicado *y col.*, 2005). Los niveles de actividad específica para POD observados en el caso de pimiento cultivado bajo sistema de producción ecológico (**Figura 4.4**, barras verdes oscuras), fueron significativamente mayores ($p \leq 0,05$) que en el caso de pimiento cultivado bajo sistema de producción tradicional (**Figura 4.4**, barras verdes claras) en los dos estadios de maduración estudiados

(verde y rojo). Estos resultados concuerdan con los descritos para PPO de pera, melocotón (Carbonaro y Mattera, 2001) y uva (Núñez-Delicado *y col.*, 2005).

En el caso de pimiento cultivado bajo sistema de producción ecológico, el incremento en el nivel de actividad POD puede estar relacionado con el cambio en el metabolismo de compuestos fenólicos, debido a la ausencia de pesticidas y fertilizantes sintéticos y con el desarrollo de sistemas de resistencia a infecciones (Ohazurike y Arince, 1996).

4.1.5. Contenido total de carotenos

Los carotenoides representan uno de los grupos más importantes de pigmentos naturales del reino vegetal.

En frutos se localizan en los cromoplastos, con diferente distribución dependiendo del fruto. En el caso del pimiento maduro, los carotenoides mayoritarios suelen ser capsantino y capsorrubeno (Nuez *y col.*, 2003).

Generalmente, en el proceso de maduración de los frutos, van desapareciendo las clorofilas y se van desenmascarando ciertos pigmentos carotenoides a la vez que se sintetizan otros nuevos. Conforme avanza la maduración en el caso del pimiento, los carotenoides que se van sintetizando son esterificados para aumentar su estabilidad e hidrofobicidad, lo que facilita su incorporación a la estructura de las membranas.

En este estudio hemos comparado el contenido total de carotenoides en pimiento, expresado como la suma de las concentraciones de los distintos carotenos, medidos a una longitud de onda de 450 nm, en función de las técnicas de cultivo utilizadas y el estadio de maduración del fruto.

En la **figura 4.5** se observa como el contenido en carotenos de pimiento cultivado bajo sistema de producción tradicional fue mucho más bajo a lo largo de la maduración (barras verdes claras) que el del pimiento cultivado bajo sistema de producción ecológico (barras verdes oscuras). Esta diferencia en el nivel de carotenos se hizo más notable, conforme avanzó el estadio de maduración del material vegetal. En pimiento verde cultivado bajo sistema de producción ecológico, el contenido en carotenos totales fue un 50% mayor que en pimiento cultivado bajo sistema de

producción tradicional; en el caso de pimiento rojo el aumento fue de un 52% en el ecológico respecto al tradicional.

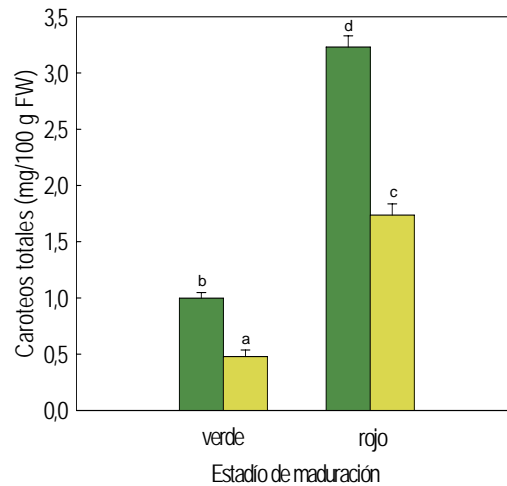


Figura 4.5. Efecto del tipo de cultivo y estado de maduración en carotenoides totales de pimiento dulce. Cultivo tradicional (barras verdes claras) o ecológico (barras verdes oscuras).

Las concentraciones más altas de carotenos se obtuvieron para pimiento rojo $3,23 \pm 0,03$ y $1,73 \pm 0,04$ mg/100 g FW para cultivo ecológico y tradicional, respectivamente (Figura 4.5). Los resultados obtenidos para pimiento cultivado bajo sistema de producción tradicional son del mismo orden que los descritos en la literatura (Howard y col., 2000; Wall y col., 2001), sin embargo, los resultados obtenidos para pimiento cultivado bajo sistema de producción ecológico no se han podido contrastar, ya que no hay datos disponibles en la bibliografía.

4.1.6. Parámetros de color

El aspecto físico de la fruta, y en particular su color, es de primordial importancia cuando se hace referencia a los distintos atributos que definen su calidad. Es especialmente importante en el caso de frutas destinadas a su consumo en fresco.

Los cambios de color con la maduración, en la cara externa del pimiento, tienen lugar como resultado de la degradación de la clorofila y un aumento considerable del contenido en carotenos (**Figura 4.5**). Este cambio está directamente relacionado con la temperatura e iluminación a la que está expuesta la fruta.

Las variaciones del contenido en carotenos de pimiento rojo en función del sistema de cultivo ecológico o tradicional, descrito en el apartado anterior, lleva asociado un cambio de color.

En este trabajo, también se ha estudiado la influencia del tipo de cultivo y estadio de maduración en la evolución de las coordenadas de color CIELab (L^* , a^* y b^*) de pimiento.

Se observaron diferencias significativas $p \leq 0,05$ en las coordenadas de color CIELab tanto entre pimientos cultivados bajo los dos sistemas de producción estudiados como en pimientos en distintos estadios de maduración (**Tabla 4.2**).

La clorofila, es el pigmento mayoritario en pimiento inmaduro (verde) mientras que en el caso de pimiento maduro (rojo) los pigmentos mayoritarios son los carotenos. Por tanto, conforme avanza el estadio de maduración del pimiento, el parámetro de color a^* (-a verde, +a rojo) aumenta, pasando de valores bajos (verde), a valores más altos de a^* (rojo) (**Tabla 4.2**), debido a la degradación de la clorofila y al aumento progresivo de la concentración de carotenos en los cromoplastos (Gómez-Ladrón de Guevara y Pardo-González, 1996).

Cuando comparamos el valor de L^* respecto al sistema de producción, observamos que en los dos estadios de maduración estudiados (verde y rojo) el color del pimiento fue más oscuro (L^* más baja) para el cultivado bajo sistema de producción tradicional que para el cultivado bajo sistema de producción ecológico (**Tabla 4.2**).

Respecto a los valores obtenidos para la coordenada de color a^* (-a verde, +a roja), el valor más bajo se obtuvo (como era de esperar) para pimiento verde, en ambos sistemas de producción, ecológico y tradicional ($11,68 \pm 0,02$ y $6,23 \pm 0,03$, respectivamente) (**Tabla 4.2**). Conforme avanzó el estadio de maduración, aumentó el valor de a^* , alcanzando un valor de $39,61 \pm 0,05$ para pimientos cultivados bajo sistema de producción ecológico y $31,81 \pm 0,04$ para pimientos cultivados bajo sistema de producción tradicional. La evolución de la coordenada a^* se encuentra en perfecta armonía con el cambio de color de verde a rojo, que sufrió el pimiento a lo largo de la maduración.

Tabla 4.2. Cambios de color en las coordenadas CIELab durante el desarrollo y maduración en pimiento dulce (*Capsicum annuum* L., cultivo Almuden) bajo sistema de producción ecológico y tradicional.

Tipo de Cultivo	Estadío de Maduración	L*	a*	b*	C*	ángulo HUE
Ecológico	verde	67,59 ± 0,02 ^d	11,68 ± 0,02 ^b	46,78 ± 0,01 ^b	48,21 ± 0,01 ^b	75,98 ± 0,05 ^c
	rojo	54,32 ± 0,04 ^b	39,61 ± 0,05 ^d	89,59 ± 0,06 ^d	97,95 ± 0,02 ^d	66,14 ± 0,02 ^b
Tradicional	verde	61,50 ± 0,04 ^c	6,23 ± 0,05 ^a	31,36 ± 0,05 ^a	31,97 ± 0,02 ^a	78,75 ± 0,05 ^d
	rojo	30,76 ± 0,03 ^a	31,81 ± 0,04 ^c	49,71 ± 0,07 ^c	59,01 ± 0,03 ^c	57,38 ± 0,03 ^a

Los valores de la tabla son la media de 3 repeticiones. Los datos que aparecen con las mismas letras no mostraron diferencias significativas $p \leq 0,05$ para el atributo evaluado (Test Tukey).

Por otra parte, como se puede observar en la **tabla 4.2**, el valor de a^* fue más alto para pimiento cultivado bajo sistema de producción ecológico que para el cultivado bajo sistema de producción tradicional, en los dos estadios de maduración estudiados. De esta forma, se puede concluir que el pimiento cultivado bajo sistema de producción ecológico tiene un color verde o rojo más intenso que el pimiento cultivado bajo sistema de producción tradicional.

Cuando se estudió la tendencia del parámetro de color b^* (-b azul, +b amarillo) se obtuvieron resultados similares a los obtenidos para el parámetro a^* , donde b^* aumentaba con la maduración para pimiento cultivado bajo ambos sistemas de cultivo (**Tabla 4.2**). En ese caso también se obtuvieron valores más altos de b^* para pimiento cultivado bajo sistema de producción ecológico que para los cultivados bajo sistema de producción tradicional en los dos estadios de maduración estudiados (**Tabla 4.2**).

El parámetro de color croma (C^*) se calculó a partir de los valores a^* y b^* , por lo tanto, su comportamiento fue idéntico al descrito para a^* y b^* , es decir, aumentó con la maduración en ambos tipos de cultivo. Los colores más atractivos son aquellos con mayor valor de C^* . Como se puede ver en la **tabla 4.2**, el valor más alto del C^* , se obtuvo para pimiento rojo cultivado bajo sistema de producción ecológico ($97,95 \pm 0,02$), siendo el valor de C^* mucho menor para pimiento rojo cultivado bajo sistema de producción tradicional ($59,01 \pm 0,03$). Así, podremos concluir que el pimiento rojo cultivado bajo sistema de producción ecológico presenta valores más altos para las coordenadas L^* , a^* , b^* y C^* , que el pimiento rojo cultivado bajo sistema de producción tradicional (**Tabla 4.2**), por lo que presenta una mayor intensidad de color rojo.

4.2. COMPARACIÓN DE DIFERENTES PARÁMETROS DE CALIDAD EN PIMIENTO CULTIVADO CON BIOFERTILIZANTES O CON FERTILIZACIÓN QUÍMICA: CONCENTRACIÓN DE N_{TOTAL} , CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DEL FRUTO, ÁCIDOS ORGÁNICOS, POD Y COMPUESTOS FENÓLICOS.

Hay estudios que relacionan la asimilación de N con el crecimiento de la planta y la productividad de la cosecha, en respuesta a la inoculación con rizobacterias. Sin embargo, todavía se conoce muy poco sobre el efecto específico de estas bacterias en la calidad del fruto, especialmente en pimiento. El efecto de las

rizobacterias en frutos, no siempre está asociado con un aumento de la eficiencia de asimilación de N, sino que la composición física y química, así como las características enzimáticas del fruto pueden verse significativamente afectadas por la presencia de esta bacteria.

4.2.1. Concentración de N_{total}

La concentración de N_{total} en diferentes órganos de la planta está relacionada con la disponibilidad de N en la raíz, y los diferentes métodos de suministro de N a la planta (del Amor, 2006).

La concentración de N_{total} se determinó en diferentes órganos de la planta de pimiento: raíz y fruto, en diferentes condiciones de fertilización. La reducción al 40% del N suministrado a las plantas de pimiento, redujo en un 16,8% la concentración de N_{total} en frutos (**Figura 4.6.A**). Este efecto se observó tanto en plantas no inoculadas como en las inoculadas con rizobacterias cuando se compararon con el control (100% N) (**Figura 4.6.A**). Sin embargo, no se encontró ninguna diferencia significativa en la concentración de N_{total} en fruto entre las plantas inoculadas y no inoculadas, ambas con un suministro de N del 40% (**Figura 4.6.A**).

El mecanismo más común propuesto para explicar la promoción del crecimiento de plantas inoculadas por *Azospirillum*, es la fijación de N_2 (Bashan *y col.*, 2004). Nuestros resultados apuntan hacia la veracidad de este mecanismo, ya que se observó como las raíces de las plantas de pimiento inoculadas con rizobacterias mostraron un incremento significativo del N_{total} , en comparación con las raíces de plantas no inoculadas (**Figura 4.6.B**).

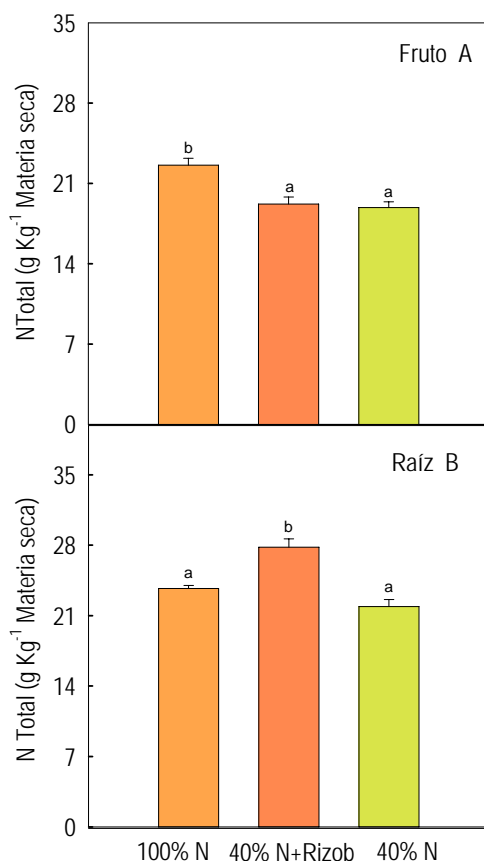


Figura 4.6. Efecto del tratamiento de fertilización en la concentración de nitrógeno total en fruto y raíz. Los datos que aparecen con las mismas letras no mostraron diferencias significativas $p \leq 0,05$ para el atributo evaluado (Test Tukey).

4.2.2. Características físicas del fruto

El contenido en materia seca del fruto y la firmeza del mismo no se vieron afectados por la cantidad de N suministrado, ni por la inoculación con rizobacterias (Tabla 4.3). Sin embargo, el espesor del pericarpo (sobre todo en zona ecuatorial y basal) se redujo significativamente en los frutos de plantas fertilizadas con el 40% de N y no inoculadas con rizobacterias, cuando lo comparamos con el control (100% N). De igual forma, los frutos de plantas fertilizadas con el 40% de N y no inoculadas

mostraron un alto valor del parámetro de color a^* ($6,86 \pm 0,77$). Dado que el parámetro de color a^* está asociado con la intensidad del color rojo del fruto, podríamos asociar su aumento en pimiento no-inoculado con baja concentración de N, con una mayor concentración de carotenos, debido al estrés que supone para la planta un desequilibrio nutricional por falta de N. Este desequilibrio también induce un menor espesor del pericarpio, estos resultados son similares a los descritos por Bowen y Frey (2002), que observaron un efecto en el grosor del pericarpio asociado al suministro de N.

Cuando analizamos los valores de grosor del pericarpio y parámetro de color a^* para frutos de plantas de pimiento fertilizadas con el 40% de N e inoculadas con rizobacterias, no se observaron diferencias significativas respecto al control (**Tabla 4.3**). Este resultado nos indicó, que la inoculación con rizobacterias suplía el 60% de N que habíamos eliminado en la fertilización respecto al control. Por lo tanto, una disminución en el suministro de N en plantas inoculadas con rizobacterias mostró una tendencia hacia la mejora de las características físicas del fruto, en comparación con plantas no inoculadas, aunque las diferencias no siempre fueron significativas.

Tabla 4.3. Efecto de la fertilización en materia seca de fruto, delgadez y firmeza del pericarpio, y color del fruto maduro en pimiento dulce (*Capsicum annuum* L.) cultivo Cierva, tipo de California.

Fertilization	Peso seco (g 100 g ⁻¹)	Espesor del pericarpio (mm)			Firmeza (kg ⁻¹)	Color		
		Apical	Ecuatorial	Basal		L*	a*	b*
100%N	6,67±0,18	8,35±0,30	7,06±0,25 ^b	7,13±0,28 ^b	3,51±0,08	47,29±0,89	4,25±0,27 ^a	26,7±0,6
40%N+ rizobacterias	7,17±0,27	8,36±0,36	6,81±0,20 ^{ab}	6,84±0,22 ^{ab}	3,50±0,13	48,40±0,44	5,49±0,46 ^{ab}	27,36±0,3
40%N	7,14±0,24	8,19±0,45	6,26±0,22 ^a	6,09±0,18 ^a	3,69±0,10	46,76±0,73	6,86±0,77 ^b	26,39±0,4

Los valores de la tabla son la media de 3 repeticiones. Los datos que aparecen con las mismas letras no mostraron diferencias significativas $p \leq 0,05$ para el atributo evaluado (Test Tukey).

4.2.3. Ácidos orgánicos

La síntesis de ácidos orgánicos es esencial para la asimilación de NO_3 (Stitt, 1999), y el nivel de nitrato puede influir en el metabolismo de los carbohidratos, ya que, durante la asimilación de nitrato se reduce la síntesis de carbohidratos, porque parte de los carbonos son convertidos en ácidos orgánicos (Stitt *y col.*, 2002).

Cuando las plantas de pimiento se regaron con bajo suministro de N (40%), la concentración de ácidos cítrico, ascórbico y succínico en frutos verdes fue significativamente mayor ($p \leq 0,05$) en plantas inoculadas con rizobacterias que en las no inoculadas (**Tabla 4.4**). La inoculación con rizobacterias aumentó las concentraciones de ácidos cítrico, ascórbico y succínico en un 72,2%, 21,4% y 31,2%, respectivamente.

Por otra parte, no se encontraron diferencias significativas en la concentración de ácido succínico y ácido cítrico, entre las plantas inoculadas con rizobacterias y las plantas control (no inoculadas y pleno suministro de N (100%)), mientras que la concentración de ácido ascórbico fue mayor en las plantas inoculadas que en las control (**Tabla 4.4**).

La inoculación tuvo menos efecto en los ácidos orgánicos en fruto amarillo. El ácido succínico fue significativamente superior en plantas no inoculadas con bajo suministro de N, mientras que no se encontraron diferencias significativas entre las plantas inoculadas y las plantas control. Por otra parte, el efecto de las bacterias sobre la concentración de ácidos orgánicos fue dependiente del proceso de maduración. En este estudio se observó que el ácido succínico es el ácido predominante durante la etapa inmadura de pimiento dulce (verde), mientras que cuando el pimiento alcanza la plena madurez (amarillo) el ácido cítrico fue el más abundante (**Tabla 4.4**). Estos datos están en consonancia con el patrón descrito para algunas frutas, que muestran un aumento significativo en la concentración de ácido cítrico con la maduración (Jakopic *y col.*, 2007).

Tabla 4.4. Efecto del tratamiento de fertilización en la concentración de ácidos orgánicos en pimiento dulce (*Capsicum annuum* L.) cultivo Cierva, tipo de California en los estadios de maduración verde y amarillo.

Estadio	Fertilización	Ácidos orgánicos (g 100mL ⁻¹)				
		Cítrico	Tartárico	Málico	Ascórbico	Succínico
Verde	100%N	0,19±0,03 ^b	0,024±0,0001	0,12±0,01	0,08±0,015 ^a	0,42±0,05 ^{ab}
	40%N+ rizobacterias	0,18±0,01 ^b	0,010±0,005	0,12±0,04	0,14±0,01 ^c	0,48±0,04 ^b
	40%N	0,05±0,01 ^a	0,013±0,051	0,14±0,01	0,11±0,01 ^b	0,33±0,01 ^a
Amarillo	100%N	0,37±0,02	0,020±0,004	0,143±0,002	0,194±0,091 ^a	0,15±0,01 ^a
	40%N+ rizobacterias	0,40±0,03	0,017±0,006	0,154±0,009	0,25±0,01 ^b	0,18±0,01 ^a
	40%N	0,41±0,01	0,020±0,008	0,169±0,008	0,22±0,02 ^{ab}	0,24±0,03 ^b

Los valores de la tabla son la media de 3 repeticiones. Los datos que aparecen con las mismas letras no mostraron diferencias significativas $p \leq 0,05$ para el atributo evaluado (Test Tukey).

Kamilova *y col.*, en 2006 describieron la implicación de los ácidos succínico y cítrico en el crecimiento y desarrollo de pimiento dulce.

Los diferentes comportamientos de las propiedades físico-químicas del pimiento dulce durante el desarrollo del fruto han sido descritos en numerosas investigaciones relacionadas con el suministro de N y el tipo de cultivo (del Amor *y col.*, 2008; Pérez-López *y col.*, 2007). Por otra parte, Martínez *y col.*, en 2007, observaron, en variedades de color rojo, que cuando se produjo el viraje de color de verde a rojo, el contenido total de ácido ascórbico aumentó en un 27%. Los estudios de Deepa *y col.*, en 2007 también demostraron una tendencia creciente de la concentración de ácido ascórbico con la madurez, mientras que Gnayfeed *y col.*, en 2001, observaron como el ácido ascórbico llegó a su nivel máximo en el momento del cambio de color. En este experimento, la concentración de ácido ascórbico aumentó en un 50% del estadio de maduración verde al amarillo en los dos tratamientos estudiados.

4.2.4. POD y compuestos fenólicos

Como se observa en los datos presentados en la **Tabla 4.5**, tanto el aporte de N como la inoculación con rizobacterias de la planta, tiene un marcado efecto en la actividad POD de frutos de pimiento. Cuando las plantas de pimiento fueron fertilizadas con un 40% de N respecto del control, se observó un descenso en la actividad POD de los frutos en los dos estadios de maduración estudiados: inmaduro (verde) y maduro (amarillo). Este descenso fue más marcado en pimientos amarillos (72%) que en pimientos verdes (46%) (**Tabla 4.5**).

Cuando se compararon estos datos con los obtenidos en pimientos procedentes de plantas fertilizadas con el 40% de N e inoculadas con rizobacterias, se observó un descenso todavía más marcado de la actividad POD respecto del control: 58% en el caso del pimiento verde y 96% en el caso del pimiento amarillo (**Tabla 4.5**). Estos resultados presentan la misma tendencia que los descritos por Huang *y col.*, en 2004 para la actividad de enzimas antioxidantes, que disminuían gradualmente con la deficiencia de N, llevando a un mayor grado de peroxidación lipídica en las membranas. Como POD cataliza la oxidación de una gran cantidad de compuestos en presencia de H₂O₂ (Pomar *y col.*, 1997), puede que su marcado descenso en frutos de

plantas inoculadas con rizobacterias esté asociado con la síntesis, por parte de la bacteria, de compuestos reductores de radicales libres. Desgraciadamente, no existen estudios previos a este sobre el efecto de rizobacterias en la actividad enzimática del fruto. Sin embargo, sí es conocido que la actividad enzimática del fruto depende del cultivo y de las condiciones climáticas (Russo y Biles, 2003), lo que implica que la actividad POD en fruto de pimiento puede tener una respuesta multifactorial compleja que incluya el efecto del genotipo, condiciones ambientales, contenido en agua de la planta, nivel de nutrientes y tipo de bacteria con la que se inocula.

Tabla 4.5. Efecto del tratamiento de fertilización de POD y compuestos fenólicos en pimiento dulce (*Capsicum annuum* L.) cultivo Cierva, tipo de California en los estadios de maduración verde y amarillo.

Estadio de maduración	Fertilización	Actividad Peroxidasa (UE g ⁻¹ FW)	Compuestos fenólicos (mg g ⁻¹ FW)
Verde	100%N	68,9±1,7 ^c	0,269±0,010 ^b
	40%N+ rizobacterias	28,6±1,4 ^a	0,266±0,012 ^b
	40%N	37,4±2,9 ^b	0,236±0,008 ^a
Amarillo	100%N	73,1±2,8 ^c	0,303±0,008 ^a
	40%N+ rizobacterias	2,8±0,1 ^a	0,406±0,014 ^b
	40%N	20,8 ±1,7 ^b	0,390±0,015 ^b

Los valores de la tabla son la media de 3 repeticiones. Los datos que aparecen con las mismas letras no mostraron diferencias significativas $p \leq 0,05$ para el atributo evaluado (Test Tukey).

Tal y como se ha descrito en el capítulo anterior, los frutos de plantas de pimiento cultivadas bajo elevado estrés biótico (cultivo ecológico) presentaron mayor actividad POD que los obtenidos de plantas cultivadas en condiciones de bajo estrés biótico (cultivo tradicional). Por otra parte, también se sabe que las plantas fertilizadas con bajo contenido en N regulan su crecimiento favoreciendo la formación de tejidos a expensas de tejido vegetativo (del Amor, 2006). Por lo tanto,

bajo similares condiciones, estas plantas pueden tener menos infecciones, ya que tienen menos tejidos jóvenes que las fertilizadas con alto contenido en N. Este bajo nivel de infección puede estar directamente relacionado con el bajo nivel de POD observado en frutos de pimiento obtenido de plantas fertilizadas con 40% de N (**Tabla 4.5**). También es importante destacar que la presencia de rizobacterias está directamente relacionada con un menor nivel de infección en muchos cultivos. Esta afirmación nos permite explicar el todavía menor nivel de POD encontrado en pimientos procedentes de plantas fertilizadas con el 40% de N e inoculadas con rizobacterias (**Tabla 4.5**).

Cuando estudiamos el efecto del nivel de fertilización con N y la inoculación con rizobacterias sobre los compuestos fenólicos del fruto de pimiento, observamos diferente comportamiento dependiendo del estadio de maduración del fruto. En el caso de pimientos inmaduros verdes, la fertilización de la planta con un 40% de N implicó un descenso significativo en la concentración de compuestos fenólicos, respecto al control (**Tabla 4.5**). Sin embargo, en el caso de pimientos maduros amarillos se observó un aumento de dichos compuestos. Si bien es importante resaltar, que la presencia de rizobacterias inoculadas a plantas fertilizadas con un 40% de N, aumentó el contenido en fenoles totales hasta igualarlos con el control en el caso de pimientos inmaduros verdes, pero no tuvo efecto alguno en el caso de pimientos maduros amarillos (**Tabla 4.5**). En la **Tabla 4.5**, también puede observarse un aumento en la concentración de compuestos fenólicos con la maduración en los dos casos de fertilización estudiados. Este efecto es similar al descrito en el capítulo anterior para pimientos cultivados bajo sistema de producción ecológica y tradicional, y al descrito por Deepa *y col.*, 2007. Por otra parte Estiarte *y col.*, en 1994 describieron un aumento de compuestos fenólicos en hoja de pimiento como respuesta a la limitación de N a la planta, al igual que ocurre en nuestro caso para pimiento maduro amarillo.

Concluyendo, podríamos decir, que los parámetros físico-químicos del fruto de pimiento estudiados en este capítulo, no solo están relacionados con la absorción de nutrientes por la planta, sino también con su metabolismo secundario. Por lo tanto, la inoculación de plantas con bacterias podría modificar el esquema de asimilación de nutrientes de la planta, el proceso de fructificación y el desarrollo del fruto, bajo condiciones de limitación de N en el suelo.

4.3. COMPARACIÓN DE DIFERENTES PARÁMETROS DE CALIDAD EN PIMIENTO SOMETIDO A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ESTRÉS SALINO: COMPUESTOS FENÓLICOS, VITAMINA C, CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y ACTIVIDAD POD.

4.3.1. Compuestos fenólicos

En general, los parámetros físico-químicos del fruto, su sabor y sus propiedades nutricionales, se ven afectados por la salinidad del agua de riego, influyendo notablemente en la calidad final de los productos hortícolas (Krauss *y col.*, 2006; Navarro *y col.*, 2006; Tadesse *y col.*, 1999a; Grattan y Grieve, 1992; Navarro *y col.*, 2002).

En el presente trabajo se estudió el efecto de la concentración salina del agua de riego de plantas de pimiento, en el contenido en diferentes parámetros de calidad de los frutos obtenidos. Además de estudiar el efecto de la concentración salina, también se estudió el efecto del tiempo que la planta estuvo sometida a dicho estrés salino. Para ello, plantas de pimiento cultivadas en invernadero, en cultivo hidropónico sobre fibra de coco, fueron regadas con soluciones salinas de diferente concentración: 0, 20 y 40 mM (tal y como se ha detallado en el **Capítulo 3**).

Dichos tratamientos se aplicaron a plantas de pimiento desde un tiempo determinado después del trasplante (DDT) (50, 100 y 150 días) y hasta el final del experimento (**Tabla 3.3 del Capítulo 3**), y se recogieron frutos maduros en tres fechas: 11/04/08, 6/06/08 y 25/07/08.

Cuando se comparó el contenido de compuestos fenólicos en fruto de pimiento sometido a diferentes concentraciones de estrés salino, se observó un aumento de los compuestos fenólicos con la concentración salina del agua de riego aplicada 50 DDT (**Figura 4.7**).

Estos resultados son similares a los descritos en la bibliografía para pimiento rojo (Navarro *y col.*, 2006) y tomate (Krauss *y col.*, 2006).

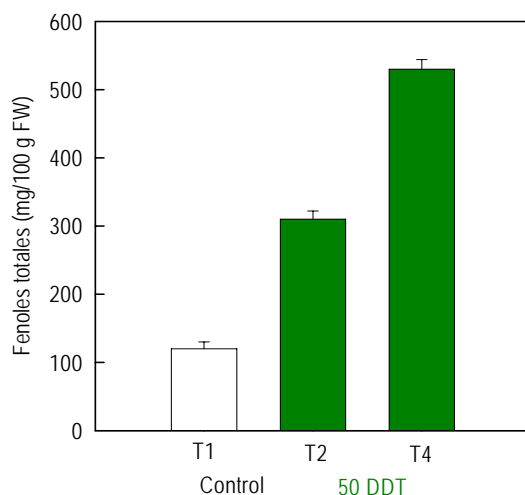


Figura 4.7. Efecto de la salinidad del agua de riego sobre el contenido en compuestos fenólicos de frutos de pimienta recolectados el día 11/04/08 (Tabla 3.3). (T1) Control, 0 mM de NaCl, (T2) 20 mM de NaCl durante 55 días, (T4) 40 mM de NaCl durante 55 días.

Cuando las plantas de pimienta fueron regadas con una solución de NaCl 20 mM, el contenido de compuestos fenólicos del fruto aumentó 2,5 veces respecto del control (**Figura 4.7**), mientras que los frutos procedentes de plantas regadas con NaCl 40 mM, mostraron un aumento en la concentración de compuestos fenólicos de 4,6 veces respecto del control.

Este aumento de compuestos fenólicos con la salinidad se observó nuevamente cuando se aplicaron los mismos tratamientos 100 (**Figura 4.8**) y 150 DDT (**Figura 4.9**).

Este aumento en la concentración de compuestos fenólicos puede estar relacionado con el estrés a que está sometida la planta.

Cuando estudiamos el efecto del tiempo que la planta está sometida al estrés (**Figura 4.9**), pudimos observar como el contenido en compuestos fenólicos del fruto disminuyó conforme se retardó la aplicación del tratamiento a la planta (DDT), en los dos tratamientos ensayados 20 mM (**Figura 4.9, T2, T3 y T6**) y 40 mM de NaCl (**Figura 4.9, T4, T5 y T7**). Esto nos indicó que el tiempo que la planta está sometida al estrés salino determina la cantidad de fenoles que puede sintetizar, aproximándose más al control cuando más tarde se aplica el tratamiento.

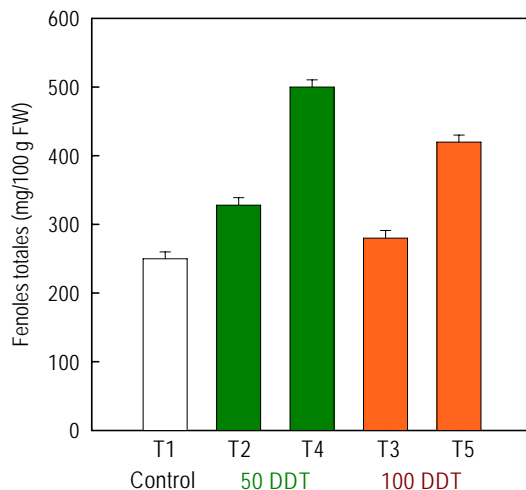


Figura 4.8. Efecto de la salinidad del agua de riego sobre el contenido en compuestos fenólicos de frutos de pimiento recolectados el día 6/06/08 (Tabla 3.3). (T1) Control, 0 mM de NaCl, (T2) 20 mM de NaCl durante 111 días, (T4) 40 mM de NaCl durante 111 días, (T3) 20 mM de NaCl durante 61 días y (T5) 40 mM de NaCl durante 61 días.

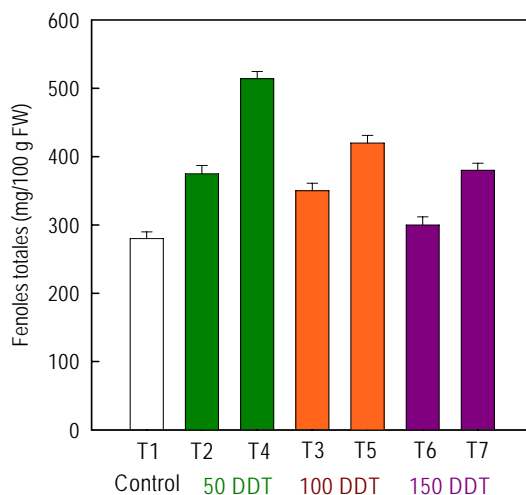


Figura 4.9. Efecto de la salinidad del agua de riego sobre el contenido en compuestos fenólicos de frutos de pimiento recolectados el día 25/07/08 (Tabla 3.3). (T1) Control, 0 mM de NaCl, (T2) 20 mM de NaCl durante 160 días, (T4) 40 mM de NaCl durante 160 días, (T3) 20 mM de NaCl durante 110 días y (T5) 40 mM de NaCl durante 110 días, (T6) 20 mM de NaCl durante 60 días y (T7) 40 mM de NaCl durante 60 días.

Por otra parte, también se estudió el efecto de la concentración salina del agua de riego sobre la edad fisiológica de la planta, y por lo tanto de la calidad del fruto obtenido. Para ello, se aplicaron tres tratamientos, 0, 20 y 40 mM de NaCl 50 DDT y se mantuvieron hasta el final del ensayo, recogiendo frutos maduros en tres fechas diferentes: 11/04/08, 6/06/08 y 25/07/08, (55, 111 y 160 días de salinización).

Como se observa en la **Figura 4.10**, en el experimento control (0 mM de NaCl), se aprecia como el contenido de compuestos fenólicos fue mayor en frutos procedentes de plantas con una edad fisiológica más avanzada (**Figura 4.10.A**). En el caso de plantas regadas con una concentración de NaCl 20 mM, el contenido en compuestos fenólicos del fruto aumentó mínimamente con la edad fisiológica de la planta (**Figura 4.10.B**), y en el caso de plantas regadas con NaCl 40 mM el contenido en compuestos fenólicos del fruto no varió con la edad fisiológica de la planta (**Figura 4.10.C**).

Este efecto puede ser debido a que el estrés a que se ve sometida la planta conforme aumenta la concentración de NaCl, hace que se sintetice una mayor cantidad de compuestos fenólicos desde el inicio del tratamiento, no viéndose un aumento con la edad fisiológica de la planta, (**Figura 4.10.C**).

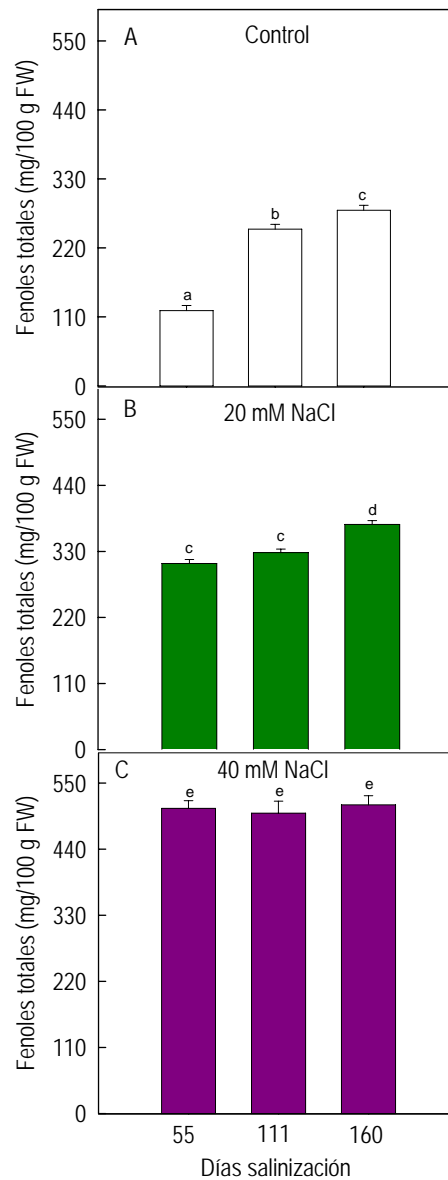


Figura 4.10. Efecto del estado fisiológico de la planta sobre el contenido de compuestos fenólicos del fruto (mg/100 g FW). (A) Control, 0 mM de NaCl, (B) 20 mM de NaCl y (C) 40 mM de NaCl. Los valores de la tabla son la media de 3 repeticiones. Los datos que aparecen con las mismas letras no mostraron diferencias significativas $p \leq 0,05$ para el atributo evaluado (Test Tukey).

4.3.2. Nivel de vitamina C

La principal forma de vitamina C observada en pimiento es el AA, contribuyendo en un 95% al contenido total de vitamina C (Marín *y col.*, 2004). Esta vitamina está involucrada en una gran cantidad de procesos biológicos, muchos de los cuales dependen de su actividad reductora o antioxidante.

Cuando se comparó el contenido de vitamina C en fruto de pimiento procedente de plantas sometidas a diferentes concentraciones de NaCl, se observó un descenso de esta vitamina con la concentración salina de agua de riego, aplicada 50 DDT (Figura 4.11). Cuando las plantas fueron regadas con una solución de NaCl 20 mM, el contenido en vitamina C de los frutos de pimiento descendió un 36% respecto del control (Figura 4.11). Esta misma reducción también se observó cuando la concentración de NaCl del agua de riego fue 40 mM (Figura 4.11). Este resultado nos indicó que una concentración de NaCl 20 mM ya es suficiente para reducir al máximo la capacidad de la planta para sintetizar vitamina C en ese estado fisiológico.

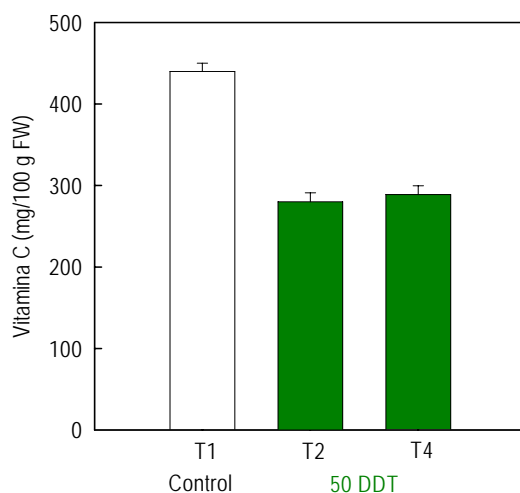


Figura 4.11. *Contenido en vitamina C (mg/100 g FW) en pimiento recolectado el día 11/04/08 procedente de plantas sometidas a diferentes concentraciones de NaCl (Tabla 3.3). (T1) Control, 0 mM de NaCl, (T2) 20 mM de NaCl durante 55 días, (T4) 40 mM de NaCl durante 55 días.*

Esta misma tendencia se observó cuando los tratamientos se aplicaron 100 (Figura 4.12) y 150 DDT (Figura 4.13).

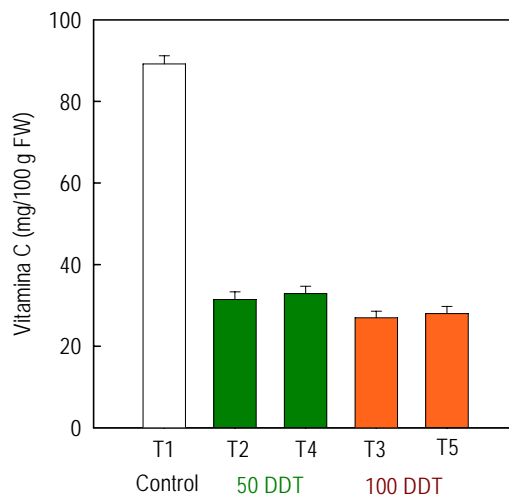


Figura 4.12. Contenido en vitamina C (mg/100 g FW) en pimiento recolectado el día 6/06/08 proveniente de plantas sometidas a diferentes concentraciones de NaCl (Tabla 3.3). (T1) Control, 0 mM de NaCl, (T2) 20 mM de NaCl durante 111 días, (T4) 40 mM de NaCl durante 111 días, (T3) 20 mM de NaCl durante 61 días y (T5) 40 mM de NaCl durante 61 días.

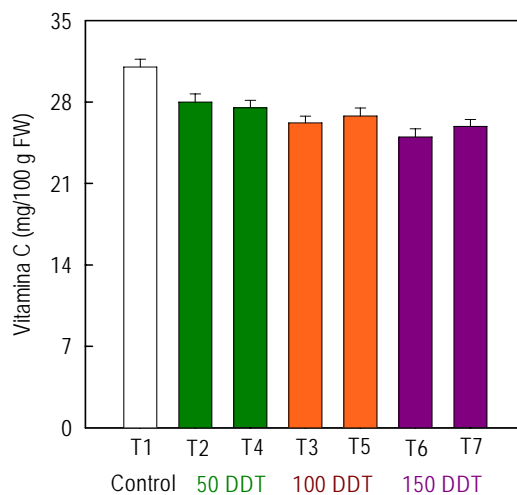


Figura 4.13. Contenido en vitamina C (mg/100 g FW) en pimiento recolectado el día 25/07/08 proveniente de plantas sometidas a diferentes concentraciones de NaCl (Tabla 3.3). (T1) Control, 0 mM de NaCl, (T2) 20 mM de NaCl durante 160 días, (T4) 40 mM de NaCl durante 160 días, (T3) 20 mM de NaCl durante 110 días y (T5) 40 mM de NaCl durante 110 días, (T6) 20 mM de NaCl durante 60 días y (T7) 40 mM de NaCl durante 60 días.

Cuando observamos los DDT a los cuales se aplicó cada tratamiento (y se mantuvo hasta el final del estudio) (**Figura 4.13**), pudimos observar como el contenido en vitamina C no presentó diferencias significativas conforme se retardó la aplicación del tratamiento a la planta, tanto a 20 como a 40 mM de NaCl. Esto nos indicó que en un corto periodo de tiempo de exposición al tratamiento, el contenido de vitamina C del fruto disminuye drásticamente, no teniendo efecto un mayor periodo de tratamiento (50 DDT) (**Figura 4.13**).

Estos resultados son similares a los descritos en la bibliografía para pimiento rojo por Navarro *y col.* (2006). Por el contrario, en el caso del tomate cherry se ha descrito que un incremento en la concentración salina de la solución de riego produce un aumento del contenido en vitaminas C y E (Serio *y col.*, 2004).

Por otra parte, también se estudió el efecto de la concentración salina del agua de riego sobre la edad fisiológica de la planta, para ello, se aplicaron tres tratamientos, 0, 20 y 40 mM de NaCl 50 DDT y se mantuvieron hasta el final del ensayo, recogiendo frutos maduros en tres fechas diferentes: 11/04/08, 6/06/08 y 25/07/08, (55, 111 y 160 días de salinización).

Como se observa en la **Figura 4.14**, en el experimento control (0 mM de NaCl), se aprecia como el contenido de vitamina C de los frutos es menor en plantas de edad fisiológica más avanzada (**Figura 4.14.A**), llegando a una reducción del 85% en el estado fisiológico más avanzado. Sin embargo, en el caso de plantas regadas con una concentración de NaCl 20 o 40 mM, el contenido de vitamina C del fruto también descendió bruscamente, llegando a presentar un 82 y 86% menos de vitamina C que el control (**Figura 4.14.B y 4.14.C**).

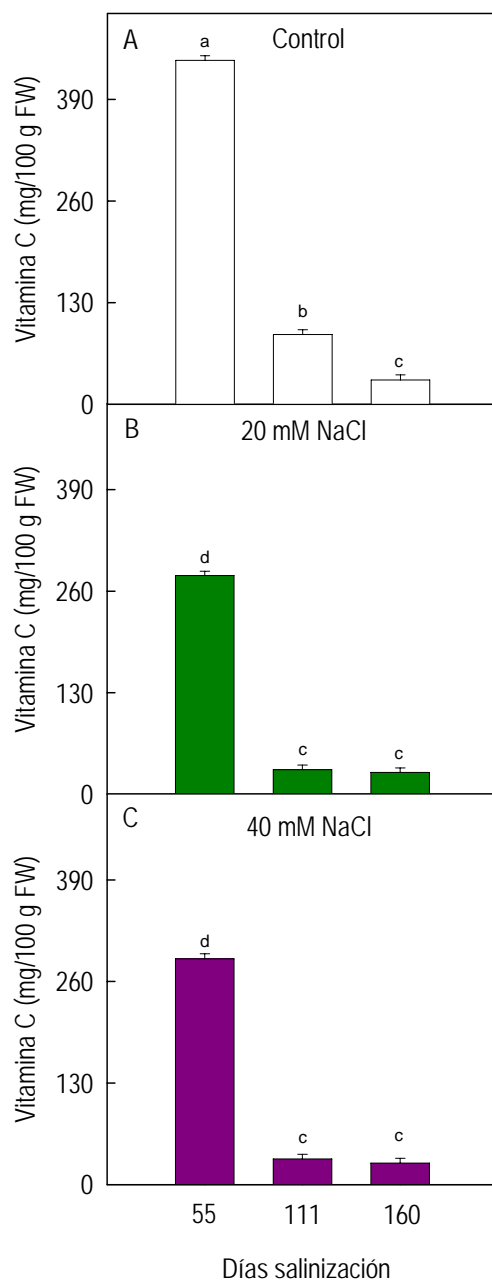


Figura 4.14. Efecto del estado fisiológico de la planta sobre el contenido de vitamina C del fruto (mg/100 g FW). (A) Control, 0 mM de NaCl, (B) 20 mM de NaCl y (C) 40 mM de NaCl. Los valores de la tabla son la media de 3 repeticiones. Los datos que aparecen con las mismas letras no mostraron diferencias significativas $p \leq 0,05$ para el atributo evaluado (Test Tukey).

4.3.3. Capacidad antioxidante

La escasez de agua de buena calidad en zonas donde se cultiva pimiento hace necesaria la utilización de aguas salinas para riego. Se ha observado que las plantas de pimiento sometidas a estrés hiperosmótico activan una respuesta fisiológica antioxidante (Smirnoff, 1995).

En el presente trabajo se estudió la relación entre el efecto de la concentración salina del agua de riego de plantas de pimiento con la capacidad antioxidante del fruto.

Cuando se comparó la actividad antioxidante de fruto de pimiento procedente de plantas sometidas a diferentes concentraciones de estrés salino, se observó un aumento en dicha capacidad cuando la concentración salina del agua de riego fue 20 mM (T2) aplicada 50 DDT, con un aumento del 33% respecto del control (Figura 4.15).

Son muy pocas las investigaciones realizadas con el fin de evaluar la influencia del estrés salino sobre la actividad antioxidantes de frutas. Sin embargo, nuestros resultados son similares a los descritos en la bibliografía para tomate (D'Amico *y col.*, 2003; De Pascale *y col.*, 2001) y fresa (Keutgen y Pawelzik, 2007). Este aumento puede estar relacionado con la síntesis de carotenoides, licopeno y ácido ascórbico.

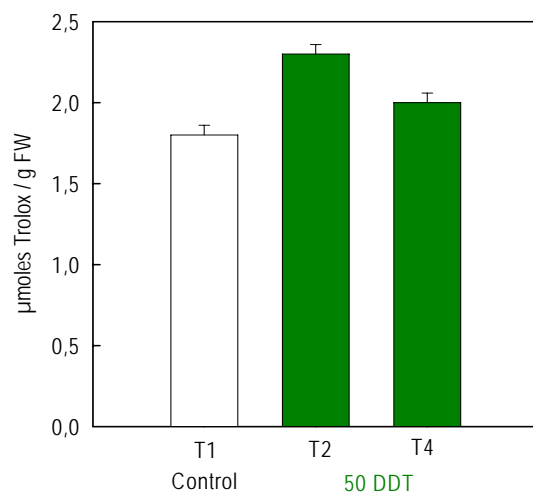


Figura 4.15. *Actividad antioxidante (µmoles Trolox/g FW) de pimiento recolectado el día 11/04/08 procedente de plantas sometidas a diferentes concentraciones de NaCl (Tabla 3.3). (T1) Control, 0 mM de NaCl, (T2) 20 mM de NaCl durante 55 días, (T4) 40 mM de NaCl durante 55 días.*

Cuando observamos los DDT a los cuales se aplicó cada tratamiento (y se mantuvo hasta el final del estudio), 100 DDT (**Figura 4.16**) y 150 DDT (**Figura 4.17**), pudimos ver como la actividad antioxidante del fruto disminuyó conforme se retardó la aplicación del tratamiento a la planta, en los dos tratamientos ensayados 20 y 40 mM de NaCl. Esto nos muestra que el tiempo de exposición de la planta con la solución salina, es determinante en los compuestos que producen actividad antioxidante.

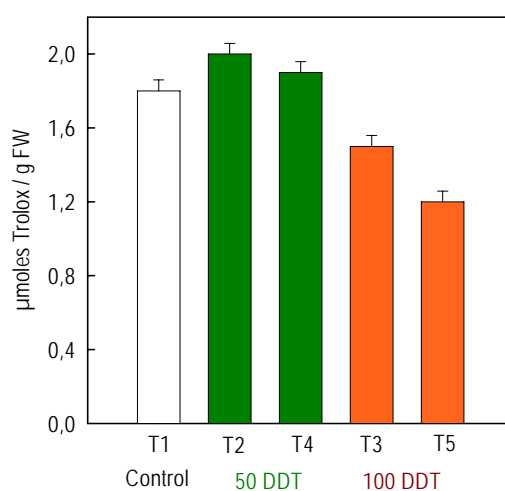


Figura 4.16. *Actividad antioxidante (μ moles Trolox/g FW) de pimienta recolectada el día 6/06/08 procedente de plantas sometidas a diferentes concentraciones de NaCl (Tabla 3.3). (T1) Control, 0 mM de NaCl, (T2) 20 mM de NaCl durante 111 días, (T4) 40 mM de NaCl durante 111 días, (T3) 20 mM de NaCl durante 61 días y (T5) 40 mM de NaCl durante 61 días.*

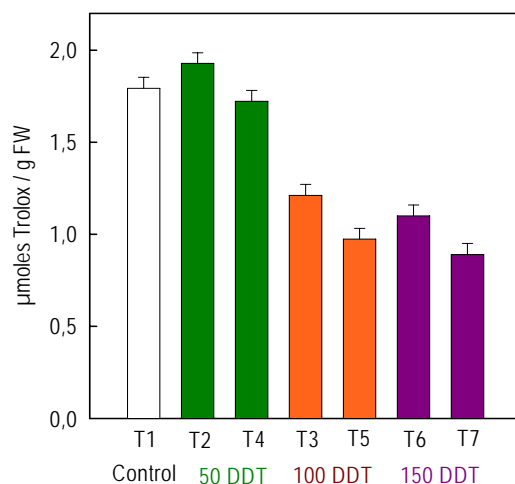


Figura 4.17. *Actividad antioxidante (µmoles Trolox/g FW) de pimienta recolectado el día 25/07/08 procedente de plantas sometidas a diferentes concentraciones de NaCl (Tabla 3.3). (T1) Control, 0 mM de NaCl, (T2) 20 mM de NaCl durante 160 días, (T4) 40 mM de NaCl durante 160 días, (T3) 20 mM de NaCl durante 110 días y (T5) 40 mM de NaCl durante 110 días, (T6) 20 mM de NaCl durante 60 días y (T7) 40 mM de NaCl durante 60 días.*

Por otra parte, también se estudió el efecto de la concentración salina del agua de riego sobre la edad fisiológica de la planta, para ello, se aplicaron tres tratamientos, 0, 20 y 40 mM de NaCl 50 DDT y se mantuvieron hasta el final del ensayo, recogiendo frutos maduros en tres fechas diferentes: 11/04/08, 6/06/08 y 25/07/08, (55, 111 y 160 días de salinización).

Como se observa en la **Figura 4.18**, en el experimento control (0 mM de NaCl), no se apreciaron modificaciones en la actividad antioxidante de los frutos conforme aumentó la edad fisiológica de la planta (**Figura 4.18A**). Sin embargo, en el caso de plantas regadas con una concentración de NaCl 20 ó 40 mM, se observó un descenso en la actividad antioxidante de los frutos, llegando a una reducción del 17% para frutos procedentes de plantas regadas con NaCl 20 mM durante 160 días y 15% para frutos procedentes de plantas regadas con NaCl 40 mM durante el mismo periodo de tiempo (**Figura 4.18B y 4.18C**).

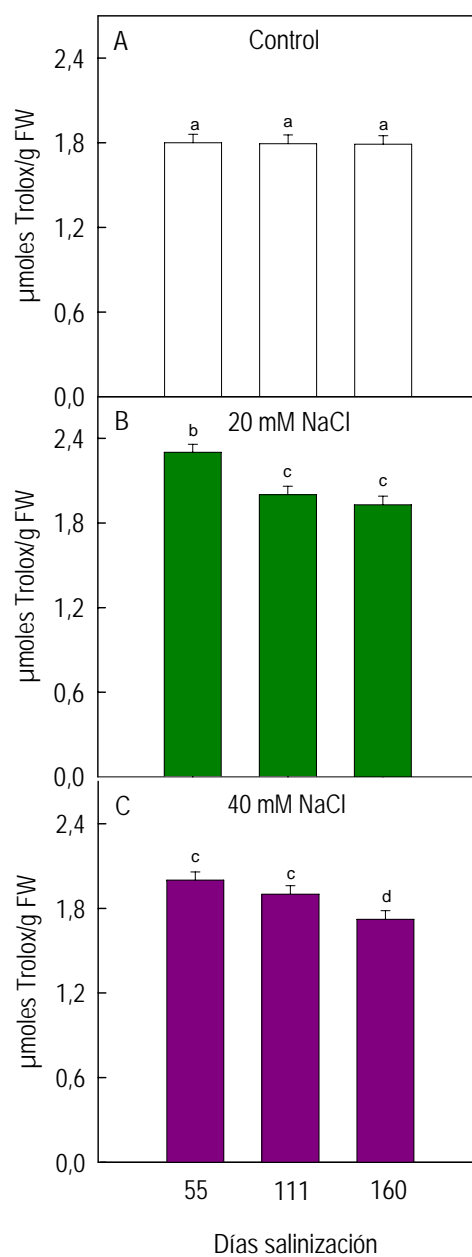


Figura 4.18. Efecto del estado fisiológico de la planta sobre la actividad antioxidante ($\mu\text{moles Trolox/g FW}$) de *pimiento*. (A) Control, 0 mM de NaCl, (B) 20 mM de NaCl y (C) 40 mM de NaCl. Los valores de la tabla son la media de 3 repeticiones. Los datos que aparecen con las mismas letras no mostraron diferencias significativas $p \leq 0,05$ para el atributo evaluado (Test Tukey).

Para concluir, decir que mientras que se observó un descenso muy drástico en el contenido en vitamina C de los frutos con la edad fisiológica de la planta, con independencia del tratamiento aplicado, se vio un ligero aumento en el contenido en compuestos fenólicos, lo que podría explicar que el descenso de la actividad antioxidante no sea muy acusado, ya que esta actividad viene dada por la suma, entre otros, de vitamina C y compuestos fenólicos.

4.3.4. Actividad POD

POD es una enzima oxidativa relacionada con muchas alteraciones celulares. Se sabe que cataliza el entrecruzamiento entre residuos de tirosina de las extensivas paredes celulares y el ácido ferúlico que forma parte de las pectinas (Fry, 1986). Además, se ha establecido una clara correlación entre la síntesis de lignina y suberina (Lagrimini *y col.*, 1993). Por otra parte, también se ha descrito un aumento de POD en pepino con la maduración, sobre todo en la piel del fruto (Repka y Ficherová, 1996). Todos estos estudios apuntan hacia la implicación de POD en los cambios que sufren las paredes celulares para la adaptación de las células al estrés.

En este trabajo se estudió el efecto de la concentración salina del agua de riego y del tiempo de aplicación del tratamiento sobre la actividad POD en fruto de pimiento.

Cuando las plantas de pimiento fueron regadas con una solución de NaCl 20 mM, aplicada 50 DDT, el contenido de POD en fruto de pimiento aumentó 3 veces respecto del control, al igual que ocurrió en frutos procedentes de plantas regadas con NaCl 40 mM (**Figura 4.19**).

Estos resultados son similares a los descritos para vinal (*Prosopis ruscifolia* G.), donde el estrés salino duplicó la actividad POD con respecto al testigo (Meloni *y col.*, 2008). También se ha demostrado que las raíces de los cultivos hidropónicos de tomate (*Lycopersicon esculentum* cv. Pera) muestran un aumento de la actividad POD diez días después de iniciar el tratamiento de estrés salino (Quiroga *y col.*, 2000). De igual forma se ha descrito en la literatura un aumento de actividad POD en melón (*Cucumis Melo* L.) cuando se sometió a estrés salino (Rodríguez-López *y col.*, 2000)

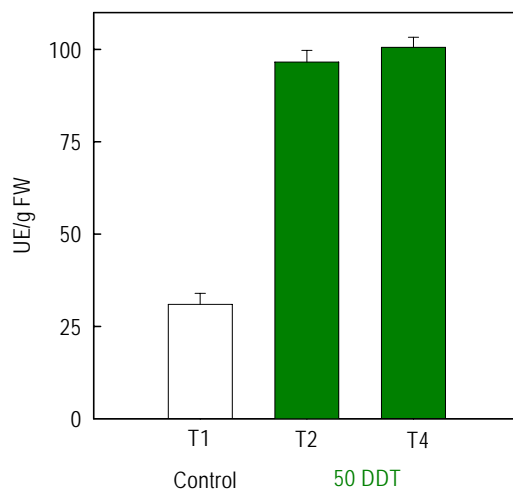


Figura 4.19. UE/g de pimiento recolectado el día 11/04/06 y procedente de plantas sometidas a diferentes concentraciones de NaCl (Tabla 3.3). (T1) Control, 0 mM de NaCl, (T2) 20 mM de NaCl durante 55 días, (T4) 40 mM de NaCl durante 55 días. El medio de reacción a 25 °C contenía en tampón citrato 50 mM de pH 4,5, 25 μ L de extracto de POD, 1 mM de ABTS, 6 mM de H₂O₂ y 0,2 mM de Tropolona.

El efecto observado en fruto de pimiento procedente de plantas tratadas con NaCl a partir de los 50 DDT se repitió cuando se aplicaron los mismos tratamientos 100 (Figura 4.20) y 150 DDT (Figura 4.21).

Cuando nos fijamos en el tiempo que la planta estuvo sometida al estrés salino (Figura 4.21), pudimos observar claramente como la actividad POD disminuyó conforme se retrasó en el tiempo la aplicación del tratamiento a la planta aproximándose al control a los 150 DDT. Esto es debido al menor tiempo que la planta estuvo sometida al estrés.

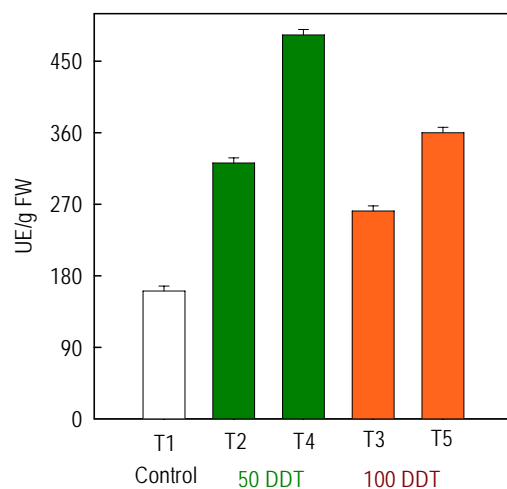


Figura 4.20. UE/g de pimienta recolectado el día 6/06/08 y procedente de plantas sometidas a diferentes concentraciones de NaCl (Tabla 3.3). (T1) Control, 0 mM de NaCl, (T2) 20 mM de NaCl durante 111 días, (T4) 40 mM de NaCl durante 111 días, (T3) 20 mM de NaCl durante 61 días y (T5) 40 mM de NaCl durante 61 días. El medio de reacción a 25 °C contenía en tampón citrato 50 mM a pH 4,5, 25 μ L de extracto de POD, 1 mM de ABTS, 6 mM de H_2O_2 y 0,2 mM de Tronolona.

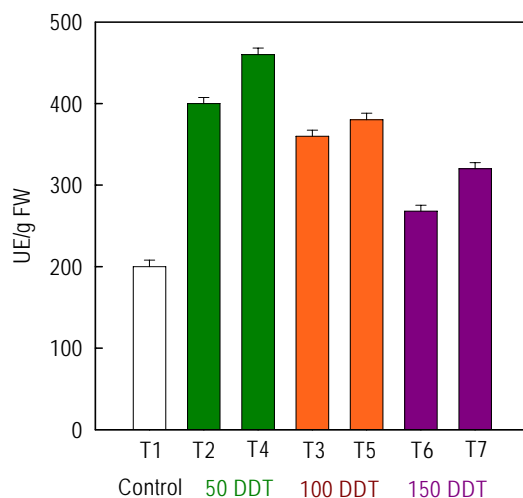


Figura 4.21. UE/g de pimienta recolectado el día 25/07/08 y procedente de plantas sometidas a diferentes concentraciones de NaCl (Tabla 3.3). (T1) Control, 0 mM de NaCl, (T2) 20 mM de NaCl durante 160 días, (T4) 40 mM de NaCl durante 160 días, (T3) 20 mM de NaCl durante 110 días y (T5) 40 mM de NaCl durante 110 días, (T6) 20 mM de NaCl durante 60 días y (T7) 40 mM de NaCl durante 60 días. El medio de reacción a 25 °C contenía en tampón citrato 50 mM a pH 4,5, 25 μ L de extracto de POD, 1 mM de ABTS, 6 mM de H_2O_2 y 0,2 mM de Tropolona.

4.4. EFECTO DE LAS CDs EN DIFERENTES PARÁMETROS DE CALIDAD DE PIMIENTO CONSERVADO EN V GAMA: COMPUESTOS FENÓLICOS, VITAMINA C, CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y COLOR.

En Estados Unidos, al igual que en Europa, el consumo de comida preparada se ha duplicado a lo largo de los últimos diez años, debido fundamentalmente a la evolución en los hábitos alimentarios, como consecuencia del impacto de los nuevos estilos de vida que han condicionado la organización familiar. La cocina rápida se impone como modo de consumo, empleando un tiempo medio de 20 min en la elaboración de la misma, frente a las 2 horas de generaciones anteriores. Por otro lado, se utilizan con más asiduidad los servicios de comida para llevar. Aún así, hay que tener en cuenta que el consumidor espera mucho más de estos alimentos, no sólo propiedades nutricionales sino beneficios para la salud (Karantonis *y col.*, 2006). Aquí, juega un papel fundamental la industria alimentaria, que debe conjugar las demandas y preferencias de los consumidores y además, conseguir que el sabor industrial se acerque al sabor de la cocina casera, demandas que satisfacen los alimentos de V gama.

4.4.1. Compuestos fenólicos

Un gran número de compuestos fenólicos son responsables de las propiedades organolépticas de los alimentos de origen vegetal y por tanto, de la calidad de algunos alimentos (Tomás-Barberán y Espín, 2001). Estos compuestos fenólicos son fácilmente oxidados por la luz, el calor y la presencia de oxígeno, dando lugar a variaciones en las propiedades organolépticas de los alimentos. La adición de CDs a estos alimentos puede suponer la complejación de parte de los compuestos fenólicos que poseen y por tanto su estabilización.

Las CDs son oligosacáridos cíclicos naturales, derivados del almidón, formados por 6, 7 u 8 unidades de α -D-glucopiranosas unidas por enlaces α -(1-4) (Saenger, 1980), denominadas α -, β -, y γ -CDs, respectivamente. Estas moléculas tienen una forma troncocónica con una superficie externa hidrofílica, por lo que son solubles en agua, y cuya cavidad interna es hidrofóbica, (Szejtli, 1985), lo que las convierte en

agentes capaces de complejar una amplia variedad de moléculas con distinto grado de hidrofobicidad, dando lugar a complejos de inclusión (**Figura 4.22**).

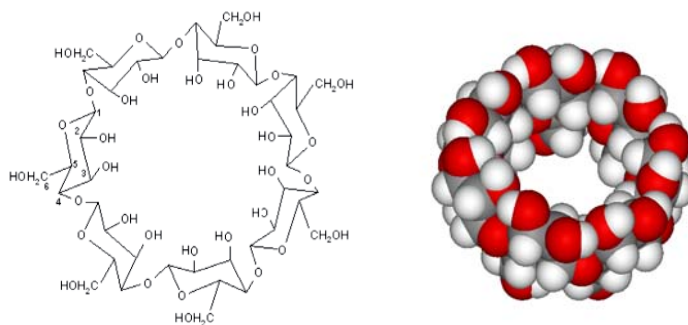


Figura 4.22. Estructura de β -CDs.

En el presente trabajo se estudió el efecto de la adición de β -CDs al líquido de gobierno de pimienta de V gama, en diferentes parámetros de calidad tras el almacenamiento a distintas temperaturas. Para ello, se elaboraron barquetas de pimienta asada en tiras con y sin la adición del 1% de β -CDs en el líquido de gobierno, se almacenaron a 4, 25 y 50 °C durante 5 meses y se analizaron cada mes, tal y como se describe en el **Capítulo 3**.

Cuando se estudió la evolución del contenido en compuestos fenólicos con el tiempo de almacenamiento de las barquetas de pimienta almacenadas a 4 °C, no se observaron diferencias significativas en las muestras analizadas durante 5 meses. Estos resultados fueron similares en presencia y ausencia de β -CDs (**Figura 4.23**).

Nuestros resultados podrían estar en consonancia con los obtenidos para pimienta donde también se mantuvo constante el contenido en compuestos fenólicos a bajas temperaturas (Avalos Llano *y col.*, 2007).

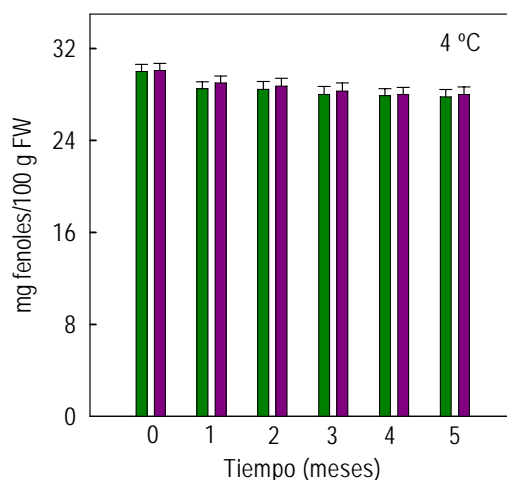


Figura 4.23. Contenido en compuestos fenólicos (mg fenoles/100 g FW) en pimiento de V gama en ausencia y presencia del 1% de β -CDs almacenados durante 5 meses a 4 °C. (Barras verdes, en ausencia de β -CDs y barras violetas, en presencia de β -CDs).

En el caso de las barquetas almacenadas a 25 °C (**Figura 4.24**), se pudo apreciar una disminución en el contenido de compuestos fenólicos, con el tiempo de almacenamiento, tanto en presencia como ausencia de β -CDs. Es importante resaltar que en presencia de β -CDs, esta disminución fue menor que en su ausencia (**Figura 4.24**).

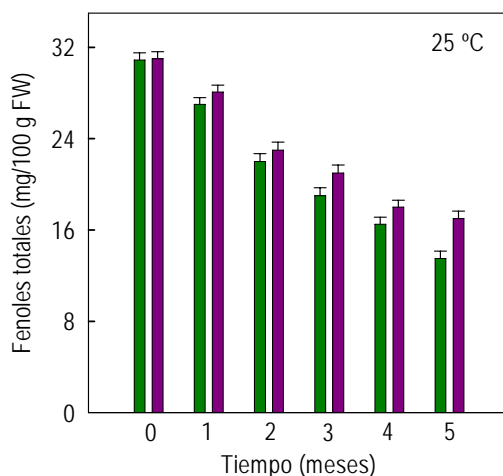


Figura 4.24. Contenido en compuestos fenólicos (mg fenoles/100 g FW) en pimiento de V gama en ausencia y presencia del 1% de β -CDs almacenados durante 5 meses a 25 °C. (Barras verdes, en ausencia de β -CDs y barras violetas, en presencia de β -CDs).

La disminución en el contenido de compuestos fenólicos de las barquetas almacenadas a 25 °C durante 5 meses llegó a ser del 55% sin β -CDs y 45% con β -CDs. Nuestros resultados podrían estar en consonancia con los obtenidos para pimiento donde también se mantuvo constante el contenido en compuestos fenólicos a bajas temperaturas (Avalos Llano *y col.*, 2007).

El efecto observado a 25 °C, fue mucho más acusado con el almacenamiento a 50 °C, tal y como cabía esperar (Figura 4.25). En este caso, en el primer mes de almacenamiento, el contenido en compuestos fenólicos descendió un 33% en ausencia de β -CDs, mientras que en su presencia, la disminución fue solamente del 13% (Figura 4.25). A partir del 2º mes, la concentración de fenoles siguió bajando tanto en presencia como en ausencia de β -CDs, pero con diferente velocidad.

En ausencia de CDs, pasados 5 meses la concentración de compuestos fenólicos había descendido un 70%, mientras que en presencia del 1% de β -CDs la disminución fue del 60%.

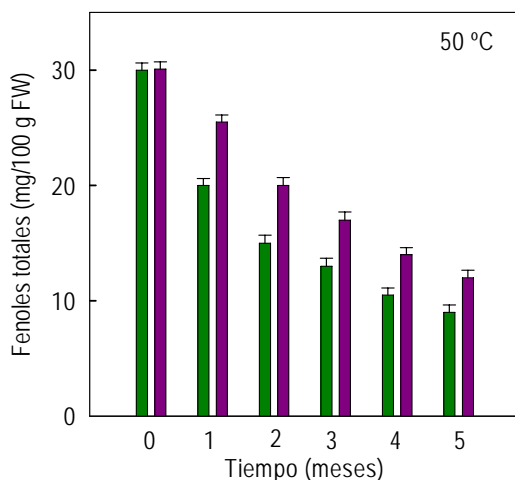


Figura 4.25. *Contenido en compuestos fenólicos (mg fenoles/100 g FW) en pimiento de V gama en ausencia y presencia del 1% de β -CDs almacenados durante 5 meses a 50 °C. (Barras verdes, en ausencia de β -CDs y barras violetas, en presencia de β -CDs).*

Estos resultados indicaban claramente un efecto protector de las β -CDs sobre los compuestos fenólicos de pimiento, debido a su complejación en la cavidad hidrofóbica de los azúcares cíclicos (Figura 4.26). Esta complejación protegía a dichos

compuestos de su oxidación frente a diferentes factores como pueda ser luz o temperatura.

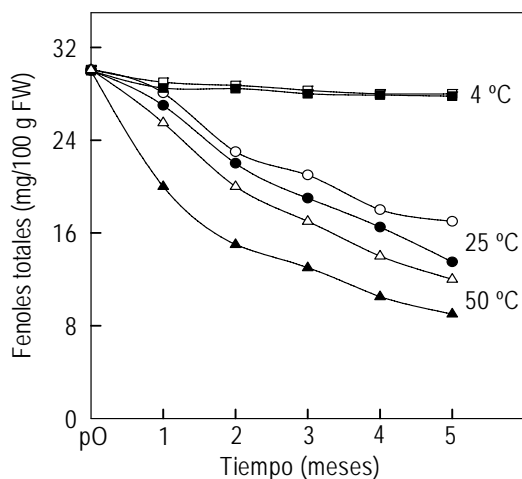


Figura 4.26. Evolución del contenido en compuestos fenólicos (mg fenoles/100 g FW) en pimiento de *V. gamma* almacenado a diferentes temperaturas en presencia y ausencia del 1% de β -CDs. ((□) 4 °C en presencia de β -CDs, (■) 4 °C en ausencia de β -CDs, (○) 25 °C en presencia de β -CDs, (●) 25 °C en ausencia de β -CDs, (△) 50 °C en presencia de β -CDs y (▲) 50 °C en ausencia de β -CDs).

4.4.2. Nivel de vitamina C

Cuando estudiamos el efecto de la adición de β -CDs al líquido de gobierno, en la evolución de la vitamina C durante los 5 meses de almacenamiento de las barquetas a 4 °C, observamos una ligera tendencia a la baja de la vitamina con el tiempo, si bien fue prácticamente inapreciable tanto en presencia como en ausencia de β -CDs (Figura 4.27).

En el caso de las barquetas almacenadas a 25 °C, se observó un importante deterioro de la vitamina C con el tiempo (Figura 4.28). Tal y como se observa en la Figura 4.28, en ausencia de CDs, el deterioro de la vitamina C durante los 5 meses de almacenamiento fue del 75%, mientras que en presencia de CDs, esta disminución fue del 62%. Este resultado puso de manifiesto el efecto protector de las CDs a dicha temperatura.

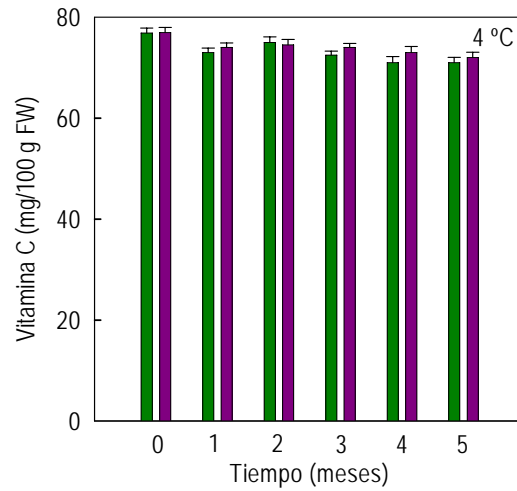


Figura 4.27. Contenido en vitamina C (mg/100 g FW) en pimiento de V gama en ausencia y presencia del 1% de β -CDs almacenados durante 5 meses a 4 °C. (Barras verdes, en ausencia de β -CDs y barras violetas, en presencia de β -CDs).

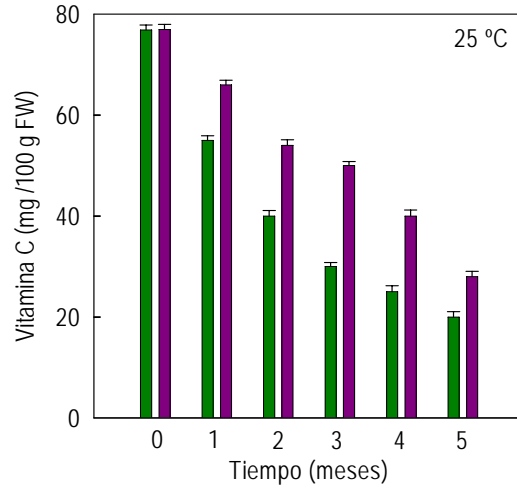


Figura 4.28. Contenido en vitamina C (mg/100 g FW) en pimiento de V gama en ausencia y presencia del 1% de β -CDs almacenados durante 5 meses a 25 °C. (Barras verdes, en ausencia de β -CDs y barras violetas, en presencia de β -CDs).

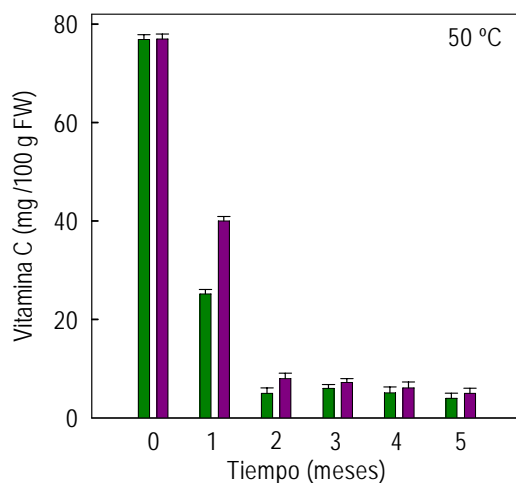


Figura 4.29. Contenido en vitamina C (mg/100 g FW) en pimienta de V gama en ausencia y presencia del 1% de β -CDs almacenados durante 5 meses a 50 °C. (Barras verdes, en ausencia de β -CDs y barras violetas, en presencia de β -CDs).

Cuando estudiamos la evolución de la vitamina C con el tiempo de almacenamiento a 50 °C, se observó un descenso brusco de la vitamina en el primer mes (**Figura 4.29**). Durante este tiempo, se perdió el 80% de vitamina C en ausencia de CDs, mientras que sólo se perdió un 70% de la vitamina en presencia del 1% de β -CDs, poniéndose de manifiesto el efecto protector de las CDs. Pasados 2 meses de almacenamiento, el contenido en vitamina C de las barquetas fue aproximadamente del 10% tanto en presencia como en ausencia de CDs, indicando que las condiciones eran tan adversas, que el efecto protector de las CDs ya no era apreciable (**Figura 4.29**).

En la **Figura 4.30**, queda resumido el efecto de las CDs sobre la protección de la vitamina C en las barquetas de pimienta de V gama a diferentes temperaturas.

Este efecto protector de la vitamina C por parte de las β -CDs ha sido previamente descrito por Núñez-Delicado *y col.* (1997) en donde se las describe como antioxidantes secundarios. Las β -CDs son capaces de complejar a los compuestos fenólicos del pimienta, (tal y como se ha descrito anteriormente), protegiéndolos de su oxidación y evitando, por tanto, que sus productos de degradación ataquen a la vitamina C, degradándola.

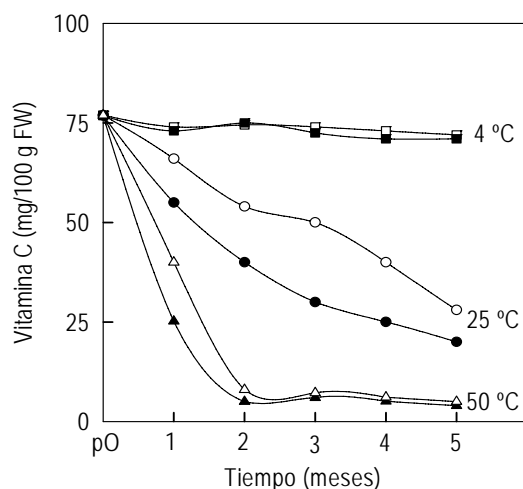


Figura 4.30. Evolución del contenido en vitamina C (mg/100 g FW) en pimienta de *V. gamma* almacenada a diferentes temperaturas en presencia y ausencia del 1% de β -CDs. ((\square) 4 °C en presencia de β -CDs, (\blacksquare) 4 °C en ausencia de β -CDs, (\circ) 25 °C en presencia de β -CDs, (\bullet) 25 °C en ausencia de β -CDs, (Δ) 50 °C en presencia de β -CDs y (\blacktriangle) 50 °C en ausencia de β -CDs).

4.4.3. Capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante de un alimento es un parámetro interesante para valorar la calidad dietética del producto en cuestión (Arnao *et al.*, 1998).

La capacidad antioxidante de frutas y verduras proviene de compuestos como las vitaminas C y E, β -caroteno y polifenoles de plantas (flavonoles, flavanoles, antocianidinas y fenilpropanoides) (Rive-Evans *et al.*, 1996).

El procesado térmico de frutas y verduras a altas temperaturas, si bien elimina la posibilidad de daño microbiológico y reduce la actividad enzimática, afecta a la calidad del producto y a su capacidad antioxidante. En general, frutas y verduras tienen elevados valores de ácido ascórbico y otros ácidos orgánicos, lo que provoca la degradación de azúcares, aminoácidos y fenoles durante el procesado y el almacenamiento (Lee *et al.*, 1988).

Cuando estudiamos la evolución de la actividad antioxidante de las barquetas de pimienta almacenadas a 4 °C, observamos que apenas variaba con el tiempo de almacenamiento (**Figura 4.31**), tanto en presencia como ausencia de β -CDs. Este resultado es similar al descrito en el caso de los compuestos fenólicos (**apartado 4.4.1**) y de vitamina C (**apartado 4.4.2**).

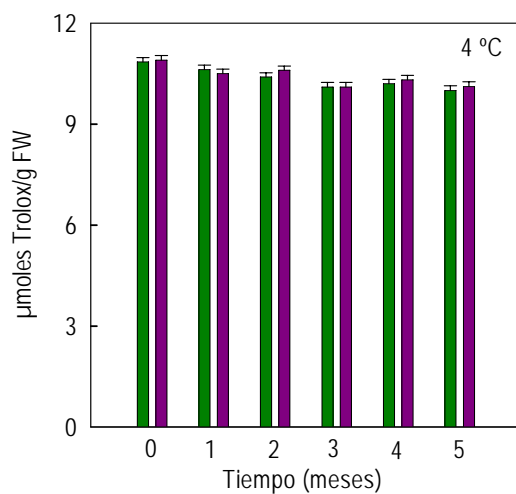


Figura 4.31. *Actividad antioxidante (µmoles Trolox/g FW) de pimienta de V gama en ausencia y presencia del 1% de β-CDs almacenados durante 5 meses a 4 °C. (Barras verdes, en ausencia de β-CDs y barras violetas, en presencia de β-CDs).*

En el caso de las barquetas almacenadas a 25 °C, se observó un descenso de la actividad antioxidante con el tiempo, tanto en presencia como ausencia de β-CDs (Figura 4.32), si bien ese descenso fue mayor en ausencia de β-CDs.

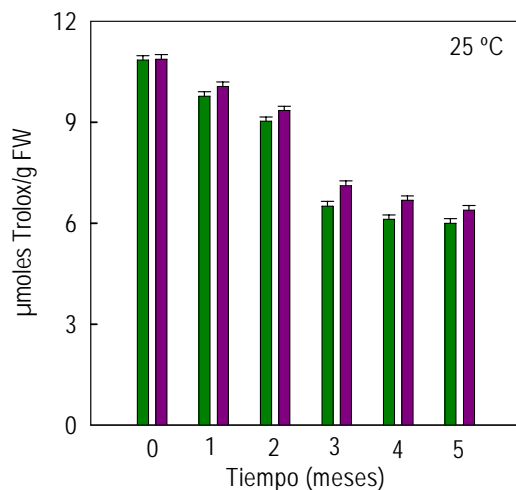


Figura 4.32. *Actividad antioxidante (µmoles Trolox/g FW) de pimienta de V gama en ausencia y presencia del 1% de β-CDs almacenados durante 5 meses a 25 °C. (Barras verdes, en ausencia de β-CDs y barras violetas, en presencia de β-CDs).*

Pasados 5 meses de almacenamiento, en ausencia de CDs el descenso de la actividad antioxidante fue del 45%, mientras que en presencia del 1% de β -CDs ese descenso fue del 36%.

Con el almacenamiento a 50 °C (**Figura 4.33**), la actividad antioxidante de las barquetas descendió más bruscamente desde el primer mes de almacenamiento, llegando a los 5 meses a tener un 27% respecto del control en ausencia de β -CDs, y un 41% en su presencia.

Estos resultados nos mostraron nuevamente el efecto protector de las β -CDs sobre los compuestos responsables de la actividad antioxidante del pimiento.

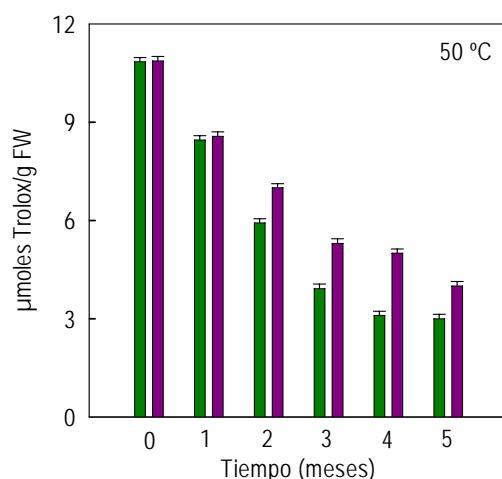


Figura 4.33. *Actividad antioxidante (μ moles Trolox/g FW) de pimiento de V gama en ausencia y presencia del 1% de β -CDs almacenados durante 5 meses a 50 °C. (Barras verdes, en ausencia de β -CDs y barras violetas, en presencia de β -CDs).*

Tal y como se observa en la **Figura 4.34**, la presencia del 1% de β -CDs en el líquido de gobierno, protege a los compuestos responsables de la actividad antioxidante del pimiento. Este efecto protector de las CDs actuando como antioxidantes secundarios (Núñez-Delicado *et al.*, 2005) se pone más de manifiesto cuando aumenta la temperatura de almacenamiento (**Figura 4.34**).

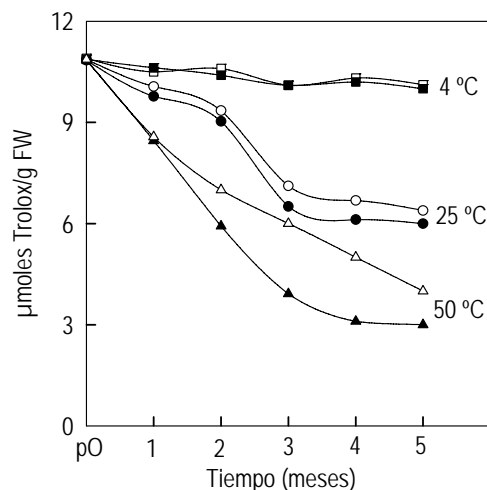


Figura 4.34. Evolución de la actividad antioxidante ($\mu\text{moles Trolox/g FW}$) de pimienta de V gama almacenada a diferentes temperaturas en presencia y ausencia del 1% de $\beta\text{-CDs}$. ((□) 4 °C en presencia de $\beta\text{-CDs}$, (■) 4 °C en ausencia de $\beta\text{-CDs}$, (○) 25 °C en presencia de $\beta\text{-CDs}$, (●) 25 °C en ausencia de $\beta\text{-CDs}$, (△) 50 °C en presencia de $\beta\text{-CDs}$ y (▲) 50 °C en ausencia de $\beta\text{-CDs}$).

4.4.4. Parámetros de color

Por último estudiamos el efecto de la adición del 1% de $\beta\text{-CDs}$ al líquido de gobierno de pimienta de V gama, sobre la evolución del color durante el tiempo de almacenamiento a diferentes temperaturas. Para ello, estudiamos la evolución de los diferentes parámetros de color CIELab (L^* , a^* y b^*).

Cuando estudiamos la evolución del parámetro L^* (luminosidad: 100 blanco, 0 negro) de las barquetas almacenadas a 4 °C, durante 5 meses, no se observó ninguna variación tanto en presencia como en ausencia de $\beta\text{-CDs}$ (Tabla 4.6).

Respecto a la evolución del parámetro a^* (-a verde, +a rojo), con el tiempo de almacenamiento a 4 °C, éste siguió un patrón similar al descrito para L^* , es decir, no varió durante los 5 meses de almacenamiento tanto en presencia como en ausencia de $\beta\text{-CDs}$. De igual forma, el parámetro b^* , tampoco varió con el tiempo, cuando las barquetas se almacenaron a 4 °C, en presencia y ausencia de $\beta\text{-CDs}$ (Tabla 4.6).

El croma (C^*) y el ángulo HUE, parámetros que se calculan a partir de los valores de a^* y b^* , tuvieron un comportamiento idéntico al descrito para dichos

parámetros, es decir, las barquetas almacenadas a 4 °C durante 5 meses no mostraron cambios de color tanto en presencia como en ausencia de β -CDs (**Tabla 4.6**).

Cuando las barquetas se almacenaron a 25 °C, durante 5 meses, el parámetro L^* sufrió un ligero descenso en ausencia de β -CDs, es decir, se oscureció la muestra mientras que permaneció prácticamente constante en presencia de β -CDs (**Tabla 4.7**).

Respecto al parámetro a^* , durante los 5 meses de almacenamiento, se observó un ligero descenso en ausencia de CDs, que estuvo prácticamente ausente en presencia β -CDs (**Tabla 4.7**).

El parámetro b^* , varió ligeramente con el tiempo, cuando las barquetas se almacenaron a 25 °C, y en la misma medida en presencia y ausencia de β -CDs (**Tabla 4.7**).

Sin embargo, al estudiar el C^* de las barquetas almacenadas a 25 °C se pudieron observar valores más altos a los 5 meses de almacenamiento en presencia de β -CDs ($60,37 \pm 0,8$) que en su ausencia ($58,75 \pm 1$), por lo que se puede concluir que las barquetas almacenadas a 25 °C en presencia de β -CDs presentan una mayor intensidad de color rojizo que las barquetas almacenadas a 25 °C en ausencia de β -CDs (**Tabla 4.7**).

Tabla 4.6. Evolución del color de pimiento de *V gama* con el tiempo de almacenamiento a 4 °C, en presencia y ausencia de 1% de β -CDs.

Parámetros CIELab	Tiempo de almacenamiento (meses) a 4 °C					
	0	1	2	3	4	5
L* sin CDs	31,16±1,8	30,12±0,7	30,14±1,0	30,53±1,1	30,88±1,3	29,62±1,2
L* con CDs	31,16±1,8	30,12±1,1	30,97±0,9	30,43±0,7	31,05±1,2	29,30±2,3
a* sin CDs	47,21±1,1	47,40±1,3	46,58±1,0	46,84±1,2	47,89±1,1	46,90±0,7
a* con CDs	47,21±1,1	47,40±1,2	47,64±0,7	46,75±1,0	46,39±0,9	47,30±1,3
b* sin CDs	47,15±1,0	46,87±0,9	45,15±1,0	45,73±1,1	47,92±1,2	45,50±0,8
b* con CDs	47,15±1,0	46,87±1,1	47,75±0,7	45,77±1,2	47,29±1,3	45,28±0,9
C* sin CDs	66,72±0,7	66,66±0,7	64,87±0,9	65,46±1,0	67,75±1,1	65,34±1,2
C* con CDs	66,72±0,7	66,66±0,9	67,45±1,2	65,42±1,1	66,25±1,3	65,48±1,0
Ángulo HUE sin CDs	44,96±1,3	44,67±0,7	44,10±0,9	44,31±1,0	45,01±1,1	44,13±1,2
Ángulo HUE con CDs	44,96±1,3	44,67±1,0	45,06±1,1	44,39±1,2	45,55±0,9	43,75±1,3

Tabla 4.7. Evolución del color de pimiento de *V gama* con el tiempo de almacenamiento a 25 °C, en presencia y ausencia de 1% de β -CDs.

Parámetros CIELab	Tiempo de almacenamiento (meses) a 25 °C					
	0	1	2	3	4	5
L* sin CDs	31,16±1,0	30,47±0,7	29,78±1,1	28,00±1,0	27,00±1,2	27,00±1,3
L* con CDs	31,16±1,0	29,97±1,1	29,89±0,8	29,76±0,9	29,47±1,3	29,28±0,7
a* sin CDs	47,21±1,3	46,95±1,3	46,17±1,2	42,00±0,7	41,00±1,0	40,59±1,1
a* con CDs	47,21±1,3	47,68±0,8	46,18±0,7	44,93±1,1	44,16±0,9	43,00±1,2
b* sin CDs	45,80±0,9	47,05±0,7	44,46±0,9	44,57±1,3	43,24±1,1	42,48±1,0
b* con CDs	45,80±0,9	47,47±1,1	45,51±1,3	44,19±0,7	44,92±1,0	42,38±0,8
C* sin CDs	65,84±0,7	66,46±1,2	64,09±1,1	61,24±1,3	59,59±0,8	58,75±1,0
C* con CDs	65,84±0,7	67,28±0,9	64,83±1,3	63,01±1,0	62,99±1,1	60,37±0,8
Ángulo HUE sin CDs	44,18±1,2	45,06±1,2	43,91±1,1	46,70±0,9	46,52±1,0	46,30±0,7
Ángulo HUE con CDs	44,18±1,2	44,87±0,9	44,58±0,7	44,52±1,1	45,48±1,3	44,58±1,0

Cuando las barquetas se almacenaron a 50 °C, el parámetro de luminosidad L^* sufrió un fuerte descenso durante los 5 meses de almacenamiento, (de $31,65 \pm 0,9$ a $16 \pm 1,3$) indicando un importante oscurecimiento de las barquetas en ausencia de β -CDs (**Tabla 4.8**). En presencia de β -CDs, este descenso de L^* fue mucho menor, (de $31,165 \pm 0,9$ a $21 \pm 1,2$) indicando un menor oscurecimiento de la muestra (**Tabla 4.8**).

En el caso del parámetro a^* , cuando se almacenaron las barquetas a 50 °C, se observó un importante descenso en ausencia de β -CDs, siendo éste menos acusado en presencia de β -CDs (**Tabla 4.8**).

Este descenso de a^* indica un pardeamiento de las barquetas con el tiempo de almacenamiento, siendo éste mucho más acusado en ausencia de β -CDs y a temperaturas elevadas.

Por otra parte, también estudiamos la evolución del parámetro de color b^* (-b azul, +b amarillo), aunque su evolución es mucho menos significativa en la coloración del pimiento. El patrón que siguió su evolución fue similar a los descritos para L^* y a^* , no mostrando variación a 4 °C, tanto en ausencia como presencia de β -CDs (**Tabla 4.6**).

Tan solo se observó variación en el parámetro de color b^* , cuando las barquetas se almacenaron a 50 °C, siendo más acusada la caída en ausencia de β -CDs que en su presencia (**Tabla 4.8**). Este descenso en b^* , nos indicó un pardeamiento de las barquetas, ya que los valores se aproximaron al centro de la esfera de color.

Cuando calculamos el C^* de las barquetas almacenadas a 50 °C se observó un descenso mucho mayor del C^* en ausencia de β -CDs (de $66,72 \pm 1,2$ a $29,48 \pm 0,7$) que en su presencia (de $66,72 \pm 1,2$ a $36,79 \pm 1$), indicando un mayor acercamiento del C^* al centro de la esfera de color en ausencia de β -CDs, o lo que es lo mismo, un mayor pardeamiento de la muestra.

Para tener una idea general de la evolución del color de las barquetas, calculamos el valor de ΔE en todos los casos. Este parámetro de color integra en un solo valor tanto los parámetros de cromaticidad a^* y b^* , como el parámetro de luminosidad L^* .

Como se observa en la **Figura 4.35**, el valor de ΔE evolucionó ligeramente cuando las barquetas se almacenaron a 25 °C, permaneciendo prácticamente inalterado en presencia de β -CDs.

Tabla 4.8. Evolución del color de pimiento de *V gama* con el tiempo de almacenamiento a 50 °C, en presencia y ausencia de 1% de β -CDs.

Parámetros CIELab	Tiempo de almacenamiento (meses) a 50 °C					
	0	1	2	3	4	5
L* sin CDs	31,65±0,9	28,73±1,2	24,61±0,7	20,97±1,1	18,00±1,0	16,00±1,3
L* con CDs	31,65±0,9	30,57±1,1	27,50±1,3	26,00±0,8	22,00±0,7	21,00±1,2
a* sin CDs	46,48±0,7	43,82±1,2	34,06±0,9	28,28±1,1	26,32±0,7	18,82±1,3
a* con CDs	46,48±0,7	45,62±0,9	36,43±1,3	33,38±1,2	30,91±1,1	25,00±1,0
b* sin CDs	47,21±1,0	42,27±1,0	35,22±0,9	29,16±0,7	27,97±1,3	22,70±1,1
b* con CDs	47,21±1,0	47,30±0,9	35,81±1,2	34,82±1,0	30,61±1,1	27,0±1,3
C* sin CDs	66,72±1,2	60,88±1,1	48,99±0,7	40,62±0,9	38,41±1,3	29,48±0,7
C* con CDs	66,72±1,2	65,71±0,9	51,08±1,3	48,23±1,1	43,51±1,2	36,79±1,0
Ángulo HUE sin CDs	44,96±0,9	43,96±0,7	45,95±0,9	45,87±1,2	46,74±1,1	50,33±0,7
Ángulo HUE con CDs	44,96±0,9	46,03±1,3	44,50±0,7	46,20±1,1	44,72±0,7	47,20±1,2

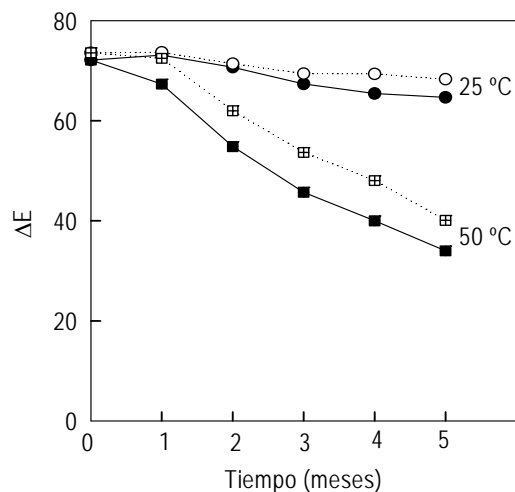


Figura 4.35. Evolución del ΔE en pimiento de V gama almacenado a diferentes temperaturas en presencia y ausencia del 1% de β -CDs. ((\circ) 25 °C en presencia de β -CDs, (\bullet) 25 °C en ausencia de β -CDs, (\square) 50 °C en presencia de β -CDs y (\blacksquare) 50 °C en ausencia de β -CDs).

Sin embargo, cuando las barquetas se almacenaron a 50 °C, el valor de ΔE descendió tanto en presencia como ausencia de β -CDs, indicando un oscurecimiento de la muestra en ambos casos.

Es importante destacar que en presencia de β -CDs, esta evolución del color fue menor que en su ausencia, es decir, la presencia de β -CDs ralentizó el oscurecimiento de las barquetas (Figura 4.35).

Este efecto protector del color de las β -CDs está relacionado con la complejación de parte de los compuestos responsables del pardeamiento del pimiento, retrasando, por tanto, su evolución. Este efecto de las β -CDs ha sido previamente descrito para la evolución del color de zumo de uva recién exprimido (Núñez-Delicado *y col.*, 2005).

4.5. CARACTERIZACIÓN DE POD DE PIMIENTO

La purificación de enzimas de origen vegetal, es un proceso complicado debido a la presencia de una gran variedad de metabolitos secundarios, que pueden

actuar directamente sobre las enzimas modificando sus características (Loomis, 1974). Para superar estos obstáculos, se han descrito diferentes métodos de purificación, tales como, el uso de polvo acetónico, fraccionamiento por sulfato amónico, polímeros insolubles y detergentes (Núñez-Delicado *y col.*, 2003), entre los que se encuentra el Triton X-114, que tiene la particularidad de formar soluciones transparentes con agua, a 4 °C, mientras que a 20 °C forma dos fases claramente diferenciadas debido a la aparición de grandes agregados micelares. Este detergente, es habitualmente usado para separar proteínas hidrofóbicas (Bordier, 1981), eliminar compuestos fenólicos (Núñez-Delicado *y col.*, 1996; Núñez-Delicado *y col.*, 2003) y clorofilas (Sánchez-Ferrer *y col.*, 1989).

En el presente trabajo, POD de pimiento rojo cultivado bajo sistema de producción integrado, fue parcialmente purificada, usando un procedimiento combinado de partición de fases con Triton X-114 y fraccionamiento con sulfato amónico, para evitar cambios en las características de la enzima debido a la unión de metabolitos secundarios y eliminar pigmentos carotenoides del extracto, obteniendo así una solución transparente como fuente de enzima.

Debido a la presencia de altas cantidades de vitamina C en pimiento, no fue necesario añadir Triton X-114 en el primer paso de la extracción, para evitar el pardeamiento enzimático del extracto. Así, tras la homogeneización del pimiento en presencia de tampón fosfato sódico 100 mM pH 7,3, se obtuvo una disolución roja, a la que llamamos extracto crudo (**Tabla 4.9**).

Para eliminar los pigmentos carotenoides responsables del color rojo del extracto, se añadió Triton X-114 al 4% (p/v) y la solución se sometió a partición de fases, aumentando la temperatura de la muestra a 37 °C durante 15 min. Con esta separación de fases, se produjo una pérdida del 41% de proteínas y del 12% de actividad POD, además de una reducción del 50% en el nivel de fenoles (**Tabla 4.9**), obteniéndose un sobrenadante transparente libre de color rojo. A continuación, se llevo a cabo el fraccionamiento con sulfato amónico entre el 30 y el 80%, obteniendo un grado de purificación de 2,3 veces y una recuperación del 66% (**Tabla 4.9**).

Tabla 4.9. Purificación parcial de POD de pimiento rojo (*Capsicum annuum* L., cultivo Almuden).

	Vol (mL)	Proteínas totales (mg)	Actividad total ^a (unidades)	Actividad específica (unidades/mg)	Purificación (-veces)	Recuperación (%)	Compuestos fenólicos (mg/mL)
Extracto crudo	130	76,2	298,7	3,9	1	100	0,6
Sobrenadante 4 % TX-114	113	44,9	262,5	5,8	1,5	88	0,3
30-80 % (NH₄)SO₄	6	21,9	195,7	8,9	2,3	66	0,1

^aEnsayo con ABTS como sustrato.

La reducción del nivel de compuestos fenólicos fue similar a la descrita para la purificación con Triton X-114 de polifenol oxidasa de patata, champiñón y persimmon (Sánchez-Ferrer *y col.*, 1993; Núñez-Delicado *y col.*, 1996; Núñez-Delicado *y col.*, 2003). Esta eliminación de fenoles con Triton X-114 es suficiente para evitar el pardeamiento del extracto enzimático, después de varios ciclos de congelación y descongelación o tras meses de almacenamiento a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Además, el uso del Triton X-114, permitió obtener un extracto enzimático limpio, sin pigmentos rojos, que pudieran interferir en las medidas de actividad enzimática. La POD, parcialmente purificada, de pimiento rojo, apareció como una sola banda electroforética (**Figura 4.36**) cuando se usó 4MN como sustrato.

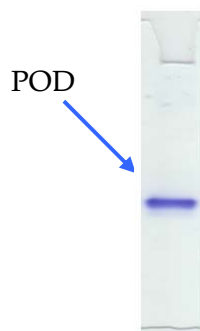


Figura 4.36. *Electroforesis en gel de poliacrilamida al 8 % de POD de pimiento. Teñida con tampón citrato sódico 50 mM pH 5,0, conteniendo 0,45 mM de H_2O_2 y 1mM de 4MN.*

Este resultado, difiere de lo descrito hasta ahora en la literatura, donde la extracción de POD a partir de otras fuentes vegetales (Duarte-Vázquez *y col.*, 2000) rinde múltiples bandas isoenzimáticas. Esto, puede deberse al método de extracción usado en el presente trabajo (combinación de partición de fases con Triton X-114 y precipitación con sulfato amónico 30-80%), que permite la extracción de una sola isoenzima, a la vez que se eliminan los fenoles, evitando así una posible modificación de la enzima extraída. La actividad enzimática de POD, se midió usando ABTS como donador y H_2O_2 como aceptor de electrones, en presencia de Tropona (inhibidor específico de polifenol oxidasa) para descartar cualquier contribución de polifenol oxidasa en el desarrollo de la reacción.

Como se puede observar en la **Figura 4.37**, el pH óptimo de la enzima fue 4,5. Este resultado, concuerda con lo descrito para POD de nabo, usando ABTS como sustrato (Duarte-Vázquez *y col.*, 2000). Está ampliamente descrito, que el pH óptimo de POD depende del sustrato usado como donador de electrones (Halpin *y col.*, 1989), es por eso que solo hemos podido comparar nuestros resultados con los obtenidos para POD de nabo.

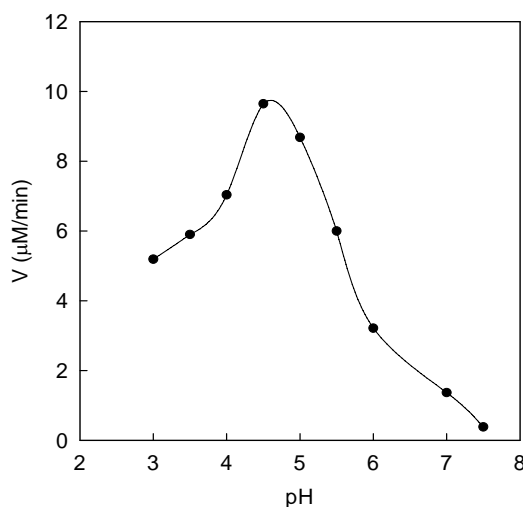


Figura 4.37. Efecto del pH en la actividad POD de pimiento parcialmente purificada en 50 mM de tampón citrato sódico (pH 3,0-5,5) y 50 mM de tampón fosfato sódico (pH 6,0-7,5). El medio de reacción a 25 °C contenía en tampón, 1 mM de ABTS, 6 mM de H₂O₂, 0,2 mM de Tropolona y 1 ng/mL de POD parcialmente purificada.

Para llevar a cabo la caracterización cinética de POD de pimiento, también se calcularon los parámetros cinéticos (V_m y K_M) para ABTS y H₂O₂. La velocidad de oxidación de ABTS por POD de pimiento, fue dependiente de la concentración de ABTS hasta llegar a saturación a 2 mM (**Figura 4.38**); a partir de aquí, la velocidad de la reacción permaneció constante. Se obtuvo un valor de K_M de 0,495 mM para ABTS y una $V_{máx}$ de 13 μM/min., mediante regresión no lineal de los datos experimentales de la **Figura 4.38**, a la ecuación de Michaelis:

$$v = \frac{V_{máx} [S]}{K_M + [S]}$$

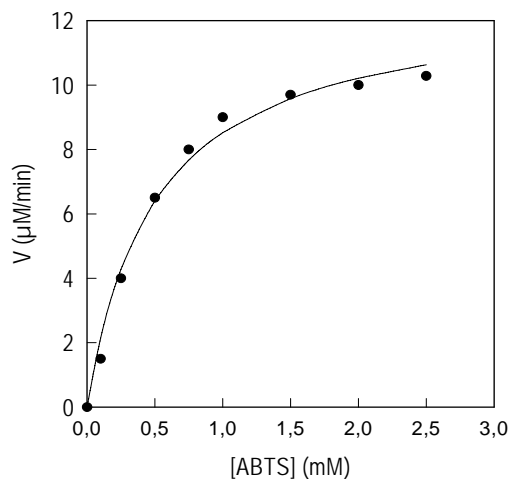


Figura 4.38. Efecto de la concentración de ABTS en la actividad POD de pimienta. El medio de reacción contenía en tampón citrato sódico 50 mM pH 4,5, 1 ng/mL de POD parcialmente purificada, 0,2 mM de Tropolona, 6 mM de H_2O_2 y concentraciones crecientes de ABTS entre 0 y 2,5 mM.

La velocidad de la reacción también fue dependiente de la concentración de H_2O_2 , mostrando una curva de saturación con una K_M de 1,32 mM y una $V_{\text{máx}}$ de 12,5 $\mu\text{M}/\text{min}$ (Figura 4.39).

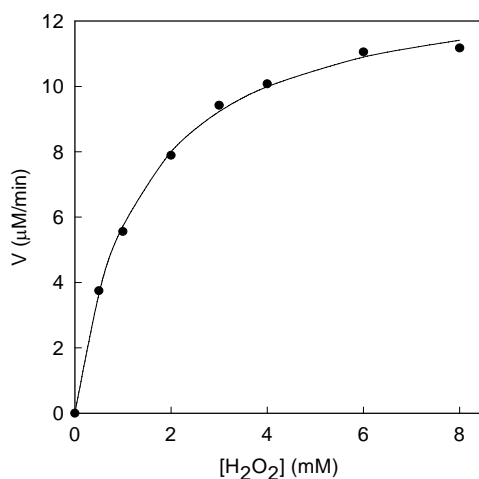


Figura 4.39. Efecto de la concentración de H_2O_2 en la actividad POD de pimienta. El medio de reacción contenía en tampón citrato sódico 50 mM pH 4,5, 1 ng/mL de POD parcialmente purificada, 0,2 mM de Tropolona, 1 mM de ABTS y concentraciones crecientes de H_2O_2 entre 0 y 8 mM.

Estos resultados, contrastan con los descritos para POD de rábano, espárrago y nabo (Arnao *y col.*, 1990; Hiner *y col.*, 1996; Rodrigo *y col.*, 1996; Duarte-Vázquez *y col.*, 2000), para las que se ha descrito inhibición por alta concentración de sustrato para H_2O_2 . El valor de K_M obtenido para ABTS, fue similar al descrito para la fracción C3 de POD de nabo (0,47 mM; Duarte-Vázquez *y col.*, 2000), mientras que fue 10 veces inferior a la descrita para POD ácida de rábano (4 mM; Hiner *y col.*, 1996) y 2 veces superior a la descrita para la POD de las coles de Bruselas (0,2 mM; Regalado *y col.*, 1999). El valor de K_M obtenido para el H_2O_2 (1,32 mM) fue muy superior a los descritos para POD de otras fuentes (Regalado *y col.*, 1999). Es importante conocer estos valores de K_M para ABTS y H_2O_2 , no solo para caracterizar la enzima, sino por su posible uso en inmunoensayos.

La oxidación de ABTS, mantuvo una dependencia lineal con la cantidad de extracto usado, hasta una concentración de 1,4 ng/mL de proteína (**Figura 4.40**).

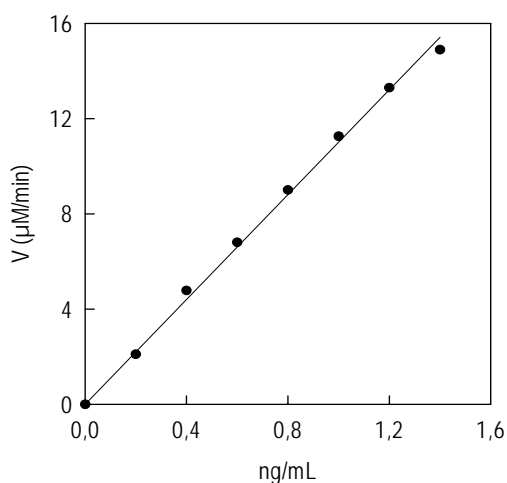


Figura 4.40. Efecto de la concentración de enzima en la actividad POD de pimiento. El medio de reacción contenía en tampón citrato sódico 50 mM pH 4,5, 0,2 mM de Tropolona, 1 mM de ABTS, 6 mM de H_2O_2 y concentraciones crecientes de POD parcialmente purificada.

Para completar la caracterización de la enzima, también se estudió el efecto inhibitorio de agentes reductores en la actividad enzimática. En las **Figuras 4.41 y 4.42**, se observa el efecto de varios agentes reductores (ácido ascórbico, L-cisteína y metabisulfito) sobre la actividad enzimática de POD de pimiento, usando ABTS como sustrato.

El ácido ascórbico, que se encuentra en grandes cantidades en el pimiento, fue el inhibidor más efectivo entre los estudiados (**Figura 4.41**), actuando más como antioxidante que como inhibidor enzimático, ya que reduce el radical $ABTS^{\bullet}$ a su forma original. A una concentración de 30 μ M de ácido ascórbico, la actividad residual de la enzima bajó hasta 0.

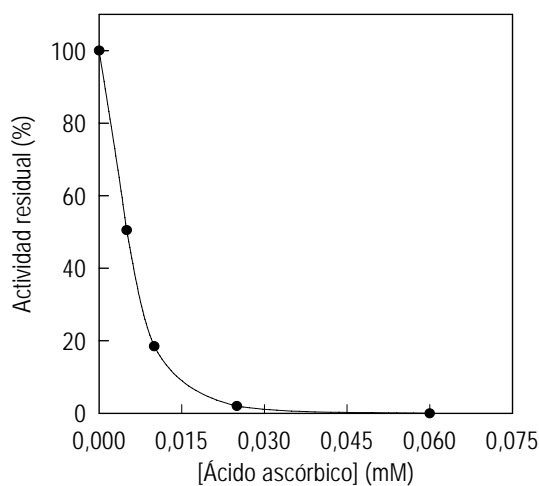


Figura 4.41. *Efecto inhibitorio del ácido ascórbico en POD de pimiento usando ABTS como sustrato. El medio de reacción a 25 °C contenía en tampón citrato sódico 50 mM pH 4,5, 1 mM ABTS, 6 mM H₂O₂, 0,2 mM Tropolona, 1 ng/mL de POD parcialmente purificada y concentraciones crecientes de ácido ascórbico, desde 0 a 0,06 mM.*

La inhibición producida por los compuestos azufrados estudiados (L-cisteína y metabisulfito) (**Figura 4.42**) fue más baja que la producida por ácido ascórbico (**Figura 4.41**). Esto podría ser debido a una reacción de adición del inhibidor con el radical $ABTS^{\bullet}$ para formar un producto estable y/o a la unión de dichos inhibidores al centro activo de la enzima, como ocurre en el caso del metabisulfito con polifenol oxidasa (**Figura 4.42**) (Ikediobi y Obasuyi, 1982; Valero *et al.*, 1992). En el caso de L-cisteína, para alcanzar la inhibición total hubo que subir la concentración por encima de 4 mM, y en el caso del metabisulfito se consiguió con una concentración 1 mM.

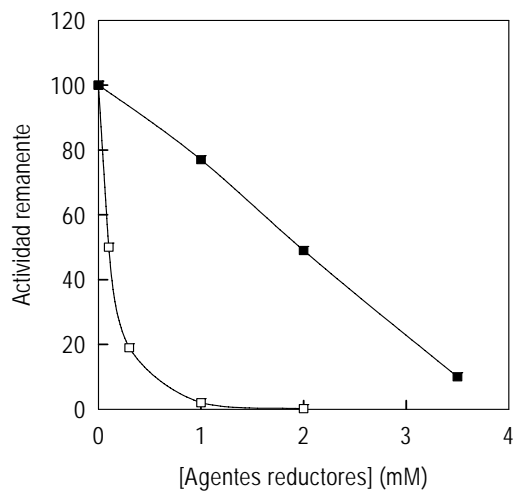


Figura 4.42. Efecto inhibitorio de L-cisteína (■) y metabisulfito (□) en POD de pimienta usando ABTS como sustrato. El medio de reacción a 25 °C contenía en tampón citrato sódico 50 mM pH 4,5, 1 mM de ABTS, 6 mM de H₂O₂, 0,2 mM de Tropolona, 1 ng/mL de POD parcialmente purificada y concentraciones crecientes de L-cisteína (■) y metabisulfito (□) entre 0 y 3,5 mM.

Para completar el estudio de POD de pimienta, también se analizó su estabilidad térmica. Para ello se incubaron alícuotas de enzima a diferentes temperaturas y se midió su actividad residual.

La **Figura 4.43**, muestra que la representación del logaritmo de la actividad residual de la enzima frente al tiempo de calentamiento tiene una dependencia lineal a todas las temperaturas estudiadas.

Este patrón se ajusta a una cinética de inactivación de primer orden. El hecho de que todas las rectas de inactivación partan de un mismo punto (**Figura 4.43**), indica que estamos midiendo la inactivación de una sola isoenzima en todos los casos.

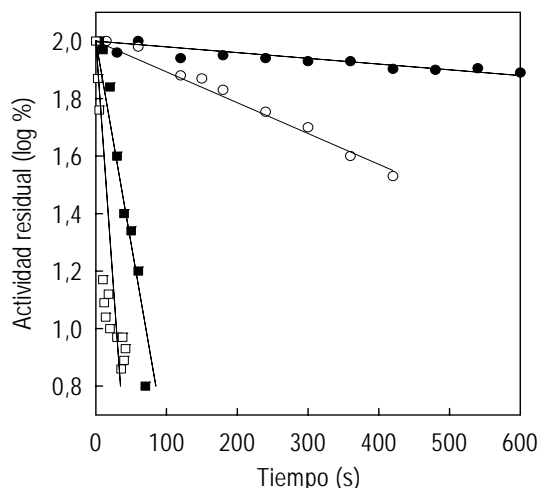


Figura 4.43. Inactivación por calor de POD de pimiento. Logaritmo de actividad residual frente al tiempo de tratamiento térmico a 30 °C (●), 40 °C (○), 50 °C (■) y 60 °C (□). El medio de reacción contenía en tampón citrato sódico 50 mM pH 4,5, 1 mM de ABTS, 6 mM de H₂O₂, 0,2 mM de Troponona y 1 ng/mL de POD parcialmente purificada.

Las pendientes de las rectas de inactivación fueron calculadas por regresión no lineal de los datos a la ecuación (Chisari y col., 2007):

$$\log(A / A_0) = -(k / 2,303)t$$

donde A_0 es la actividad inicial de la enzima y A es la actividad después de sufrir un calentamiento a varios tiempos. Los valores de k obtenidos, se ajustaron a la representación de Arrhenius, mostrando una relación lineal (Figura 4.44).

A partir de la recta obtenida en la representación de Arrhenius fue calculada la energía de activación (E_a) (Anthon y Barrett, 2002):

$$\ln(k) = -\frac{E_a}{RT} + c$$

donde R es la constante de los gases (8,314 J/mol K) y T es la temperatura en ° K.

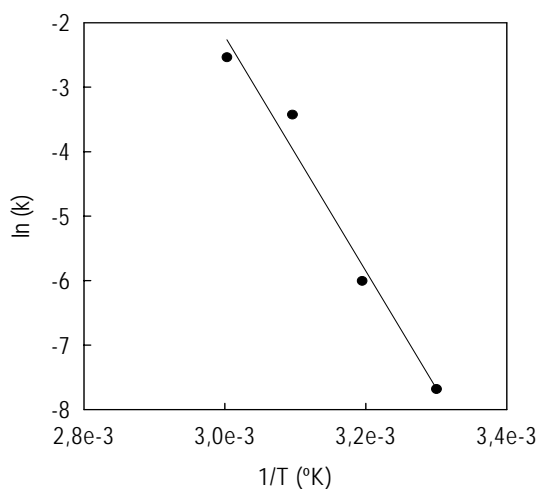


Figura 4.44. Representación de Arrhenius. La temperatura de inactivación de POD se obtuvo mediante aplicación de la ecuación de Arrhenius en los datos mostrados en la Figura 4.43.

El valor de E_a obtenido fue de 151 kJ/mol. Aunque esta energía de activación es inferior a la obtenida para POD de zanahoria y patata (Anthon y Barrett, 2002), y ligeramente superior a la obtenida para POD de fresa (Chisari *y col.*, 2007), el rango de temperatura requerido para la inactivación de POD de pimiento fue más bajo que en el de los anteriores, alcanzando una inactivación significativa a temperaturas por encima de 40 °C. Muchas veces, la inactivación térmica de una enzima es dada como valor D, que es el tiempo requerido para reducir la actividad enzimática a un 10% del valor original. En nuestro caso, la temperatura requerida para obtener un valor D de 5 minutos (en 5 minutos el 10% de la actividad inicial) fue de 44,5 °C, más baja que la obtenida para POD de patata y zanahoria (83,2 y 80,3 °C, respectivamente) (Anthon y Barrett, 2002), indicando que la POD de pimiento es más sensible a la temperatura que las PODs de patata o zanahoria. Por otra parte, el tiempo requerido para disminuir la actividad de la enzima a la mitad fue de 6 segundos, a 60 °C. Este dato es mucho menor que el obtenido para POD de fresa (4 minutos) (Chisari *y col.*, 2007), indicando de nuevo, que POD de pimiento rojo es menos termoestable que POD de fresa.

Concluyendo, podemos decir que el uso de Triton X-114 para extraer POD de pimiento permite obtener una sola isoenzima con baja estabilidad térmica, comparada con PODs de otras fuentes vegetales.

CAPÍTULO V. CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

1. El tipo de cultivo, ecológico o tradicional, afecta a diferentes parámetros de calidad del fruto de pimiento como son: contenido en proteínas, compuestos fenólicos, vitamina C, actividad peroxidasa, carotenos y color. El pimiento cultivado bajo sistema de producción ecológica presenta un mayor contenido en todos los parámetros anteriormente mencionados, así como un color más intenso.
2. El estadio de maduración afecta a diferentes parámetros de calidad del fruto de pimiento como son: contenido en proteínas, compuestos fenólicos, vitamina C, actividad peroxidasa, carotenos y color. Todos estos parámetros, excepto peroxidasa, aumentan con la maduración, independientemente del sistema de producción utilizado para su cultivo (ecológico o tradicional).
3. La inoculación de plantas de pimiento con rizobacterias suple un aporte deficiente de N a las mismas, consiguiendo unas características físicas en el fruto similares a los frutos procedentes de plantas cultivadas sin deficiencia en N. Respecto a los niveles de peroxidasa, estos son mucho más bajos en frutos de plantas inoculadas con rizobacterias, debido a una menor infección de los tejidos de la planta.
4. La concentración salina del agua de riego afecta a diferentes parámetros de calidad del fruto de pimiento como son: compuestos fenólicos, vitamina C, actividad antioxidante y peroxidasa. Un aumento en la concentración salina del agua de riego provoca una drástica caída en los niveles de vitamina C de los frutos de pimiento maduros. También provoca un descenso, aunque menos acusado, del contenido en compuestos fenólicos, y por lo tanto un descenso en la capacidad antioxidante de dichos frutos. En el caso de peroxidasa, se produce un aumento de dicha actividad enzimática con la salinidad del agua de riego.

5. La presencia del 1% de β -CD en el líquido de gobierno reduce la pérdida de capacidad antioxidante de pimiento asado de V gama, ya que protege de su degradación durante el almacenamiento a los compuestos fenólicos, vitamina C, y compuestos responsables del color de dicho fruto. Esto ralentiza la modificación de las características organolépticas del producto, así como la pérdida de sus propiedades nutricionales durante el periodo de vida útil del producto.
6. El uso de detergente Triton X-114 permite extraer la peroxidasa de pimiento libre de fenoles y compuestos coloreados. La isoenzima así extraída presentó un pH óptimo de 4,5 y es poco estable a la temperatura.

CAPÍTULO VI. BIBLIOGRAFÍA

5. BIBLIOGRAFÍA

- Adams, J. B. 1978. The inactivation and regeneration of peroxidase in relation to the high temperature-short time processing of vegetables. *J. Food Technol.* 13, 281-297.
- Aherne, S. A.; O'Brien, N. M. 2002. Dietary flavonoles: chemistry, food content, and metabolism. *Adv. Exp. Med. Biol.* 439, 175-182.
- Albardíaz, M. A.; Álvarez, S.; Briz, J.; Muñoz, N. 1996. Análisis del consumo de alimentos ecológicos. Agricultura y desarrollo rural. Actas II Congreso de la Sociedad Española de Agricultura Ecológica. Septiembre Pamplona-Iruña.
- Alcaraz, M. D.; Egea, C.; Espin, A.; Candela, M. E. 1995. Peroxidase isozymes in the defense response of *Capsicum annum* to *Phytophthora Capsici*. *Physiol. Plant.* 94, 736-742.
- Alonso, A. M.; Guzmán, G. I.; Domínguez, M. D.; Simón, X. 2002a. "Influencias sociales en la evolución de la agricultura ecológica en España". En ECOLIVA: IV Jornadas mediterráneas de Olivar Ecológico y I Conferencia Mundial de olivar Ecológico, 22-25 de Mayo, Génave (Jaén).
- Alvalos Llano, K, R.; Sgroppo, S. C.; Chaves, A. 2007. Pimientos cherry cortados. Evolución de fenoles y ácido ascórbico durante el almacenamiento. V Congreso Iberoamericano de Tecnología Postcosecha y Agroexportaciones. s5, pp 82.
- Angleton, E. A.; Flurkey, W. H. 1984. Activation and alteration of plant and fungal polyphenol oxidase isoenzymes in sodium dodecyl sulphate electrophoresis. *Phytochem.* 23, 2723-2725.
- Anthon, G. E.; Barrett, D. M. 2002. Kinetic parameters for the thermal inactivation of quality-related enzymes in carrots and potatoes. *J. Agric. Food Chem.* 50, 4119-4125.
- Anttonen, M. J.; Karjalainen, R. O. 2006. High-Performance Liquid Chromatography Analysis of Black Currant (*Ribes nigrum* L.) Fruit Phenolics Grown either Conventionally or Organically. *J. Agric. Food Chem.* 54, 7530-7538.
- Arbona, V.; Marco, A. J.; Iglesias, D. J.; López-Climent, M. F.; Talon, M.; Gómez-Cadenas, A. 2005. Carbohydrate depletion in root and leaves of salt-stressed potted *Citrus clementina* L. *Plant Growth Regulation.* 46, 153-160.

- Arnao, M. B.; Acosta, M.; del Río, J. A.; Varón, R. and García-Cánovas, F. **1990**. A kinetic study on the suicide inactivation of peroxidase by hydrogen peroxide. *Biochim. Biophys. Acta.* 1041, 43-47.
- Arnao, M. B.; Cano; Acosta, M. **1998**. La actividad antioxidante total de zumos de cítricos como factor de calidad del producto. *Levante Agrícola*. 1º T, 60-65.
- Arts, I. C.; van de Putte, B.; Hollman, P. C. **2000**. Catechin contents of foods commonly consumed in the Netherlands. 1. Fruits, vegetables, staple foods, and processed foods. *J. Agric. Food Chem.* 48, 1746-1751.
- Asami, D. K.; Hong, Y. J.; Barret, D. M.; Mitchell, A. E. **2003**. Comparison of the Total Phenolic and Ascorbic Acid Content of Freeze-Dried and Air-Dried Marionberry, Strawberry, and Corn Grow Using Conventional, Organic, and Sustainable Agricultural Practices. *J. Agric. Food Chem.* 51, 1237-1241.
- Ashraf, M.; Harris, P, J, C. **2004**. Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. *Plant Science.* 166, 3-16.
- Aydin, N.; Kadioglu, A. **2001**. Changes in the chemical composition, polyphenol oxidase and peroxidase activities during development and ripening of medlar fruits (*Mespilus germanica* L.) *Bulg. J. Plant Physiol.* 27, 85-92..
- Bashan, Y.; Holguin, G.; de-Bashan, L. E. **2004**. Azospirillum-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). *Can. J. Microbiol.* 50, 521-577.
- Bashan, Y.; Levanony, H. **1991**. Alterations in membrane potential and in proton efflux in plant roots induced by *Azospirillum brasilense*. *Plant Soil.* 137, 99-103.
- Bercharrell, B.; Mcfie, J. H. **1991**. Consumer attitudes to organic foods British. *Food J.* 93, 25-30.
- Bertrand, H.; Plassard, C.; Pinochet, X.; Toraine, B.; Normand, P.; Cleyet-Marel, J. C. **2000**. Stimulation of the ionic transport system in *Brassica napus* by a plant growth-promoting rhizobacterium (*Achromobacter* sp.). *Can. J. Microbiol.* 46, 229-236.
- Bielski, B. H.; Richter, H. W.; Chan, P. C. **1975**. Some properties of the ascorbate free radical. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 258, 231-237.
- Bordier, C. **1981**. Phase separation of integral membrane proteins in Triton X-114 solution. *J. Biol. Chem.* 256, 1604-1607.

- Bosland, P. W. **1996**. *Capsiums: Inovative uses of an ancient crop*. En J. Janick, Ed.; Progress in new crops (Arlington, VA; ASHS Press), pp. 479-487.
- Bosland, P. W.; Votava, E. J. **1999**. Peppers: vegetable and spice capsicum. Crop Production Science in Hortuculture 12. Wallingforf. Oxon. London.
- Bosland, P. W.; Votava, E. J. **2000**. Peppers: vegetable and spice capsicums. CABI, Nueva York.
- Bourn, D.; Prescott, J. **2002**. A comparison of the nutritional value, sensory qualities, and food safety of organically and conventionally produced foods. *Crit. Rev. Food Sci. Nut.* 42, 1-34.
- Bowen, P.; Frey, B. **2002**. Response of plasticultured bell pepper to staking, irrigation frequency, and fertigated nitrogen rate. *Hortscience*. 37, 95-100.
- Bradford, M. M. **1976**. Arapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilising the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Brandt, K.; Mølgaard, J. P. **2001**. Organic agriculture: does it enhance or reduce the nutritional value of plant foods?. *J. Sci. Food Agric.* 81, 924-931.
- Breusegem, F. V.; Vranova, E.; Dat, J. F.; Inze, D. **2001**. The role of active oxygen species in plant signal transduction. *Plant Sci.* 161, 405-414.
- Bruemmer, J. H.; Roe, B.; Bowen, E. R. **1976**. Peroxidase reactions and orange juice quality. *J. Food Sci.* 41, 186-190.
- Byers, T.; Perry, G. **1992**. Dietary carotenes, vitamin C and vitamin E as protective antioxidants in human cancers. *Ann. Rev. Nutri.* 12, 139-159.
- Cadena-Gomez, G.; Nicholson, R. L. **1987**. Papilla formation and associated peroxidase activity: a non-specific response to attempted fungal penetration of maize. *Physiol. Mol. Plant. Pathol.* 31, 51-68.
- Cao, C.; Prior, R. L. **1998**. Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum. *Clin. Chem.* 44, 1309-1315.
- Cao, G.; Sofic, E.; Prior, R. L. **1996**. Antioxidant capacity of tea and common vegetables. *J. Agric. Food Chem.* 44, 3426-3431.
- Cao, G.; Verdon, C. P.; Wu, A. H. B.; Wang, H.; Prior, R. L. **1995**. Automated oxigen radical absorbance capacity assay using the COBAS FARA II. *Clin. Chem.* 41, 1738-1744.

- Capasso, R.; Evidente, A.; Schivo, L.; Orru, G.; Marcialis, M. A.; Cristinzio, G. **1995**. Antibacterial polyphenols from olive oil mill waste water. *J. Appl. Bacteriol.* 79, 393-398.
- Carbonaro, M.; Mattera, M. **2001**. Polyphenoloxidase activity and polyphenol levels in organically and conventionally grown peach (*Prunus persica* L., cv. Regina Bianca) and pear (*Pyrus communis* L., cv. Williams). *Food Chem.* 72, 419-424.
- Carbonaro, M.; Mattera, M.; Nicoli, S.; Bermago, P.; Cappelloni, M. **2002**. Modulation of antioxidant compounds in organic vs conventional fruit (peach, *Prunus persica* L., and pear, *Pyrus communis* L.). *J. Agric. Food Chem.* 50, 5458-5462.
- Carpenter-Boggs, L.; Pikul, J. L.; Vigil, M. F.; Riedell, W. E. **2000**. Soil nitrogen mineralization influenced by crop rotation and nitrogen fertilization. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 64, 2038-2045.
- Chisari, M.; Barbagallo, P.; Ricardo, N.; Branca, F.; Spanga, G. **2008**. Pectin methylesterase, polyphenol oxidase and physicochemical properties of typical long-storage cherry tomatoes cultivated under water stress regime. *J. Sci. Food.* 88, 389-396.
- Chisari, M.; Barbagallo, R. N.; Spanga, G. **2007**. Characterization of polyphenol oxidase and peroxidase and influence on browning of cold stores strawberry fruit. *J. Agric. Food. Chem.* 55, 3469-3476.
- Chittoor, J. M.; Leach, J. E.; White, F. F. **1997**. Differential induction of a peroxidase gene family during infection of rice by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Mol. Plant Microbe. Interact.* 10, 861-871.
- Civello, P. M.; Martínez, G. A.; Chavez, A. R.; Anon, M. C. **1995**. Peroxidase from strawberry fruit (*Fragaria ananassa*-Duch) -partial- purification and determination of some properties. *J. Agric. Food Chem.* 43, 2596-2601.
- Clifford, M, N. **2000**. Chlorogenic acid and other cinnamates-occurrence, dietary burden, absorption and metabolism. *J. Sci. Food Agric.* 80, 1033- 1043.
- Conn, P. F.; Lambert, C.; Land, E. J.; Schalch, W.; Truscott, T. G. **1992**. Carotene oxygen radical interaction. *Free Radical Res.* 16, 401-408.
- CRAE. Consejería de Agricultura y Agua de la Región de Murcia, **2008**. <http://www.craega.es/directorio/avanzProductos/busqCRAEESP.php>

- Croteau, R.; Kutchan, T. M.; Lewis, N. G. **2000**. Natural products (secondary metabolism). En *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. Ed.; Gruissem, B. W.; Jones, R.; Rockville, M. D. American Society of Plant Physiologist. pp. 1250-1318.
- D'Amico, M. L.; Izzo, R.; Navari-Izzo, F.; Tognoni, F.; Pardossi, A. **2003**. See water irrigation; antioxidants and quality of tomato berries (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Acta Hort.* (ISHS). 609, 59-65.
- Da Silva, E.; Lourenco, E. J.; Neves, V. A. **1990**. Soluble and bound peroxidases from papaya fruit. *Phytochem.* 29, 1051-1059.
- Damianaki, A.; Bakogeorgou, E.; Kampa, M.; Notas, G.; Hatzoglou, A.; Panagiotou, S.; Gemetzi, C.; Kouroumalis, E.; Martin, P. M.; Castanas, E. **2000**. Potent inhibitory action of red wine polyphenols on human breast cancer cells. *J. Cell Biochem.* 78, 429-441.
- Daniel, O.; Mejer, M. S.; Schlatter, J.; Frischknecht, P. **1999**. Selected phenolic compounds in cultivated plants: ecologic functions, health implications, and modulation by pesticides. *Environ. Health Perspect.* 107, 109-114.
- Daood, H. G.; Vinkler, M.; Markus, F.; Hebshi, E. A.; Biacs, P. A. **1996**. Antioxidant vitamin content of spice red pepper (paprika) as affected by technological and varietal factors. *Food Chem.* 55, 365-372.
- Das, D. K.; Sato, M.; Ray, P. S.; Maulik, G.; Engelman, R. M.; Bertelli, A. A.; Bertelli, A. **1999**. Cardioprotection of red wine: role of polyphenolic antioxidant. *Drugs Exp. Clin. Res.* 25, 115-120.
- Dávalvos, A.; Gómez-Cordovés, C.; Bartolomé, B. **2004**. Extending applicability of the oxygen radical absorbance capacity (ORAC-Fluorescein) assay. *J. Agric. Food Chem.* 52, 48-54.
- Davis, B. H.; Matthews, S.; Kirk, J. T. O. **1970**. The nature and biosynthesis of the carotenoids of different colour varieties of *Capsicum annuum* L. *Phytochem.* 9, 797-805.
- Davey, M. W.; Van Montagu, M.; Inzé, D.; Sanmartín, M.; Kanellis, A.; Smirnoff, N.; Benzie, I. J. J.; Favell, D.; Fletcher, J. **2000**. Plant L-ascorbic acid: chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing. *J. Sci. Food Agric.* 80, 825-860.
- Dawson, J. H. **1998**. Probing structure-function relations in heme containing oxygenases and peroxidases. *Science.* 240, 433-439.

- De Gaetano, G.; Cerletti, C. **2001**. Wine and cardiovascular disease. *Nutr. Metab. Cardiovasc.* 11, 47-50.
- De Gaetano, G.; De curtis, A.; Di Castelnuovo, A.; Donati, M. B.; Lacoviello, L.; Rotondo, S. **2002**. Antithrombotic effect of polyphenols in experimental models: a mechanism of reduced vascular risk by moderate wine consumption. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 957, 174-188.
- De Pascale, S.; Maggio, A.; Fogliano, V.; Ambrosio, P.; Ritieno, A. **2001**. Irrigation with saline water improves carotenoids content and antioxidant activity of tomato. *J. Hortic. Sci. Biotechnol.* 76, 447-453.
- Deepa, N.; Kaur, C.; George, B.; Singh, B.; Kapoor, H. C. **2007**. Antioxidant constituents in some sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) genotypes during maturity. *LWT-Food Sci. Technol.* 40, 121-129.
- Degl'Innocenti, E.; Guidi, L.; Pardossi, A.; Tognoni, F. **2005**. Biochemical Study of Leaf Browning in Minimally Processed Leaves of Lettuce (*Lactuca sativa* L. Var. *Acephala*). *J. Agric. Food Chem.* 53, 9980-9984.
- del Amor, F. M.; Serrano-Martínez, A.; Fortea, I.; Núñez-Delicado, E. **2008**. Differential effect of organic cultivation on the levels of phenolics, peroxidase and capsidiol in sweet peppers. *J. Sci. Food Agric.* 88, 770-777.
- del Amor, F.M. **2006**. Growth, photosynthesis and chlorophyll fluorescence of sweet pepper plants as affected by the cultivation method. *Ann. Appl. Biol.* 148, 133-139.
- Delgado, R.; Martín, P.; del Álamo, M.; González, M. R. **2004**. Changes in the phenolic composition of grape berries during ripening in relation to vineyard nitrogen and potassium fertilisation rates. *J. Sci. Food Agric.* 84, 623-630.
- Di Carlo, G.; Mascolo, N.; Izzo, A. A.; Capasso, F. **1999**. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Curr. Med. Chem.* 4, 337-359.
- Di Mascio, P.; Kaiser, S.; Sies, H. **1989**. Lycopene as the most efficient biological carotenoid single oxygen quencher. *Arch. Biochem. Biophys.* 274, 532-538.
- Diplock, A. T.; Charleux, J. L.; Grozier-Willi, G. F. J.; Rice-Evans, C.; Roberfroid, M.; Stahl, W.; Ribes Viña, J. **1998**. Functional food science and defence against reactive oxidative species. *British Journal of Nutrition* 80 Suppl. 1:77.

- Dobbelaere, S.; Croonenborghs, A.; Thys, A.; Ptacek, D.; Vanderleyden, J.; Dutto, P.; Labandera-Gonzalez, C.; Caballero-Mellado, J.; Aguirre, J. F.; Kapulnik, Y.; Brener, S.; Burdman, S.; Kadouri, D.; Sarig, S.; Okon, Y. **2001**. Responses of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*. *Aust. J. Plant Physiol.* 28, 871- 879.
- Dobbelaere, S.; Vanderleyden, J.; Okon, Y. **2003**. Plant growth promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. *Crit. Rev. Plant Sci.* 22, 107-149.
- Duarte-Vázquez, M. A.; García-Almendárez, B.; Regalado, C.; Whitaker, J. R. **2000**. Purification and partial characterization of three Turnip (*Brassica napus* L. var. esculenta D.C.) Peroxidases. *J. Agri. Food Chem.* 48, 1574-1579.
- Dunford, H. B.; Stillman, J. S. **1997**. On the function and mechanism of action of peroxidase. *Coord. Chem. Rev.* 19, 187-251.
- Eastwood, M. **1999**. A interaction dietary antioxidants in vivo: how fruit and vegetables prevent disease? *Q. M. J.* 92, 527-530.
- El Shamei, Z. **1988**. The purification and properties of peroxidase in spinach. I. Isolation and purification. In *Biotechnology and Food Industry*; proceedings of the international symposium held in Budapest, Hungary, Oct 5-9, 1987; Hollo, J.; Torley, D.; Ed.; Akademiai Kiado: Budapest, Hungary, pp. 257-265.
- El-Khawas, H.; Adachi, K. **1999**. Identification and quantification of auxins in culture media of *Azospirillum* and *Klebsiella* and their effect on rice roots. *Biol. Fertil. Soils.* 28, 377-381.
- Elstner, E. F. **1982**. Oxygen activation and oxygen toxicity. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 33, 73-96.
- Espín, J. C.; Tomás-Barberán, F. A. **2006**. Polifenoles y Salud: Propiedades biológicas de polifenoles de uva y de la granada. *Investigación y Ciencia.* 34-36.
- Espín, J. C.; Wichers, H. J. **2000**. Study of the resveratrol catalized by polyphenol oxidase. Effect of polyphenol oxidase, lacasse and peroxidase on the antiradical capacity of resveratrol. *J. Food Biochem.* 24, 225-250.
- Estiarte, M.; Filella, I.; Serra, J.; Peñuelas, J. **1994**. Effects of nutrient and water stress on leaf phenolic content of peppers and susceptibility to generalist herbivore *Helicoverpa armigera* (Hubner). *Oecologia.* 99, 387-391.

- FAO. Organización para la Agricultura y la Alimentación de las Naciones, 2006.
<http://http://www.fao.org/>
- Flott, B. E.; Moerschbacher, B. M.; Reisener, H. J. 1989. Peroxidase isoenzyme patterns of resistant and susceptible wheat leaves following stem rust infection. *New Phytol.* 111, 413-421.
- Flowers, T. J.; Yeo, A. R. 1986. Ion relations of plants under drought and salinity. *Aust. J. Plant Physiol* 13, 75-91.
- Frankel, E. N.; Kanner, J.; German, J. B.; Parks, E.; Kinsella, J. E. 1993. Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *Lancet.* 341, 454-457.
- Fry, S. C. 1986. Cross-linking of matrix polymers in the growing cell walls of angiosperms. *Annu. Ev. Plant Physiol.* 37, 165-186.
- Gaspar, T. H.; Penel, C.; Thorpe, T.; Greppin, H. 1982. Peroxidases 1970-1980. A survey of their biochemical and physiological roles in higher plants. Université de Genève. Centre de botanique, Genève.
- Gaspar, T.; Penel, C.; Castillo, F. J.; Greppin, H. 1985. A two-step control of basic and acidic peroxidases and its significance for growth and development. *Physiol. Plant.* 64, 418-423.
- Gerster, H. 1997. The potential role of lycopene for human health. *J. Am Coll. Nutr.* 16, 109-126.
- Ghassemi, F.; Jakeman, A. J.; Nix, H. A. 1995. Salinisation of land and water resources: human causes, extent, management and case studies. Wallingford, Oxon, UK.
- Gimeno, E.; Fito, M.; Lamuela-Raventos, L. M.; Castellote, A. I.; Covas, M.; Farre, M.; De la Torre-Boronat, M. C.; López-Sabater, M. C. 2000. Effect of ingestion of virgin olive oil on human low-density lipoprotein composition. *Eur. J. Clin. Nutr. Metab. Cardiovasc.* 10, 38-44.
- Ginsburg, I. 1998. Could Synergistic Interactions among Reactive Oxygen Species, Proteinases, Membrane-Perforating Enzymes, Hidrolases, Microbial hemolysins and Cytokines be the main Cause of Tissue Damage in Infection and Inflammatory Conditions. *Med. Hypotheses.* 51, 337-385.
- Glick, B. R. 1995. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Can. J. Microbiol.* 41, 109-117.

- Gnayfeed, M. H.; Daood, H. G.; Biacs, P. A.; Alcaraz, C. F. **2001**. Content of bioactive compounds in pungent spice red pepper (paprika) as affected by ripening and genotype. *J. Sci. Food Agric.* 81, 1580-1585.
- Gómez-Ladrón de Guevara, R.; Pardo-González, J. E. **1996**. Evolution ripening of selected varieties of Páprika pepper (*Capsicum annuum* L.). *J. Agric. Food Chem.* 44, 2049-2052.
- Gorham, J.; Jones, R. G. W.; Mcdonnell, E. **1985**. Some mechanisms of salt tolerance in crop plants. *Plant and Soil.* 89, 15-40.
- Goyal, S. S.; Sharma, S. K.; Rains, D. W. **2003**. Crop Production in Saline Environments: Global and Integrative Perspectives, (New York-London-Oxford: Food Products Press, an Imprint of the Haworth Press).
- Graham, M. Y.; Graham, T. L. **1991**. Rapid accumulation of anionic peroxidases and phenolic polymers in soybean cotyledon tissues following treatment with *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea* wall glucan. *Plant Physiol.* 97, 1445-1455.
- Grattan, S. R.; Grieve, C. M. **1992**. Mineral element acquisition and growth-response of plants grow in saline environments. *Agric. Ecosyst Envir.* 38, 275-300.
- Grattan, S. R.; Grieve, C. M. **1999**. Salinity mineral nutrient relations in horticultural crops. *Sci. Hortic.* 78, 127-157.
- Greenway, H.; Munns, R. **1980**. Mechanisms of salt tolerance in non-halophytes. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Molecul. Biol.* 31, 149-190.
- Gruda, N. **2005**. Impact of environmental factors on product quality of greenhouse vegetables for fresh consumption. *Crit. Rev. Plant Sci.* 24, 227-247.
- Gryndler, M.; Hrselova, H.; Vosatka, M.; Votruba, J.; Klir, J. **2001**. Organic fertilization change the response of mycelium of arbuscular mycorrhizal fungi and their sporulation to mineral NPK supply. *Folia Microbiol.* 46, 542-552.
- Gürbüz, O.; Göcmend, D.; Dâgdela, F.; Gürsoy, M.; Aydem, S.; Sahin, J.; Büyükuysal, L.; Usta, M. **2007**. Determination of flavan-3-oles and resveratrol in grapes and wine fluorescence detection. *Food Chem.* 100, 518-525.
- Häkkinen, S.; Törrönen, A. R. **2000**. Content of flavonols and selected phenolic acids in strawberries and *Vaccinium* species: influence of cultivar, cultivation site and technique. *Food Res. Int.* 33, 517-524.

- Halpin, B.; Pressey, R.; Jen, J.; Mondy, N. **1989**. Purification and characterization of peroxidase isoenzymes from green peas (*Pisum sativum*). *J. Food Sci.* 54, 644-649.
- Harborne, J. B.; Williams, C. A. **2000**. Advances in flavonoids research since 1992. *Phytochem.* 55, 481-504.
- Harbowy, M. E.; Balentine, D. A. **1997**. Tea chemistry. *Crit. Rev. Plant Sci.* 16, 415-480.
- Harris, J. R. **1996**. Subcellular biochemistry, ascorbic acid: biochemistry and biomedical cell biology (Vol. 25). New York: Plenum.
- Hasler, C. M. **1998**. Functional foods: their role in disease prevention and health. *Food Technol.* 52, 63-69.
- Heiser, C. B.; Smith, P. G. **1953**. The cultivated *Capsium* peppers. *Econ. Bot.* 7, 214-227.
- Heiser, C.B. **1976**. Peppers *Capsium* (Solanaceae). En The evolution of crops plants, N. W. Simmond, Ed.; (London: Longman Press), pp. 265-268.
- Hertog, M. G. L.; Feskins, E. J. M.; Hollman, P.; Katan, M. B.; Kromhout, D. **1993**. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen elderly study. *Lancet.* 342, 1007-1011.
- Herrmann, K. **1989**. Occurrence and content of hydroxycinnamic and hydroxybenzoic acid compound in foods. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 281, 315-347.
- Hertog, M. G. L.; Hollman, P. C. H.; Katan, M. B. **1992a**. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly used in the Netherlands. *J. Agric. Food Chem.* 40, 2379-83.
- Hertog, M. G. L.; Hollman, P. C. H.; Venema, D. P. **1992b**. Optimization of a quantitative HPLC determination of potentially anticarcinogenic flavonoids in vegetables and fruits. *J. Agric. Food Chem.* 40, 1591-1598.
- Hillel, D.; Vlek, P. **2005**. The sustainability of irrigation. *Adv. Agron.* 87, 55-84.
- Hiner, A. N. P.; Hernández-Ruíz, J.; Arnao, M. B.; García-Cánovas, F.; Acosta, M. **1996**. A comparative study of the purity, enzyme activity, and inactivation by hydrogen peroxide of commercially available horseradish peroxidase isoenzymes A and C. *Biotechnol. Bioeng.* 50, 655-662.
- Hornero-Méndez, D.; Gómez-Ladrón de Guevara, R.; Mínguez-Mosquera, M. I. **2000b**. Carotenoid biosynthesis changes in five red pepper (*Capsicum annuum* L) cultivars during ripening. Cultivar selection for breeding. *J. Agric. Food Chem.* 48, 3857-3864.

- Hornero-Méndez, D.; Mínguez-Mosquera, M. I. **2000a**. Xanthophyll esterification accompanying carotenoid overaccumulation in chromoplast of *Capsicum annuum* L. ripening fruits is a constitutive process and useful for ripeness index. *J. Agric. Food Chem.* 48, 1617-1622.
- Howard, L. R.; Smith, R. T.; Wagner, A. B.; Villalón, B.; Burns, E. E. **1994**. Provitamin A and ascorbic acid content of fresh pepper cultivars (*Capsicum annuum* L) and processed jalapenos. *J. Food Sci.* 59, 362-365.
- Howard, L. R.; Clark, J. R.; Brownmiller, C. **2003**. Antioxidant capacity and phenolic content in blueberries as affected by genotype and growing season. *J. Sci. Food Agric.* 83, 1238-1247.
- 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, 5891-5891.
- Howard, L. R.; Talcott, S. T.; Brenes, C. H.; Villalon, B. **2000**. Changes in Phytochemical and Antioxidant Activity of Selected Pepper Cultivars (*Capsicum Species*) As Influenced by Maturity. *J. Agric. Food Chem.* 48, 1713-1720.
- Hrazdina, G. **1982**. Anthocyanins. In the flavonoids: Advances in research. Harbone, J. B.; Mabry, T. J. Ed.; Chapman and Hall: London, pp. 135-170.
- Iglesias, I.; Graell, G.; Echeverría, G.; Vendrell, M. **1999**. Differences in fruit colour development, anthocyanidin content, yield and quality of seven "delicious" apple strains. *Fruit Varieties J.* 53, 133-145.
- Ikediyobi, C. O.; Obasuyi, H. N. **1982**. Purification and some properties of o-diphenolase from white yam tubers. *Phytochem.* 21, 2815-2820.
- Indrawati, I.; Van Loey, A. M.; Ludikhuyze, L. R.; Hendrickx, M. E. **1999**. Single, combined, or sequential action of pressure and temperature on lipoxygenase in green beans (*Phaseolus Vulgaris* L.): a kinetic inactivation study. *Biotechnol.* 15, 273-277.
- INFOAM. **1998**. International Federation of Organic Agricultural Movement, Basic Standards for Organic Production and Processing. General Assembly. Argentina, Germany.
- Jakopic, J.; Veberic, R.; Zupancic, K.; Stampar, F. **2007**. Influence of nitrogen on the contents of carbohydrates and organic acids in apples (*Malus domestica* Borkh.) cv. "Golden Delicious" *Eur. J. Hort. Sci.* 72, 66-72.

- Jang, M.; Pezzuto, J. M. **1999**. Cancer chemopreventive activity of resveratrol. *Drugs Exp. Clin Res.* 25, 65-77.
- Jen, J. J.; Seo, A.; Flurkey, W. H. **1980**. Tomato peroxidase-purification via hydrophobic chromatography. *J. Food Sci.* 45, 60-63.
- Jurado, A. **1999**. El cultivo del pimiento en el poniente almeriense. En *Técnicas de producción de frutas y hortalizas en los cultivos protegidos*, Caja Rural de Almería, Ed.; (Almería, Spain), pp. 57-87.
- Justesen, J.; Knuthsen, P.; Leth, T. **1998**. Quantitative analysis of flavonols, flavones, and flavonones in fruits, vegetables and beverages by high-performance liquid chromatography with photo-diode array and mass spectrometric detection. *J. Chromatogr.* 799, 101-110.
- Kamilova, F.; Kravchenko, L. V.; Shaposhnikov, A. I.; Azarova, T.; Makarova, N.; Lug-tenberg, B. **2006**. Organic acids, sugars, and L-tryptophane in exudates of vegetables growing on stonewool and their effects on activities of rhizosphere bacteria. *Mol. Plant Microbe Interact.* 19, 250-256.
- Kampis, A.; Bartuczkovacs, O.; Hoschke, A.; Aosvigoz, V. **1984**. Changes in peroxidase-activity of broccoli during processing and frozen storage. *Lebensm. Wiss. Technol.* 17, 293-295.
- Karantonis, H. C.; Fragopoulou, E.; Antonopoulou, S.; Rementzis, J.; Phenekos, C.; Demopoulou, C. **2006**. Effect of fast-food Mediterranean-type diet on type 2 diabetics and healthy human subjects platelet aggregation. *Diabetes Res. and Clin. Pract.* 72, 33-41.
- Keli, S. O.; Hertog, M. G. L. M.; Feskens, E. J. M.; Kromhout, D. **1996**. Dietary flavonoids, antioxidant vitamins, and incidence of stroke: the Zutphen study. *Arch. Intert. Med.* 156, 632-642.
- Kerby, K.; Somerville, S. **1989**. Enhancement of specific intercellular peroxidases following inoculation of barley with *Erysiphe graminis* f. sp. *Hordei*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 35, 323-338.
- Keutgen, A. J.; Pawelzik, E. **2007**. Modifications of Strawberry Fruit Antioxidant Pools and Fruit Quality under NaCl Stress. *J. Agric. Food Chem.* 55, 4066-4072.
- Khan, A. A.; Robinson, D. S. **1993**. Purification of an anionic peroxidase isoenzyme from mango (*Mangifera indica* L. var. *chaunsa*). *Food Chem.* 46, 61-69.
- Kidron, M.; Harel, M.; Mayer, A. M. **1978**. Catechol oxidase activity in grapes and wine. *Am. J. Enol. Vitic.* 219, 30-35.

- Kijne, J. W. **2006**. Abiotic stress and water scarcity: Identifying and resolving conflicts from plant level to global level. *Field Crops Research*. 97, 3-18.
- Kim, S.; Park, J. B.; Hwang, I. K. **2002**. Quality attributes of various varieties of Korean red pepper powders (*Capsicum annuum* L.) and colour stability during sunlight exposure. *J. Food Sci.* 68(8), 2957-2961.
- Kloepper, J. W.; Schroth, M. N. **1978**. Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. In: Proceedings. of the 4th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria Vol. 2, Station de Pathologie Vegetale et Phytobacteriologie, INRA, Angers, France, pp. 879-882.
- Knekt, P.; Jarvinen, R.; Reunanen, A.; Maatela, J. **1996**. Flavonoid intake and coronary mortality in Finland. A Cohort. Study *Br. Med. J.* 312, 478-481.
- Kolb, C. A. J.; Kaser, M. A.; Kopecky, J.; Zotz, G.; Riederer, M.; Pfundel, E. **2001**. Effects of natural intensities of visible epidermal ultraviolet screening and photosynthesis in grapes leaves. *Plant Physiol.* 80, 863-875.
- Krauss, S.; Schnitzler, W. H.; Grassmann, J.; Woiatke, M. **2006**. The influence of different electrical conductivity values in a simplified recirculating soilless system on inner and outer fruit quality characteristics of tomato. *J. Agric Food chem.* 54, 441-448.
- Krinsky, N. I. **1994**. The biological properties of carotenoids. *Pure Appl. Chem.* 66, 1003-1010.
- Krinsky, N. I. **2001**. Carotenoids as antioxidants. *Nutrition.* 17, 815-817.
- Krinsky, N. I.; Johnson, E. J. **2005**. Carotenoid actions and their relation to health and disease. *Mol. Aspects Medic.* 26(6), 459-516.
- Kubota, C.; Thomson, C. A. **2006**. Controlled environments for production of value-added food crops with high phytochemical concentrations: Lycopene in tomato as an example. *Hortsci.* 54, 441-448.
- Kühnau, F. **1976**. The flavonoids, a class of semi-essential food components: their role in human. *World Rev. Nutrit. Dietet.* 24, 117-191.
- Kvaratskhelia, M.; Winkel, C.; Thorneley, R. N. F. **1997**. Purification and characterization of a novel class III peroxidase isoenzyme from tea leaves. *Plant Physiol.* 114, 1237-1241.
- Lagrimini, L. M.; Vaughn, J.; Erb, W. A.; Miller, A. S. **1993**. Peroxidase overproduction in tomato: Wound-induced polyphenol deposition and disease resistance. *HortSci.* 28, 218-221.

- Lancaster J. E. **1992**. Regulation of skin color in apples. *Crit. Rev. Plant Sci.* 10, 487-502.
- Le Guillou, G.; Scharpé, A. **2001**. Organic Farming: Guide to Community Rules. European Commission, Luxembourg, 28.
- Lee, H. S.; Nagy, S. **1988**. Relationships of sugar degradation to detrimental changes in citrus juice quality. *Food Technol.* 91, 94-97.
- Lee, S. K.; Kader, A. A. **2000**. Preharvest and postharvest factors influencing vitamin C content of horticultural crops. *Postharvest Biol. Technol.* 20, 207-220.
- Lee, Y.; Howard, L. R.; Villalon, B. **1995**. Flavonoids and antioxidant activity of fresh pepper *Capsicum annuum* L. cultivars. *J. Food Sci.* 60, 473-476.
- Leon, J. C.; Alpeeva, I. S.; Chubar, T. A.; Galaev, I. Yu.; Csoregi, E.; Sakharov, I. Yu. **2002**. Purification and substrate specificity of peroxidase from sweet potato tubers. *Plant Sci.* 163, 1011-1020.
- Lewis, C. E.; Walter, J. R. L.; Lancaster, J. E.; Sutton, K. H. **1998**. Determination of anthocyanins, flavonoids and phenolics acids in potatoes: coloured cultivars of *Solanum tuberosum* L. *J. Sci. Food Agric.* 77, 45-47.
- Lombardi-Boccia, G.; Lucarini, M.; Lanzi, S.; Aguzzi, A.; Cappelloni, M. **2004**. Nutrients and antioxidant molecules in yellow plums (*Prunus domestica* L.) from conventional and organic productions: A comparative study. *J. Agric. Food Chem.* 52, 90-94.
- Loomis, W. D. **1974**. Overcoming problems of phenolics and quinones in the isolation of plant enzymes and organelles. *Method Enzymol.* 31, 528-540.
- Lu, A. T.; Whitaker, J. R. **1974**. Some factors affecting rates of heat inactivation and reactivation of horseradish peroxidase. *J. Food Sci.* 39, 1173-1178.
- Lucas-Abellán, C.; Mercader-Ros M. T., Zafrilla P. M.; Fortea M. I.; Gabaldón J. A.; Núñez-Delgado E. **2008**. Orac-Fluorescein assay to determine the oxygen radical absorbance capacity of resveratrol complexed in cyclodextrins. *J. Agric. Food Chem.* 56, 2254-2259.
- Lynch, J. M.; Whipps, J. M. **1991**. Substrate flow in the rhizosphere. In: Keister, D. L.; Cregan, B. Ed.; *The Rhizosphere And Plant Growth*. Beltsville Symposium Agric. Res. Kluwer, Dordrecht, The Netherlands, pp. 15-24.
- Lyons, M. M.; Yu, Ch; Toma, R. B.; Cho, S. Y.; Reiboldt, W.; Lee, J.; van Breemen, R. B. **2003**. Resveratrol in raw and baked blueberries and bilberries. *J. Agric. Food Chem.* 51, 5867-5870.

- Macheix, J. J.; Fleuriet, A.; Billot, J. **1990**. The main phenolics of fruits. In *Fruit Phenolics*. CRC. Press Inc. Florida.
- Macneish, R. S. **1964**. Ancient mesoamerican civilization-long archeological sequence from Tehuacan Mexico may give new data about rise of this civilization. *Science*. 143, 531-538.
- Marín, A.; Ferreres, F.; Tomás-Barberán, F. A.; Gil, M. I. **2004**. Characterization and quantification of antioxidant constituents of sweet pepper (*Capsicum annuum* L.). *J. Agric. Food Chem.* 52, 3861-3869.
- Markus, F.; Daood, H. G.; Kapitany, J.; Biacs, P. A. **1999**. Change in the carotenoid and antioxidant content of spice red pepper (paprika) as a function of ripening and some technological factors. *J. Agric. Food Chem.* 47, 100-107.
- MARM, Ministerio de Medioambiente, Rural y Marino, **2008**. <http://www.MARM.es/>
- Martínez, J.; Moreno, J. J. **2000**. Effect of resveratrol, a natural polyphenolic compound, on reactive oxygen species and prostaglandin production. *Biochem. Pharmacol.* 59, 865-870.
- Martínez, S.; Curros, A.; Bermudez, J.; Carballo, J.; Franco, I. **2007**. The composition of Arnoia peppers (*Capsicum annuum* L.) at different stages of maturity. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 58, 150-161.
- Materska, M.; Piacente, S.; Stochmal, A.; Pizza, C.; Oleszek, W.; Perucka, I. **2003**. Isolation and structure elucidation of flavonoide and phenolic acid glycosides from pericarp of hot pepper fruit *Capsicum annumm* L. *Phytochem.* 63, 893-898.
- Mc Guire, R. **1992**. Reporting of objective colour measurements. *HortSci.* 27(12), 1254-1255.
- McLellan, K. M.; Robinson, D. S. **1987**. Purification and heat stability of Brussels sprout peroxidase isoenzymes. *Food Chem.* 23, 305-319.
- Meloni, D. A.; Gulotta, M. R.; Oliva Cano, M. A. **2008**. El estrés salino incrementa la actividad de enzimas antioxidantes y la concentración de polifenoles en Vinal (*Prosopis ruscifolia* G.). *Quebracho*. 15, 27-31.
- Milla, A. **1996**. *Capsium* de capsas, cápsula: el pimiento. En *Pimientos*. Compendios de Horticultura, Ediciones de Horticultura, S. L. Ed.; (Reus. España), pp. 21-31.

- Mínguez-Mosquera, M. I.; Hornero-Méndez, D. **1993a**. Comparative study of the effect of paprika processing on the carotenoids in peppers (*Capsicum annuum* L) of the Bola and Agridulce varieties. *J. Agric. Food Chem.* 42, 1555-1560.
- Mínguez-Mosquera, M. I.; Hornero-Méndez, D. **1993b**. Separation and quantification of the carotenoid pigments in red peppers (*Capsicum annuum* L), paprika, and oleoresin by reversed-phase HPLC. *J. Agric. Food Chem.* 41, 1616-1620.
- Mínguez-Mosquera, M. I.; Hornero-Méndez, D. **1994a**. Formation and transformation of pigments during the fruit ripening of *Capsicum annuum* cv. Bola. *J. Agric. Food Chem.* 42, 38-44.
- Mínguez-Mosquera, M. I.; Hornero-Méndez, D. **1994b**. Changes in carotenoid esterification during the fruit ripening of *Capsicum annuum* L. cv. Bola. *J. Agric. Food Chem.* 42, 640-644.
- Mitsuya, S.; Takeoka, Y.; Miyake, H. **2000**. Effects of sodium chloride on foliar ultrastructure of sweet potato (*Pomoea batatas* Lam.) plantlets grown under light and dark conditions in vitro. *J. Plant Physiol.* 157, 661-667.
- Mittler, R. **2002**. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* 7, 405-410.
- Mohr, H.; Schopfer, P. **1995**. *Plant Physiology*. Springer-Verlag, New York.
- Molina, A.; Pérez, J. **2003**. Los alimentos de cultivo ecológico. Garantía de máxima calidad, pp. 345-369. En: *Fundamentos de agricultura ecológica* coord. De las Heras, J; Fabeiro, C.; Meco, R. Ed.; Universidad de Castilla-La Mancha, Cuenca.
- Molla, A. H.; Shamsuddin, Z. H.; Saud, H. M. **2001**. Mechanism of root growth and promotion of nodulation in vegetable soybean by *Azospirillum brasilense*. *Com-mun. Soil Sci. Plant Anal.* 32, 2177-2187.
- Munns, R. **1993**. Physiological processes limiting plant -growth in saline soils-some dogmas and hypotheses. *Plant Cell Envir.* 16, 15-24.
- Munns, R. **2002**. Comparative physiology of salt and water stress. *Plant Cell Envir.* 25, 239-250.
- Nair, A. R.; Showalter, A. M. **1996**. Purification and characterization of a wound-inducible cell wall cationic peroxidase from carrot roots. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 226, 254-260.
- Namesny, A. **1996**. El pimiento en el mundo. En *Compendios de Horticultura*, Ediciones de Horticultura, S. L. Ed.; (Reus. España), pp. 13-19.

- Namiki, M. **1990**. Antioxidants/antimutagens in food. *CRC. Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 29, 273-300.
- Navarro, J. M.; Flores, P.; Garrido, C.; Martínez, V. **2006**. Changes in the contents of antioxidant compounds in pepper fruits at different ripening stages, as affected by salinity. *Food Chem.* 96, 66-73.
- Navarro, J. M.; Garrido, C.; Carvajal, M.; Martínez, V. **2002**. Yield and fruit quality of pepper plants under sulphate and chloride salinity. *J. Hort. Sci. Biotechnol.* 77, 52-57.
- Nebesky, E. A.; Esselen, W. B.; Kaplan, A. M.; Fellers, C. R. **1950**. Thermal destruction and stability of peroxidase in acid foods. *Food Res.* 15, 114-120.
- Nelson, D. P.; y Kiesow, L. A. **1972**. Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25 degrees C (with molar extinction coefficients of H₂O₂ solutions in the UV). *Anal. Biochem.* 49, 474-478.
- Nelson, L. M. **2004**. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): prospects for new inoculants. *Crop Manag* 1-7.
- Nuez, F.; Gil, R.; Costa, J. **1996**. El cultivo del pimiento, chiles y ajíes. Madrid. España.
- Nuez, F.; Gil-Ortega, R.; Costa, J. **2003**. El cultivo de pimientos, chiles y ajíes. Mundiprensa, Madrid.
- Núñez-Delicado, E.; Bru, R.; Sánchez-Ferrer, A.; García-Carmona, F. **1996**. Triton X-114-aided purification of latent tyrosinasa. *J. Chromatogr.* 680, 105-112.
- Núñez-Delicado, E.; Sánchez-Ferrer, A.; García- Carmona, F. F.; López-Nicolas, J. M. **2005**. Effect of Organic Farming Practices on the Level of Latent Polyphenol Oxidase in Grapes. *J. Food Sci.* 70, C74-C78.
- Núñez-Delicado, E.; Sánchez-Ferrer, A.; García_Carmona, F. **1997**. Cyclodextrins as Secondary Antioxidants: Synergism with Ascorbic Acid. *J. Agri. Food Chem.* 45, 2830-2835.
- Núñez-Delicado, E.; Serrano-Mejias, M.; Peérez-López, A.J.; López-Nicolás, J.M. **2005**. Polyphenol Oxidase from Dominga Table Grape. *J. Agri. Food Chem.* 53, 6082-6093.
- Núñez-Delicado, E.; Sojo, M. M.; García-Carmona, F.; Sánchez-Ferrer, A. **2003**. Partial purification of latent persimmon fruit polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem.* 51, 2058-2063.

- Ohazurike, N. C.; Arince, E. A. **1996**. Changes in polyphenol oxidase and peroxidase levels in cocoyan tubers of different postharvest ages infected by *Sclerotium rolfsii* sacc. *Nahrung*. 40, 25-27.
- Onsa, G. H.; bin Saari, N.; Selamat, J.; Bakar, J. **2004**. Purification and characterization of membrane-bound peroxidases from Metroxylon sagu. *Food Chem.* 85, 365-376.
- Palevitch, D.; Craker, L. E. **1995**. Nutritional and medicinal importance of red pepper (*Capsicum* spp.) *J. Herbs Spices Med. Plants*. 3, 55-83.
- Palozza, P.; Krinsky, N. **1992**. Antioxidants effects of carotenoids in vivo—an overview. *Methods Enzymol.* 213, 403-420.
- Paranychianakis, N. V.; Chartzoulakis, K. S. **2005**. Irrigation of Mediterranean crops with saline water: from physiology to management practices. *Agric. Ecosyst. Env.* 106, 171-187.
- Parida, A. K.; Das, A. B. **2004**. Effects of NaCl stress on nitrogen and Phosphorous metabolism in a tree mangrove *Bruguiera parviflora* grown under hydroponic culture. *J. Plant Physiol.* 161, 921-928.
- Parida, A. K.; Das, A. B. **2005**. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 60, 324-349.
- Pérez-Gálvez, A.; Hornero-Méndez, D.; Mínguez-Mosquera, M. I. **2004**. Changes in the carotenoid metabolism of capsicum fruit during application of modeled slow drying process for paprika production. *J. Agric. Food Chem.* 52(3), 518-522.
- Pérez-López, A. J.; del Amor, F. M.; Serrano-Martínez, A.; Fortea, M. I.; Núñez-Delgado, E. **2007**. Influence of agriculture practices on the quality of sweet pepper fruits as affected by the maturity stage. *J. Sci. Food Agric.* 87, 2075-2080.
- Pomar, F.; Bernal, M. A.; Díaz, J.; Merino, F. **1997**. Purification, characterization and kinetic properties of pepper fruit acidic peroxidase. *Phytochem.* 46, 1313-1317.
- Price, S. F.; Breen, P. J.; Valladao, M.; Watson, B. T. **1995**. Cluster sun exposure and quercetin in Pinot noir grapes and wine. *Am. J. Enol. Vitic.* 46, 187-194.
- Quiroga, M.; Guerrero, C.; Botella, M. A.; Barcel, A.; Amaya, I.; Medina, M. I.; Alonso, F. J.; Forchetti, S. M.; Tigier, H.; Valpuesta, V. **2000**. A tomato peroxidase involved in the synthesis of lignin and suberin. *Plant Physiology*. 122, 1119-1127.

- Ray, H.; Douches, D. S.; Hammerschmidt, R. **1998**. Transformation of potato with cucumber peroxidase: Expression and disease response. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 53, 93-103.
- REAL DECRETO 1201/2002 de 20 de noviembre, por el que se regula la producción integrada de productos agrícolas.
- REAL DECRETO 1852/1993 de 22 de octubre, sobre producción agrícola ecológica y su indicación en los productos agrarios y alimenticios
- Regalado, C.; Pérez-Arvizu, O.; García-Almendárez, B. E.; Whitaker, J. R. **1999**. Purification and properties of two acidic peroxidases from Brussels sprouts (*Brassica oleracea* L.). *J. Food Biochem.* 23, 435-450.
- Regasamy, P. **2002**. World salinization with emphasis on Australia. *J. Exp. Bot.* 57, 1017-1023.
- Reinli, K.; Block, G. **1996**. Phytoestrogens content of food-compendium of literature values. *Nutr. Cancer.* 26, 123-148.
- Reisner, A. H.; Nemes, P.; Bucholtz, C. **1975**. The use of Coomassie Brilliant Blue G250 perchloric acid solution for staining in electrophoresis and isoelectric focusing on polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 64, 509-16.
- Renaud, S.; De Lorgeril, M. **1992**. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet.* 339, 1523-1525.
- Rengasamy, P. **2006**. World salinization with emphasis on Australia. *J. Exp. Bot.* 57, 1017-1023.
- Repka, V.; Fischerrová, I. **1996**. Distribution of the stress-related anionic peroxidases in different cucumber organs. *Biol. Plant.* 38, 571-583.
- Ribaudó, C. M.; Rondanini, D. P.; Cura, J. A.; Frascina, A. A. **2001**. Response of *Zea mays* to the inoculation with *Azospirillum* on nitrogen metabolism under greenhouse conditions. *Biol. Plant.* 44, 631-634.
- Rice-Evans, C. **2001**. Flavonoid antioxidants. *Curr. Med. Chem.* 8, 797-807.
- Rimm, E. B.; Katan, M. B.; Ascherio, A.; Stampher, M. J.; Willett, W. C. **1996**. Relation between intake of flavonoids and risk for coronary heart disease in male health professionals. *Ann. Intern. Med.* 125, 384-389.
- Robertson, G. P.; Paul, E. A.; Harwood, R. **2000**. Greenhouse gases in intensive agriculture: Contributions of individual gases to the radiative forcing of the atmosphere. *Science.* 289, 1922-1925.

- Robinson, D. S. 1987. Scavenging enzyme and catalases. *Biochemistry and Nutritional Value*. Ed.; Longman Scientific and Technical: Harlow, U. K., pp. 459-465.
- Rodrigo, C.; Rodrigo, M.; Alvarruiz, A.; Frigola, A. 1996. Thermal inactivation at high temperatures and regeneration of green asparagus peroxidase. *J. Food Prot.* 59, 1065-1071.
- Rodríguez-López, J. N.; Espín, J. C.; del Amor, F.; Tudela, J.; Martínez, V.; Cerdá A.; García-Cánovas, F. 2000a. Purification and Kinetic Characterization of an Anionic Peroxidase from Melon (*Cucumis melo* L.) Cultivated under Different Salinity Conditions. *J. Agric. Food Chem.* 48, 1537-1541.
- Rodríguez-López, J. N.; Espín, J. C.; del Amor, F.; Tudela, J.; Martínez, V.; Cerdá, A.; García-Cánovas, F. 2000. Purification and Kinetic Characterization of an Anionic Peroxidase from Melon (*Cucumis Melo* L.) Cultivated under Different Salinity Conditions. *J. Agric. Food Chem.* 48, 1537-1541.
- Ros-Barceló, A.; Muñoz, R. 1992. Peroxidases: Their role in the control of plant cell growth. In: peroxidases 1980-1990: Progress and Prospect in Biochem. And Physiol. Greppin, H.; Pene, C. and Gaspar, T. H. Ed.; Université de Gêneve. Gêneve, pp. 71-89.
- Rouseff, R. L.; Martin, S. F.; Youtsey, C. O. 1987. Quantitative survey of narirutin, naringin, hesperidin, and neohesperidin in Citrus. *J. Agric. Food Chem.* 35, 1027-1030.
- Russo, V. M.; Biles, C. L. 2003. Fertilizer rate and beta-galactosidase and peroxidase activity in pepper fruit at different stages and years of harvest. *Plant Foods Hum. Nutr.* 58, 231-239.
- Saenger, W. 1980. Cyclodextrin inclusion compounds in research and industry. *Angew. Chem.* 19, 344-362.
- Sanchez-Echaniz, J.; Benito-Fernández, J.; Mintegui-Raso, S. 2001. Methemoglobinemia and Consumption of Vegetables in Infants. *Pediatrics.* 107, 1024-1028.
- Sánchez-Ferrer, A.; Bru, R.; García-Carmona, F. 1989a. Novel procedure for extraction of a latent grape polyphenol oxidase using temperature-induced phase separation in Triton X-114. *Plant Physiol.* 91, 1481-1487.

- Sánchez-Ferrer, A.; Laveda, F.; García-Carmona, F. **1993**. Partial purification of soluble potato polyphenol oxidase by partitioning in an aqueous two-phase system. *J. Agric. Food Chem.* 41, 1583-1586.
- Sauberlich, H. E. **1994**. Pharmacology of vitamin C. *Annu. Rev. Nutr.* 14, 371-391.
- Sensoy, S.; Demir, S.; Turkmen, O.; Erdinc, C.; Savur, O. B. **2007**. Responses of some different pepper (*Capsicum annuum* L.) genotypes to inoculation with two different arbuscular mycorrhizal fungi. *Sci. Hort.* 113, 92-95.
- Serafini, M.; Laranjinha, J. A.; Almeida, L. M.; Maiana, G. **2000**. Inhibition of human LDL lipid peroxidation by phenol-rich beverages and their impact on plasma total antioxidant capacity in human. *J. Nutr. Biochem.* 11, 585-590.
- Serio, F.; De Gara, L.; Caretto, S.; Leo, L.; Santamaría, P. **2004**. Influence of an increased NaCl concentration on yield and quality of cherry tomato grown in posidonia (*Posidonia oceanica* (L) Delile). *J. Sci. Food Agric.* 84, 1885-1890.
- Serrano, Z. **1996**. Veinte cultivos hortícolas en invernadero. Sevilla, España.
- Serrano-Martínez, A.; Fortea, M. I.; del Amor, F. M.; Núñez-Delicado, E. **2008**. Kinetic characterisation and thermal inactivation study of partially purified red pepper (*Capsicum annuum* L.) peroxidase. *Food Chem.* 107, 193-199.
- Serrano-Megías, M.; Núñez-Delicado, E.; Pérez-López, A. J.; López-Nicolas, J. M. **2006**. Study of the effect of ripening stages and climatic conditions on the physicochemical and sensorial parameters of two varieties of *Vitis vinifera* L. by principal component analysis: influence on enzymatic browning. *J. Sci. Food Agric.* 86, 592-599.
- Shepherd, R.; Magnusson, M.; Sjöden, P. O. **2005**. Determinants of consumer behavior related to organic foods. *Ambio.* 34, 352-359.
- Signoret, A.; Crouzet, J. **1982**. Tomato peroxidase: purification by affinity chromatography. *Agric. Biol. Chem.* 46, 459-463.
- Simmone, A. H.; Simmone, E. H.; Eitenmiller, R. R.; Mills, H. A.; Green, N. R. **1997**. Ascorbic acid and provitamin A contents in some unusually coloured bell peppers. *J. Food Compos. Anal.* 10, 299-311.
- Smirnoff, N. **1995**. Antioxidant Systems and plant response to the environment. In N. Smirnoff (Ed.), *Environment and plant metabolism: Flexibility and acclimation* (pp. 217-243). Oxford, UK: BIOS Scientific Publisher Ltd.
- Smirnoff, N.; Wheeler, G. L. **2000**. Ascorbic acid: Biosynthesis and function. *Crit. Rev. Plant Sci.* 9, 267-290.

- Stitt, M. **1999**. Nitrate regulation of metabolism and growth. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2, 178-186.
- Stitt, M.; Muller, C.; Matt, P.; Gibon, Y.; Carillo, P.; Morcuende, R.; Scheible, W.R.; Krapp, A. **2002**. Steps towards an integrated view of nitrogen metabolism. *J. Exp. Bot.* 53, 959-970.
- Sukrasno, N.; Yeoman, M. M. **1993**. Phenylpropanoid metabolism during growth and development of *Capsicum frutescens* fruits. *Phytochem.* 32, 839-84.
- Szabolcs, I. **1994**. The concept of soil resilience. En Soil resilience and sustainable and use. Greenland y Szabolcs, Ed.; (Wallingford: CAB International), pp. 33-39.
- Szejtli, J. **1985**. Cyclodextrins: a new group of industrial basic materials. *Nahrung.* 29, 911-24.
- Tadesse, T.; Hewett, E. W.; Nichols, M. A.; Fisher, K. J. **2002**. Changes in physicochemical attributes of sweet pepper cv. Domino during fruit growth and development. *Sci. Hortic.* 93, 91-103.
- Tadesse, T.; Nichols, M. A.; Fisher, K. J. **1999a**. Nutrient conductivity effects on sweet pepper plants grown using a nutrient film technique1. Yield and fruit quality. *New Z. J. Crop Hort. Sci.* 27, 229-237.
- Tajtakova, M.; Semanova, Z.; Tomkova, Z.; Szokeova, E.; Majoros, J.; Radikova, Z.; Sebokova, E.; Klimes, I.; Langer, P. **2006**. Increased thyroid volume and frequency of thyroid disorders signs in schoolchildren from nitrate polluted area. *Chemosphere.* 62(4), 559-64.
- Tapiero, H.; Ba, G. N.; Tew, K. D. **2002**. Estrogen and environmental estrogens. *Biomed. Pharmacother.* 56, 36-44.
- Teissedre, P. L.; Frankel, E. N.; Waterhouse, E. L.; Peleg, H., German, J. B. **1996**. Inhibition of in vitro human LDL oxidation by phenolic antioxidants from grapes and wines. *J. Sci. Food Agric.* 70, 55-61.
- Teissedre, P. L.; Waterhouse, A. L. **2000**. Inhibition of human low-density lipoproteins by phenolic substances in different essential oils varieties. *J. Agric. Food Chem.* 48, 3801-3805.
- Tester, M.; Davenport, R. **2003**. Na⁺ tolerance and Na⁺ transport in higher plants. *Annals of Botany.* 91, 503-527.
- Thuler, D. S.; Floh, E. I. S.; Handro, W.; Barbosa, H. R. **2003**. Plant growth regulators and amino acids released by *Azospirillum* sp. in chemically defined media. *Lett. Appl. Microbiol.* 37, 174-178.

- Tirilly, Y.; Bourgeois, C. M. **2002**. Tecnología de las Hortalizas. Acribia. Zaragoza.
- Tomás-Barberán, F. A.; Clifford, M. N. **2000**. Flavones, chalcones and dihydrochalcones- nature occurrence and dietary burden. *J. Sci. Food Agric.* 80, 1073-1080.
- Tomás-Barberan, F. A.; Espín, J. C. **2001**. Phenolic compounds and related enzymes of quality in fruit and vegetables. *J. Sci. Food Agric.* 81, 853-876.
- Törrönen, R.; Häkkinen, S.; Kärelampi, M.; Mikkänen, H. **1997**. Flavonoids and phenolic acid in selected berries. *Cancer Letters.* 114, 191-192.
- Trichopoulou, A.; Vasilopoulou, E. **2000**. Mediterranean diet and longevity. *Br. J. Nutr.* 2, 205-209.
- Tsugane, S.; Tsuda, N.; Gey, F.; Watanabe, S. **1992**. Cross-sectional study with múltiple measurements of biological markers for assessing stomach cancer risks at the population level. *Environ. Health Perspect.* 98, 207-210.
- Tudela, J. A.; Espín, J. C.; Gil, M. I. **2002**. Vitamin C retention in fresh-cut potatoes. *Postharvest Biol. Technol.* 26, 75-84.
- Uquiche, E.; del Valle, J. M.; Ortiz, J. **2004**. Supercritical carbon dioxide extraction of red pepper (*Capsicum annuum* L.) oleoresin. *Journal of Food Engineering.* 65, 55-66.
- Valero, E.; Varón, R.; García-Carmona, F. **1992**. Kinetic study of effect of metabisulfite on polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem.* 40, 904-908.
- Vanderslice, J. T.; Higgs, D. J.; Hayes, J. M.; Block, G. **1990**. Ascorbic acid and dehydroascorbic acid content of food-as-eaten. *J. Food Compos. Anal.* 3, 105-118.
- Vermeer, I. T.; Pachen, D. M.; Dallinga, J. W.; Kleinjans, J. C.; van Maanen, J. M. **1998**. Volatile N-nitrosamine formation after intake of nitrate at the ADI level in combination with an amine-rich diet. *Envir. Health Perspect.* 106(8), 459-463.
- Vian, M. A.; Tomao, V.; Coulomb, P. O.; Lacombe, J. M.; Dangles, O. **2006**. Comparison of the Anthocyanin Composition during Ripening of Syrah Grapes Grown Using Organic or Conventional Agricultural Practices. *J. Agric. Food Chem.* 54, 5230-5235.
- Wagner, H. **1986**. Antihepatotoxic flavonoids. *Prog. Clin. Biol. Res.* 213, 545-558.
- Wall, M. M.; Waddell, C. A.; Bosland, P. W. **2001**. Variation in β -carotene and total carotenoid content in fruits of *Capsicum*. *HortSci.* 36, 639-644.

- Wang, H.; Cao, G.; Prior, R. L. **1996**. Total antioxidant capacity of fruits. *J. Agric. Food Chem.* 44, 701-705.
- Wang, Z.; Luh, B. S. **1983**. Characterization of soluble and bound peroxidases in green asparagus. *J. Food Sci.* 48, 1412-1419.
- Waterhouse, A. L. **2002**. Wine phenolics. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 957, 21-36.
- Williams, C. A.; Harbone, J. B. **1994**. Flavones and flavonoles. The impact of plant flavonoids on mammalian biology: implications for immunity, inflammation and cancer. In: *The flavonoids: advances in research since 1986*. Harbonne, J. B. Ed.; Chapman and Hall: London, pp. 337-385.
- Woese, K.; Lange, D.; Boess, C.; Bögl, K. W. **1997**. A Comparison of Organically and Conventionally Grown Foods-Results of a Review of the Relevant Literature. *J. Sci. Food Agric.* 74, 281-293.
- Wollenweber, B.; Porter, J. R.; Lubberstedt, T. **2005**. Need for multidisciplinary research towards a second green revolution-Commentary. *Curr. Opin. Plant Biology.* 8, 337-341.
- Wollin, S. D.; Jones, P. J. **2001**. Alcohol, red wine and cardiovascular disease. *J. Nutr.* 131, 1401-1404.
- Worthington, V. **2001**. Nutritional Quality of Organic Versus Conventional Fruits, Vegetables, and Grains. *J. Alternat. Complement Med.* 7, 161-173.
- Yahia, E. M.; Contreras-Padilla, M.; Gonzalez-Aguilar, G. **2001**. Ascorbic acid content in relation to ascorbic acid oxidase activity and polyamine content in tomato and bell pepper fruits during development, maturation and senescence. *Lebensm-Wiss. Technol.* 34, 452-457.
- Young, J. E.; Zhao, X.; Carey, E. E.; Welti, R.; Yang, S. S.; Wang, W. **2005**. Phytochemical phenolics in organically grown vegetables. *Mol. Nutr. Food Res.* 49, 1136-1142.
- Zapata, S.; Dufour, J. P. **1992**. Ascorbic, dehydroascorbic and isoascorbic acid simultaneous determinations by reverse phase ion interaction HPLC. *J. Food Sci.* 57, 506-511.
- Zhang, D.; Hamazu, Y. **2003**. Phenolic compounds, ascorbic acid, carotenoids and antioxidant properties of green, red and yellow bell peppers. *Food Agric. Environ.* 1, 22-27.

- Zhang, S.; Tang, G.; Russell, R. M.; Mayzel, K. A.; Stampfer, M. J.; Willet, W. C. **1997**. Measurement of retinoids and carotenoids in breast adipose tissue and a comparison of concentration in breast cancer cases and control subjects. *Am. J. Clinic. Nutr.* 66, 626-632.
- Zhu, J. K. **2001**. Plant salt tolerance. *Trends Plant Sci.* 6, 66-71.
- Zhu, J. K. **2002**. Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 53, 247-273.