UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA

TESIS DOCTORAL

"ESTUDIO DE LA BIODISPONIBILIDAD Y BIOACTIVIDAD DE LOS COMPUESTOS FUNCIONALES PRESENTES EN BRÓCOLI Y COL DE MILÁN"

Ana María Fernández León

Departamento de Biología Vegetal, Ecología y Ciencias de la Tierra

Conformidad de los directores:

Fdo. María Josefa Bernalte García, María Fernanda Fernández León y David González Gómez

Badajoz, 2015

A mis padres y hermana

AGRADECIMIENTOS

Pensé, que llegado este momento no me costaría expresar mi agradecimiento a todas las personas que directa e indirectamente me han ayudado a lo largo de este trabajo, pero no ha sido así, ya que es difícil resumir en poco espacio todos estos años.

En primer lugar, agradecer al Gobierno de Extremadura, al Instituto Tecnológico Agroalimentario de Extremadura (INTAEX) y al Departamento de Biología Vegetal, Ecología y Ciencias de la Tierra de la Univeresidad de Extremadura por poder desarollar mi Tesis Doctoral.

A los fondos FEDER, al Fondo Social Europeo (Proyecto GR10006) y al Proyecto "Red de Investigación Transfronteriza de Extremadura-Centro-Alentejo (RITECA)" por la financiación.

A mis directores de Tesis, las Dras. María Josefa Bernalte García y María Fernanda Fernández León y al Dr. David González Gómez, por su seguimiento y ayuda, muchas gracias.

A Dª Carlota Daza y a D. Manuel Martín, directores del INTAEX durante la realización de mi tesis, así como, a las Dras. Mercedes Lozano y Concepción Ayuso.

A cada uno de mis compañeros de trabajo, los más recientes en TRANSA, sobre todo a ti Toni por confiar en mí, así como a todos aquellos con los que comencé en el mundo de la investigación en el INTAEX, fueron muy buenos momentos que han dejado inolvidables recuerdos.

A mis amigas y amigos por apoyarme y darme siempre ánimo.

A toda mi familia política, en especial a mi suegra que desde el minuto uno que me conociste me diste tu cariño.

A mi familia, en especial a mis tios y primos, por vuestras palabras de ánimo y cariño.

A mi cuñado Jose, gracias por animarme y apoyarme en todo momento, y perdona por robar a mi hermana parte de tu tiempo.

A mis abuelos, por su cariño, dedicación y ayuda. Gracias abuelo Benito porque siempre creíste en mí.

A Kiko (mi niño), muchas gracias por todo, por tu paciencia, por darme ánimo, por creer tanto en mí, por ayudarme en todo, por estar siempre a mi lado y quererme tanto.

A mis padres, Teresa y Jerónimo, gracias por quererme tanto, por ayudarme en todo y en mucho más de lo que podéis. Gracias por dedicar vuestro tiempo a mi hermana y a mí y siempre estar cuando os necesitamos. Os quiero muchísimo.

Y en especial a mi hermana Nandy (esta Tesis existe gracias a ti), uno de los pilares mas importantes de mi vida y mi mejor amiga, muchísimas gracias por todo. Sin ti, no hubiera sido capaz de luchar y conseguir este objetivo. Gracias por enseñarme tanto, por tu dedicación, por tu apoyo, por creer tantísimo en mí, por estar siempre que te necesito y ayudarme tanto en todo. Mil gracias por estar siempre y quererme tanto.

A todos, muchas gracias.

ÍNDICE

ÍNDICE

Página

RESUMEN **1**
ABSTRACT **5**
1. INTRODUCCIÓN **9**
1.1. Brassicas **9**
1.1.1. Origen y dispersión *9*
1.1.2. Características y clasificación botánica *10*
1.1.3. Brócoli *13*
1.1.4. Coles *16*
1.2. Importancia económica **19**
1.3. Alimentos funcionales: marco legal europeo **22**
1.4. Compuestos funcionales en Brassicas **25**
1.4.1. Vitamina C *26*
1.4.2. Carotenoides *27*
1.4.3. Clorofilas *29*
1.4.4. Compuestos fenólicos *31*
1.4.5. Glucosinolatos *33*
1.5. Actividad antioxidante **37**
1.6. Digestión **39**
1.7. Biodisponibilidad y Bioactividad **46**
2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS **57**
2.1. Justificación **57**
2.2. Objetivos **58**
3. MATERIAL Y MÉTODOS **61**
3.1. Material vegetal **61**
3.2. Diseño experimental **61**
3.3. Métodos **63**
3.3.1. Determinación de compuestos funcionales *63*
3.3.1.1. Vitamina C *63*
3.3.1.2. Carotenoides *66*
3.3.1.3. Clorofilas *69*

3.3.1.4. Compuestos fenólicos.....70
3.3.1.5. Glucosinolatos intactos.....73
3.3.2. Actividad antioxidante total.....77
3.3.3. Digestión in vitro.....78
3.3.4. Reactivos y patrones.....81
3.3.5. Análisis estadístico.....81
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....**85**
4.1. Caracterización funcional de los cultivares de brócoli ('Parthenon' y 'Mónaco') y col de Milán ('Dama' y 'Leticia').....**89**
4.1.1. Caracterización funcional de los cultivares de brócoli ('Parthenon' y 'Mónaco').....89
4.1.1.1. Ácido ascórbico y actividad antioxidante.....89
4.1.1.2. Pigmentos carotenoides y clorofílicos.....90
4.1.1.3. Compuestos fenólicos.....93
4.1.1.4. Glucosinolatos intactos.....94
4.1.1.5. Resumen de resultados.....97
4.1.2. Caracterización funcional de los cultivares de col de Milán ('Parthenon' y 'Mónaco').....99
4.1.2.1. Ácido ascórbico.....99
4.1.2.2. Pigmentos carotenoides y clorofílicos.....99
4.1.2.3. Compuestos fenólicos.....101
4.1.2.4. Glucosinolatos intactos.....101
4.1.2.5. Actividad antioxidante.....104
4.1.2.6. Resumen de resultados.....105
4.2. Compuestos funcionales y actividad antioxidante en brócoli 'Parthenon' y col de Milán 'Dama' en la fracción biodisponible.....**109**
4.2.1. Compuestos funcionales y actividad antioxidante total en brócoli 'Parthenon' y col de Milán 'Dama' en fresco.....109
4.2.1.1. Vitamina C.....109
4.2.1.2. Carotenoides.....111
4.2.1.3. Clorofilas.....112
4.2.1.4. Compuestos fenólicos.....113

4.2.1.5. Glucosinolatos intactos.....*116*
4.2.1.6. Actividad antioxidante total (AAT).....*120*
4.2.1.7. Correlación entre los diferentes parámetros estudiados y la actividad antioxidante total (AAT).....*121*
4.2.1.8. Cuadros resumen de la composición funcional de las brassicas estudiadas *127*
4.2.2. Biodisponibilidad y bioactividad tras la digestión in vitro.....*129*
4.2.2.1. Contenido biodisponible de vitamina C. Porcentaje de biodispinibilidad *129*
4.2.2.2. Contenido biodisponible de carotenoides. Porcentaje de biodispinibilidad *132*
4.2.2.3. Contenido biodisponible de clorofilas. Porcentaje de biodispinibilidad *135*
4.2.2.4. Contenido fenólico biodisponible. Porcentaje de biodispinibilidad *138*
4.2.2.5. Contenido biodisponible de glucosinolatos intactos. Porcentaje de biodispinibilidad *144*
4.2.2.6. Actividad antioxidante total (AAT) en la fracción biodisponible. Porcentaje de bioactividad *151*
4.2.2.7. Correlación entre los diferentes parámetros estudiados y la actividad antioxidante total (AAT).....*152*
4.2.2.8. Figuras resumen del porcentaje de Biodisponibilidad y Bioactividad de los compuestos funcionales de brócoli 'Parthenon' y col de Milán 'Dama'.....*158*
5. CONCLUSIONES **173**
6. REFERECIAS **177**

ÍNDICE DE FIGURAS

Página

1. INTRODUCCIÓN **9**

Figura 1.1. Distribución mundial de las Crucíferas 10

Figura 1.2. Tipos de Brassicas 12

Figura 1.3. Plántula de brócoli. 14

Figura 1.4. Formación de la pella de brócoli 15

Figura 1.5. Apertura de las flores de brócoli 15

Figura 1.6. Semillas de brócoli 16

Figura 1.7. Col de hoja lisa (A) y de hoja rizada (B) 17

Figura 1.8. Disposición envolvente de las hojas 18

Figura 1.9. Estructura química del ácido L-ascórbico (A) (forma reducida de la vitamina C) y del ácido dehidroascórbico (B) (forma oxidada de la vitamina C) 27

Figura 1.10. Estructura química del β-caroteno (caroteno) (A) y de la luteína (xantofila) (B) 29

Figura 1.11. Estructura química de la clorofila A y de la clorofila B 30

Figura 1.12. Estructuras químicas de los ácidos fenólicos: gálico (A) (derivado hidroxibenzoico), clorogénico (B) y sinápico (C) (derivados hidroxicinámicos) 32

Figura 1.13. Estructura química de los flavonoles: quercetina y kaempferol 33

Figura 1.14. Estructura química general desarrollada (A) y abreviada (B) de los glucosinolatos 34

Figura 1.15. Hidrólisis de los glucosinolatos catalizada por la enzima mirosinasa 36

Figura 1.16. Esquema del tracto digestivo 40

Figura 1.17. Esquema de un corte longitudinal de la pared del tracto gastrointestinal 41

Figura 1.18. Fases de digestión gastrointestinal 42

Figura 1.19. Tiempo aproximado del transito digestivo 45

Figura 1.20. Lugar de absorción de los diferentes macro y micro nutrientes en el tubo digestivo 47

Figura 1.21. Posibles rutas de los compuestos fenólicos de la dieta 51

3. MATERIAL Y MÉTODOS **61**

Figura 3.1. Brócoli y Col de Milán 61

Figura 3.2. Diagrama del diseño experimental 62

Figura 3.3. Cromatograma del ácido ascórbico presente en una muestra de brócoli registrado a 260 nm 64

Figura 3.4. Cromatogramas de los ácidos ascórbico y dehidroascórbico presentes en una muestra de brócoli, registrados a 261 y a 348 nm, respectivamente 66

Figura 3.5. Cromatógrafo de líquidos Agilent 1100 con detector de diodo de array (HPLC-DAD) 67

Figura 3.6. Cromatograma de los pigmentos carotenoides presentes en una muestra de brócoli, registrado a 460 nm 68

Figura 3.7. Espectrofotómetro Shimadzu UV-2450 UV-vis 69

Figura 3.8. Espectros de absorción de patrones de clorila A, B y mezcla de ambas, así como de una muestra de brócoli, registrados de 600 a 700 nm 70

Figura 3.9. Cromatógrafo Varian LC-500 MS Ion Trap 71

Figura 3.10. Cromatograma de masas en modo SIM de los compuestos fenólicos presentes en una muestra de brócoli 73

Figura 3.11. Espectro de masas del ión precursor (*m/z 358*) y del ión de fragmentación (*m/z 97*) en una muestra patrón de sinigrina 75

Figura 3.12. Cromatogramas, de las masas extraídas en modo Full Scan, de los glucosinolatos intactos presentes en una muestra de brócoli 76

Figura 3.13. Estructura química del ABTS 77

Figura 3.14. Fotómetro de microplacas Thermo Scientiefic Appliskan 78

Figura 3.15. Estructura química del Trolox 78

Figura 3.16. Diagrama de digestión *in vitro* 80

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN **85**

Figura 4.1. Contenido total de ác. fenólicos y flavonoles en brócoli 'Parthenon' y col de Milán 'Dama' 114

Figura 4.2. Contenido de los tres gurpos de glucosinolatos estudiados en brócoli 'Parthenon' y col de Milán 'Dama' 117

Figura 4.3. Contenido de los tres grupos de glucosinolatos alifáticos estudiados en brócoli 'Pathenon' y col de Milán 'Dama' 118

Figura 4.4. Porcentaje de biodisponibilidad del ác. ascórbico, ác. dehidroascórbico y vitamina C en brócoli 'Parthenon' y col de Milán 'Dama' 130

Figura 4.5. Contenido de los tres grupos de glucosinolatos alifáticos estudiados en brócoli 'Pathenon' y col de Milán 'Dama' 133

Figura 4.6. Porcentaje de biodisponibilidad de la clorofila A, clorofila B y clorofila total en brócoli 'Parthenon' y col de Milán 'Dama' 137

Figura 4.7. Porcentaje de biodisponibilidad del contenido fenólico total, ác. fenólicos totales y flavonoles totales en brócoli 'Parthenon' y col de Milán 'Dama' 141

Figura 4.8. Porcentaje de biodisponibilidad de los tres grupos de glucosinolatos estudiados en brócoli 'Parthenon' y col de Milán 'Dama' 147

Figura 4.9. Porcentaje de biodisponibilidad de los tres grupos de glucosinolatos alifáticos estudiados en brócoli 'Parthenon' y col de Milán 'Dama' 150

Figura 4.10. Porcentaje de Bioactividad (actividad antioxidante total, AAT) de los compuestos funcionales del brócoli 'Parthenon' y col de Milán 'Dama' 152

Figura 4.11. Porcentaje de biodisponibilidad y no biodisponibilidad de los compuestos funcionales del brócoli 'Parthenon' 161

Figura 4.12. Porcentaje de biodisponibilidad y no biodisponibilidad de los glucosinolatos intactos estudiados del brócoli 'Parthenon' 162

Figura 4.13. Porcentaje de biodisponibilidad y no biodisponibilidad de los compuestos funcionales de la col de Milán 'Dama' 166

Figura 4.14. Porcentaje de biodisponibilidad y no biodisponibilidad de los glucosinolatos intactos estudiados de la col de Milán 'Dama' 167

Figura 4.15. Porcentaje de bioactivadad y no bioactividad del brócoli 'Parthenon' y de la col de Milán 'Dama' 168

ÍNDICE DE TABLAS

Página

1. INTRODUCCIÓN 9

Tabla 1.1. Superficie, Producción y Valor de Hortalizas 20

Tabla 1.2. Superficie y Producción de variedades de Col 21

Tabla 1.3. Estructura de la cadena lateral R, nombre químico y nombre común de los glucosinolatos identificados 35

3. MATERIAL Y MÉTODOS 61

Tabla 3.1. Condiciones de elución en gradiente para la determinación del ácido ascórbico 64

Tabla 3.2. Condiciones de elución en gradiente para la determinación de carotenoides 67

Tabla 3.3. Condiciones de elución en gradiente para la determinación de compuestos fenólicos 72

Tabla 3.4. Parámetros del espectrómetro de masas ajustados para los patrones usados 72

Tabla 3.5. Condiciones de elución en gradiente para la determinación de glucosinolatos intactos 74

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 85

Tabla 4.1. Concentración de los principales compuestos bioactivos y actividad antioxidante total de los cultivares de brócoli ‘Parthenon’ y ‘Mónaco’ 91

Tabla 4.2. Correlaciones entre los diferentes parámetros estudiados y la actividad antioxidante total (AAT) mediante el test de Pearson 92

Tabla 4.3. Contenido de glucosinolatos (GS) intactos en los cultivares de brócoli ‘Parthenon’ y ‘Mónaco’ 96

Tabla 4.4. Concentración de los principales compuestos bioactivos y actividad antioxidante total de col de Milán ‘Dama’ y ‘Leticia’ 100

Tabla 4.5. Contenido de glucosinolatos (GS) intactos en los cultivares de col de Milán ‘Dama’ y ‘Leticia’. 103

Tabla 4.6. Correlaciones entre los diferentes parámetros estudiados y la actividad antioxidante total (AAT) mediante el test de Pearson 105

Tabla 4.7. Contenido de ác. ascórbico, ác. dehidroascórbico y vitamina C en brócoli 'Parthenon' y col de Milán 'Dama'.....110
Tabla 4.8. Contenido de β-caroteno, luteína y carotenoides totales en brócoli 'Parthenon' y col de Milán 'Dama'.....111
Tabla 4.9. Contenido de clorofila A, clorofila B y contenido clorofílico total en brócoli 'Parthenon' y col de Milán 'Dama' 112
Tabla 4.10. Contenido fenólico total, de ác. fenólicos totales y flavonoles totales en brócoli 'Parthenon' y col de Milán 'Dama' 113
Tabla 4.11. Contenido de ác. fenólicos individuales y flavonoles individuales en brócoli 'Parthenon' y col de Milán 'Dama' 115
Tabla 4.12. Contenido en glucosinolatos (GS) intactos en brócoli 'Parthenon' y col de Milán 'Dama' 119
Tabla 4.13. Contenido de la actividad antioxidante total (AAT) en brócoli 'Parthenon' y col de Milán 'Dama'.....121
Tabla 4.14. Correlaciones entre los diferentes parámetros estudiados y la actividad antioxidante total (AAT), mediante el test de Pearson, para las dos brassicas.....124
Tabla 4.15. Correlaciones entre los diferentes glucosinolatos intactos estudiados y la actividad antioxidante total (AAT) mediante el test de Pearson, para las dos brassicas.....126
Tabla 4.16. Tabla de comparación de los parámetros funcionales estudiados 127
Tabla 4.17. Tabla de comparación de los glucosinolatos estudiados 128
Tabla 4.18. Media y desviación estándar del contenido del ác. ascórbico, ác. dehidroascórbico y vitamina C en la fracción biodisponible de brócoli 'Parthenon' y col de Milán 'Dama'.....129
Tabla 4.19. Media y desviación estándar del contenido de β-caroteno, luteína y carotenoides totales en la fracción biodisponible de brócoli 'Parthenon' y col de Milán 'Dama'. 132
Tabla 4.20. Media y desviación estándar del contenido de clorofila A, clorofila B y clorofila total en la fracción biodisponible de brócoli 'Parthenon' y col de Milán 'Dama' 136

Tabla 4.21. Media y desviación estándar del contenido fenólico, ác fenólicos y flavonoles en la fracción biodisponible de brócoli 'Parthenon' y col de Milán 'Dama' 138

Tabla 4.22. Media y desviación estándar del contenido de los ác. fenólicos individuales y flavonoles individuales en la fracción biodisponible de brócoli 'Parthenon' y col de Milán 'Dama' 140

Tabla 4.23. Media y desviación estándar del porcentaje de biodisponibilidad de ác. fenólicos individuales y flavonoles individuales en brócoli 'Parthenon' y col de Milán 'Dama' 142

Tabla 4.24. Media y desviación estándar del contenido de glucosinolatos (GS) intactos en la fracción biodisponible de brócoli 'Parthenon' y col de Milán 'Dama' 145

Tabla 4.25. Media y desviación estándar del porcentaje de biodisponibilidad de los glucosinolatos (GS) intactos en brócoli 'Parthenon' y col de Milán 'Dama' 149

Tabla 4.26. Media y desviación estándar del valor de actividad antioxidante total (AAT) en la fracción biodisponible de brócoli 'Parthenon' y col de Milán 'Dama' 151

Tabla 4.27. Correlaciones entre los diferentes parámetros estudiados y la actividad antioxidante total (AAT) mediante el test de Pearson, para las dos brassicas 155

Tabla 4.28. Correlaciones entre los diferentes glucosinolatos intactos estudiados y la actividad antioxidante total (AAT) mediante el test de Pearson, para las dos brassicas 157

Tabla 4.29. Contenido de los compuestos funcionales y valor de la actividad antioxidante total (AAT) en brócoli 'Parthenon' fresco y digerido 159

Tabla 4.30. Contenido de glucosinolatos intactos en brócoli 'Parthenon' fresco y digerido 160

Tabla 4.31. Contenido de los compuestos funcionales y valor de la actividad antioxidante total (AAT) en col de Milán 'Dama' fresca y digerida 164

Tabla 4.32. Contenido de glucosinolatos intactos en col de Milán 'Dama' fresca y digerida 165

RESUMEN

RESUMEN

En la actualidad existe una preocupación general en los consumidores por adquirir productos alimenticios cada vez más saludables, que además de proporcionar los nutrientes necesarios, aporten compuestos beneficiosos con propiedades funcionales, tales como la actividad antioxidante. Debido a esto, se ha producido un aumento en el consumo de vegetales de la familia *Brassicaceae*, especialmente del género *brassica*. Estas hortícolas proseen gran cantidad de compuestos funcionales o bioactivos, tales como vitamina C, carotenoides, clorofilas, compuestos fenólicos y glucosinolatos, los cuales poseen gran capacidad antioxidante. Al ser la mayoría de estos compuestos metabolitos secundarios de las plantas, la variación en su contenido es debida a muchos factores, entre los que destacan la variedad o genotipo.

En esta Tesis se ha llevado a cabo la caracterización, en base al contenido en compuestos funcionales, de dos tipos de brassicas (brócoli y col de Milán). De los cultivares de brócoli estudiados, 'Parthenon' y 'Mónaco', fue 'Pathenon' el que presentó, de forma general, mejores propiedades funcionales. Y respecto a los cultivares de col de Milán estudiados, 'Dama' y 'Leticia', fue 'Dama' el que-presentó, en general, mayores contenidos en compuestos bioactivos.

Al comparar el brócoli 'Parthenon' con la col de Milán 'Dama' se observó que el brócoli presentó un mayor contenido en compuestos funcionales y, por tanto, mayor actividad antioxidante. Como consecuencia de ello, la capacidad funcional del brócoli es mayor que la de la col de Milán.

Los compuestos funcionales o bioactivos se absorben y utilizan de manera distinta al ser digeridos, por lo que además de determinar el contenido de estos compuestos en los alimentos, es necesario conocer su biodisponibilidad y bioactividad, lo que ayudará a conocer las propiedades saludables de los alimentos para optimizar la alimentación y poder establecer recomendaciones nutricionales. Además hay que tener en cuenta que la biodisponiblidad y bioactividad variarán dependiendo del tipo de matriz alimenticia con la que se ingieran, entre otros muchos factores.

Por lo tanto, en este trabajo de investigación se ha estudiado la biodisponibilidad y bioactividad de los compuestos funcionales determinados en los dos tipos de brassicas

(brócoli y col de Milán) una vez sometidas a un modelo de digestión *in vitro*. Los porcentajes de biodisponibilidad de dichos biocompuestos estuvieron entre el 1,5 y el 47% para brócoli 'Parthenon', y entre el 2,4 y el 43% en col de Milán 'Dama'. Y con respecto al porcentaje de bioactividad, para el brócoli 'Parthenon' se encontró un 93% frente al 31% de bioactividad *in vitro* que presentaron los compuestos funcionales en el cultivar de col de Milán 'Dama'.

ABSTRACT

ABSTRACT

Currently there is a general concern among consumers to purchase goods increasingly healthy, that not only provide the necessary nutrients, but also beneficial compounds with functional properties, such as antioxidant activity. Because of this, there has been an increased consumption of vegetables of the *Brassicacea* family, especially Brassicas. These vegetables have lots of bioactive compounds, such as vitaminC, carotenoids, chlorophylls, phenolic compounds and glucosinolates, which have high antioxidant properties. Most of these compounds are secondary metabolites of plants, so that the variation in content is due to many factors, among which the genotype or variety are important.

Thus, in this Dissertation, two types of brassicas (broccoli and Savoy cabbage) were evaluated in terms of functional parameters. Among the studied broccoli plants (‘Parthenon’ and ‘Monaco’), ‘Parthenon’ was the one showing better functional parameters. Regarding the assessed cabbage cultivars (‘Dama’ and ‘Leticia’), in general terms, ‘Dama’ exhibited higher contents of bioactive compounds.

When comparing ‘Parthenon’ broccoli with ‘Dama’ Savoy cabbage it was found that broccoli had a higher content of functional compounds and therefore higher antioxidant activity. As a result, the functional capacity of broccoli is greater than Savoy cabbage.

But functional compounds or biocompouds are absorbed and used in different ways when they are digested, so besides knowing the content of these compounds in foods is necessary to know their bioavailability and bioactivity, which will help meet the health properties of food to optimize the diet and to establish nutritional recommendations. Considering also, that bioavailability and bioactivity will vary depending on type of food matrix with which ingested, among many other factors.

Therefore, in this research work it has been studied bioavailability and bioactivity of characterized functional compounds in the two types of brassicas (broccoli and Savoy cabbage) once digested by a model of *in vitro* digestion. Obtaining that, the percentages of bioavailability of these biocompouds were between 1.5 and 47% for ‘Parthenon’ broccoli, and between 2.4 and 43% in ‘Dama’ Savoy cabbage. And with

respect to the bioactivity percentage, it was found 93% for broccoli cultivar, compared to the lower bioactivity *in vitro* that showed the functional compounds of Savoy cabbage cultivar (31%).

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Brassicas

1.1.1. Origen y dispersión

El término brassica se emplea para denominar a un grupo de plantas pertenecientes a la familia Brasicáceas (*Brassicaceae*), también llamada Crucíferas (*Cruciferae*) debido al aspecto de cruz de su flor. Esta familia se caracteriza por su gran complejidad botánica (Nuez et al., 1999), e incluye diversas especies de gran interés agrícola, destacando la especie *Brassica oleracea*, de la que existen numerosos cultivares botánicos.

La familia de las Crucíferas es nativa de Europa y Asia Occidental, teniendo un ancestro común en una planta silvestre del Mediterráneo o del Asia menor que fue llevada a las costas de Inglaterra, Dinamarca, Holanda, Francia, España y Grecia. Las plantas originarias todavía crecen de forma silvestre a lo largo de la costa del Mediterráneo, en la costa de Gran Bretaña y del sudoeste de Europa. Estas especies por selección natural o mutación han dado origen a las especies que se cultivan actualmente.

El cultivo de esta familia se remonta a 2.500 años a. C., siendo el repollo, la col crespa y la col rábano las primeras variedades en ser domesticadas. El repollo, coliflor y brócoli eran ya conocidos por los griegos, los romanos y los antiguos germanos, siendo los sajones y los celtas los primeros en cultivarlos en el norte de Europa. Antes de ser utilizadas como alimento tuvieron un propósito medicinal, utilizándose contra la sordera, la diarrea y el dolor de cabeza, entre otros.

Su diseminación por el mundo se le atribuye a comerciantes y navegantes del Mediterráneo, así como a los intercambios culturales que se dieron durante la expansión y consolidación de la culturas del Mediterráneo (griega, romana y musulmana, entre otras) (Figura 1.1).

Figura 1.1. Distribución mundial de las Crucíferas (Jaramillo y Díaz, 2005).

Pero no fue hasta mucho más tarde cuando se popularizaron las crucíferas. La coliflor, se hizo más conocida a partir del siglo XVIII, las coles de Bruselas a partir del siglo XIX y el brócoli se popularizó en diversos países a finales del siglo pasado.

1.1.2. Características y clasificación botánica

Las especies cultivadas de la familia Crucífera se caracterizan por:

- Sistema radicular pivotante o ramificado, con raíces gruesas que sirve como órgano de almacenamiento.

- Tallo cilíndrico, herbáceo, erecto y ramificado.

- Dicotiledóneas herbáceas.

- Inflorescencias dispuestas en racimos.

- Flores hermafroditas, actinomorfas, cáliz monosépalo con cuatro sépalos libres, alternando con los pétalos.

- La polinización es cruzada, realizada principalmente por abejas y diferentes insectos polinizadores.

- Ciclos de vida cortos, entre tres y diez meses.

- El ciclo comercial está dividido en dos fases: la vegetativa y la reproductiva. La fase vegetativa se caracteriza por el incremento en el número de hojas y el

engrosamiento del tallo, mientras que la fase reproductiva se caracteriza por el crecimiento y desarrollo de la cabeza, desde la formación de la inflorescencia hasta la cosecha misma.

La familia Crucífera está compuesta por 375 géneros y más de 3.000 especies, siendo el género *brassica* el mayoritario.

El género *brassica* es destacable por incluir muchas e importantes especies cultivadas en horticultura, existiendo más de 30 especies silvestres e híbridos, y numerosos cultivares adicionales e híbridos de origen cultivado. Muchas son anuales o bienales, y algunas incluso son pequeños arbustos.

Las formas cultivadas se consideran bianuales, produciendo durante el primer ciclo la parte comestibles y posteriormente los órganos florales.

Las especies cultivadas se clasifican botánicamente como:

Género: *Brassica*

Especie: *Brassica oleracea* L.

Variedad:

- *acephala* (Col verde y berza)
- *alboglabra* (Brócoli chino)
- *botrytis* (Coliflor y romanesco)
- *capitata* (Repollo blanco col blanca)
- *caulorapa* (Colinabo)
- *gemmifera* (Col de Bruselas)
- *gongylodes* (Colirrábano)
- *italica* (Brócoli)
- *pekinensis* (Col China)

•*rubra* (Repollo morado o col lombarda)

•*sabauda* (Col de Milán o de Saboya)

Además de las especies cultivadas, que se producen mundialmente, muchas de las especies silvestres son malezas, especialmente en Norteamérica, Sudamérica y Australia.

Dentro de las brassicas, podemos encontrar una amplia gama de vegetales en los que diversas partes son comestibles, incluyendo la raíz (colinabo, rábano, nabo), tallos (colirrábano), hojas (repollo, col de Bruselas), flores (coliflor, brócoli), y semillas (mostaza, colza) (Figura 1.2). Algunas formas con follaje blanco o púrpura o cabezas florales, crecen como ornamento.

Figura 1.2. Tipos de Brassicas.

Estos cultivos resultan muy interesantes para la región extremeña por rotar con los cultivos de verano, aumentando el nivel de utilización de la tierra, y por emplear una gran cantidad de mano de obra en épocas de poca actividad en las zonas de regadío (Lozano et al., 2007). Además de su interés agronómico, estas hortalizas tienen un gran interés desde un punto de vista nutricional por la presencia de vitamina C, fenoles y glucosinolatos, que las hacen recomendables debido a los numerosos efectos beneficiosos para la salud de estos compuestos (Vallejo et al., 2002).

1.1.3. Brócoli

El nombre científico del brócoli es *Brassica oleraceae* L. var. *italica* Plenck. Es originaria de las costas del Mediterráneo y Asia Occidental, su cultivo se extiende por Europa (Inglaterra, Dinamarca, Holanda, Francia, España y Grecia) a partir del siglo XVI (Maroto, 1989).

Hay referencias escritas de la época de los griegos, que se refieren a coliflor y brócoli como "Coles de Chipre", y posteriormente en diversas obras botánicas hispano-árabes como "Col de Siria", pero su nombre actual proviene del término Italiano "broco" que quiere decir brote, en alusión a la parte comestible y preciada de la planta.

También conocida como bróculi o brécol, es una planta bianual cultivada como anual, que presenta:

- Raíces ramificadas y profundas.

- Tallo único herbáceo y cilíndrico, de 3 a 6 cm diámetro y de 20 a 50 cm de alto, sobre el cual se disponen las hojas en forma helicoidal y rematada por la pella o cabeza principal.

- Hojas de color verde-azulado oscuro, rizadas, festoneadas, que llegan a presentar hendiduras en su base, dentadas, de lámina foliar amplia, cerosas, insertas en forma alterna y a distancias cortas, formando entrenudos cortos, lo que permite forma de roseta.

- La pella o cabeza es una masa de botones florales de los cuales la mayor parte puede desarrollarse totalmente (Nuez et al., 1999). Puede alcanzar un diámetro de 20 a 35 cm, dependiendo del cultivar y llegar a pesar aproximadamente 2 kg. Esta cabeza es de color verde y menos compacta que en la coliflor, y en las axilas de las hojas pueden aparecer también brotes florales laterales de menor tamaño.

- Las flores son características de las Brassicáceas (compuestas de cuatro sépalos y cuatro pétalos, formando una abertura terminal en forma de cruz), de color amarillo, inflorescencias racimosas y de polinización alógama.

- Fruto es una silicua (pequeña vaina) de color verde oscuro cenizo, que mide en promedio de 3 a 4 cm y que contiene de tres a ocho semillas por silicua.

- Semillas pequeñas (2 a 3 mm de diámetro) y redondeadas.

Los cultivares de brócoli se clasifican según el ciclo de formación de la pella, quedando divididas en: precoces o tempranas cuando se recolectan con menos de 90 días tras la siembra; intermedias si se cosechan entre 90 y 110 días después de plantarlas; y tardías cuando necesitan más de 110 días para alcanzar un adecuado desarrollo.

Crecen favorablemente en climas fríos y frescos, tolerando temperaturas de hasta -2 ºC, siempre y cuando no esté presente la inflorescencia en la planta, de lo contrario será fácilmente dañada por las bajas temperaturas, aunque la temperatura óptima de desarrollo es de 17 ºC y prefiere suelos no muy ligeros, uniformes, profundos con buen drenaje y con un pH óptimo de 6 a 7,5 (aunque soporta pH de 5 a 5,5).

Durante su desarrollo, el brócoli pasa por las siguientes fases:

- Juvenil: comienza con la germinación, y se caracteriza porque la planta produce únicamente hojas, y su duración es variable según la longitud del ciclo de cada cultivar y las condiciones de cultivo (Figura 1.3).

Figura 1.3. Plántula de brócoli.

- Inducción floral: se producen una serie de cambios fisiológicos por acción de bajas temperaturas que promueven la capacidad de formación del cogollo de

yemas hipertrofiadas. Cuando finaliza la fase de inducción floral, se termina la formación de nuevas hojas.

- Formación de la pella: en esta fase, las hojas más jóvenes tienden a cubrir la yema terminal, o meristemo que comienza a crecer y a formar la pella gracias a la acumulación de las reservas previamente elaboradas por las hojas. Estos procesos se pueden ver favorecidos por las bajas temperaturas y algunas labores culturales que tienen también un efecto positivo para la formación de la pella o cogollo (Figura 1.4).

Figura 1.4. Formación de la pella de brócoli.

- Floración: las ramificaciones preflorales inician un crecimiento, lo que hace perder a la pella su compacidad y firmeza, el color verde se pierde y las flores se abren (Figura 1.5).

Figura 1.5. Apertura de las flores de brócoli.

- Polinización y fructificación: una vez abiertas las flores se produce la polinización, que es cruzada y entomófila, que da lugar a los frutos en silicua, con semillas redondeadas de color pardo (Figura 1.6).

Figura 1.6. Semillas de brocóli.

Los brócolis deben cosecharse con el número de hojas exteriores necesarias para que la pella quede lo más cubierta posible. La recolección comienza cuando la longitud del tallo alcanza 5 ó 6 cm, posteriormente se van recolectando a medida que se van produciendo los rebrotes de inflorescencias laterales.

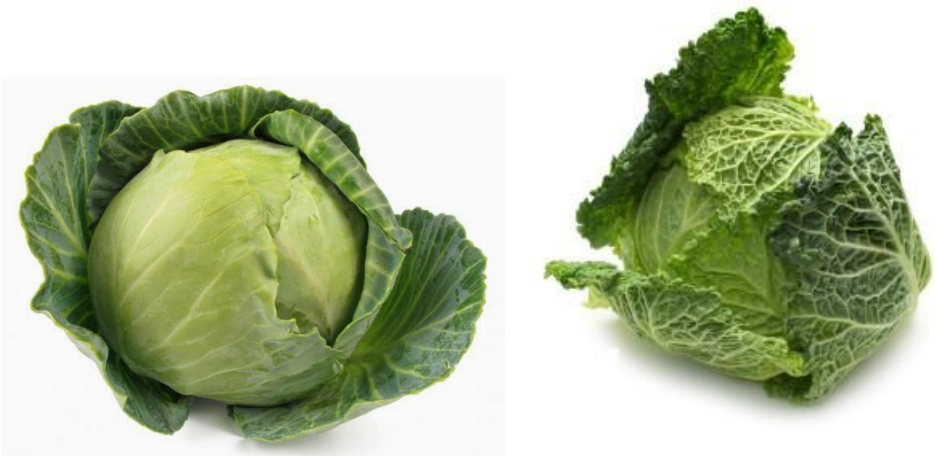
El brócoli de buena calidad debe tener las inflorescencias cerradas y de color verde oscuro brillante, compactas (firme a la presión de la mano) y el tallo bien cortado y de la longitud requerida (Cantwell y Suslow, 2005)

Las producciones varían según el cultivar, pero pueden estimarse unos rendimientos normales entre 15.000 y 25.000 kg/ha.

1.1.4. Coles

Conocidas como coles o repollos, también dentro de este grupo hay cierta diversidad de formas, su denominación botánica es *Brassica oleraceae* L. var. *capitata* L. para coles de hoja lisa (Figura 1.7A) y *Brassica oleraceae* L. var. *sabauda* L. para las de hoja rizada, también llamadas coles de Milán o de Saboya (Figura 1.7B) (Nuez et al., 1999). Su origen no está definido, encontrándose formas silvestres en las zonas costeras de toda Europa, las coles fueron domesticadas en la cuenca mediterránea, y eran

conocidas por los egipcios y cultivadas por los griegos, considerándose plantas con efectos medicinales (Maroto, 1989).



A **B**

Figura 1.7. Col de hoja lisa (A) y de hoja rizada (B).

Como los brócolis, las coles son plantas bianuales cultivadas como anuales y poseen:

- Raíz principal pivotante que penetra considerablemente en el suelo, de esta raíz pivotante deriva un sistema secundario, para la obtención de agua y nutrientes. El 80% de las raíces se encuentra entre los 5 y 30 cm de profundidad.

- Tallo herbáceo erguido, corto, poco ramificado, que adquiere una consistencia leñosa. Generalmente no sobrepasa los 30 cm de altura; debido a que el crecimiento en longitud se detiene en un estado temprano.

- Hojas alternas, simples, sin estípulas, con frecuencia lobuladas de color verde glauco o rojizas dependiendo de la variedad, de bordes ligeramente aserrados, forma más o menos oval y en el caso de las coles de Milán, ásperas al tacto y aspecto rizado.

- El cogollo o cabeza se origina por la hipertrofia de la yema vegetativa germinal y de la disposición envolvente de las hojas superiores (Figura 1.8), formándose una cabeza compacta de hojas muy apretadas que constituye la parte comestible; en esta parte la planta acumula reservas nutritivas durante el primer año, pero si se dejaran las plantas en el campo un segundo año, las reservas se movilizarían para emitir el tálamo floral.

Figura 1.8. Disposición envolvente de las hojas.

- Las flores se forman generalmente en racimos terminales, los cuales se desarrollan a partir del tallo principal. Son de color amarillo, compuestas de cuatro sépalos y cuatro pétalos, formando una abertura terminal en forma de cruz. Su polinización es alógama.

- Fruto es una silicua.

- Semillas pequeñas, de forma globular, superficie lisa y de tonalidades café en su completa madurez.

Se puede desarrollar en suelos de casi todo tipo de texturas, prefiriendo aquellos que tengan un contenido de materia orgánica entre medio y alto, buen drenaje, buena retención de humedad, profundos, con pH entre 5,5 y 6,5, rango en el que hay una adecuada disponibilidad de nutrientes, especialmente fósforo, elemento fundamental para obtener altas producciones. Como los brócolis, son plantas que se adaptan a una amplia diversidad de condiciones, aunque se desarrollan mejor en ambientes húmedos y frescos, llegando a resistir temperaturas muy bajas los cultivares de invierno.

En cuanto a la fisiología del crecimiento de coles, se distinguen tres periodos en el ciclo: la fase de crecimiento, que es la interesante en la producción de hortaliza; la fase de inducción floral; y la fase de floración, que resultan necesarias para la obtención de semillas y que pueden suponer un problema cuando se producen de manera accidental durante el cultivo de coles.

Las coles deben cosecharse con parte de las hojas externas y como índice de calidad se usa el color verde característico del cultivar, la firmeza y compacidad de la pella o cabeza, así como hojas crujientes y turgentes (Cantwell y Suslow, 2005).

Los rendimientos de producción se encuentran entre las 25 y las 50 toneladas por hectárea, dependiendo del cultivar.

1.2. Importancia económica

El sector hortofrutícola español ha seguido una evolución creciente a lo largo de los últimos años, contribuyendo de forma positiva al conjunto, ya que es el principal sector de la rama agraria de España. Sus principales características son su importancia económica y su contribución a la producción, con valores superiores al 30%. El valor de la producción del sector hortofrutícola (sin incluir flores y plantas, uva de vinificación ni aceitunas) se sitúa en 10.000 millones de euros (media 2008-2013) (MAGRAMA, 2014a).

El sector genera un total de 230.000 UTAs (Unidad de Trabajo Agrario) directas (24% del total del sector agrario), existiendo además 100.000 empleos indirectos de labores de manipulación y envasado de la producción hortofrutícola (MAGRAMA, 2014a).

La superficie dedicada en España al cultivo de frutas y hortalizas es de 1.571.000 hectáreas (media 2008-2010), de las cuales 650.000 hectáreas son de frutos de cáscara, de las restantes 921.000 hectáreas el 38% corresponde a hortalizas, el 34% a cítricos y el 28% a frutales no cítricos. En cuanto a la producción, España se encuentra en torno a las 24,2 millones de toneladas (media 2008-2012) de las que el 54% corresponde a hortalizas, el 24% a cítricos, el 11% a frutales no cítricos, el 9% a patata y el 2% a frutos de cáscara (MAGRAMA, 2014a).

España es el primer exportador de frutas y hortalizas de la Unión Europea y uno de los tres primeros exportadores mundiales junto con China y EEUU. El sector tiene una clara vocación exportadora ya que el 47% de la producción (media 2008-2012) se destina a la exportación, siendo además el primer subsector dentro del conjunto de las exportaciones del sector agroalimentario (MAGRAMA, 2014a).

Las exportaciones tienen una evolución creciente en los últimos años tanto en volumen como en valor, mientras que las importaciones son menos significativas y además en los últimos años están siguiendo una evolución decreciente. Los principales productos que se importan son el plátano, la piña, la manzana y el kiwi.

En el caso de las hortalizas, como se muestra en la Tabla 1.1, a lo largo de los últimos diez años ha ido disminuyendo la superficie de cultivo. En el último año de estudio, aunque fue menor la superficie, la producción y el valor fueron mayores.

Dentro de las hortalizas, la col de Milán y el brócoli, que son las que se estudian en este trabajo, han sufrido variaciones al igual que el resto de hortalizas a lo largo de los últimos años, siendo en el año 2012 la col de Milán la segunda en importancia, tanto en producción como en superficie cultivada dentro de las coles (Tabla 1.2) y el brócoli el principal dentro de las hortalizas de flor, con 360.055 toneladas de producción (MAGRAMA, 2014b).

Galicia es la región donde se produce más col de Milán y Murcia donde más se produce brócoli. En Extremadura es en la provincia de Badajoz donde se cultivan ambas brassicas mayoritariamente, con una producción 4.125 toneladas (MAGRAMA, 2014b).

Tabla 1.1. Superficie, Producción y Valor de Hortalizas.

Años	Superficie (miles de hectáreas)	Producción (miles de toneladas)	Valor (miles de euros)
2002	403	13.206	5.851.457
2003	397	13.194	6.415.585
2004	405	13.751	5.925.064
2005	407	13.896	6.794.138
2006	395	13.512	5.796.221
2007	380	13.501	6.287.555
2008	361	13.006	6.263.458
2009	379	14.031	6.061.507
2010	364	13.148	6.931.312
2011	351	12.973	5.220.725
2012	348	13.283	5.654.821

Fuente: Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. Anuario de Estadística 2013. (MAGRAMA, 2014b).

Tabla 1.2. Superficie y Producción de variedades de Col.

Años	Col-repollo de hojas lisas		Col-repollo de Milán		Col de Bruselas		Otras coles	
	S	P	S	P	S	P	S	P
2002	3,7	104,8	1,9	56,4	0,1	4,0	2,4	88,0
2003	3,0	92,7	1,8	50,9	0,1	3,0	2,9	122,1
2004	3,9	110,7	1,5	46,0	0,1	2,6	2,4	83,2
2005	4,6	149,1	1,5	44,7	0,1	2,2	2,5	86,1
2006	4,3	154,0	1,1	33,2	0,1	6,7	2,7	66,2
2007	4,3	143,5	1,4	40,0	0,1	1,6	2,1	54,8
2008	3,9	141,9	1,2	34,2	0,7	14,1	3,2	61,8
2009	2,9	105,8	1,7	70,7	0,1	2,0	3,2	55,4
2010	3,0	112,7	2,0	80,9	0,1	2,0	2,4	42,0
2011	2,6	94,7	2,0	73,6	0,1	2,2	1,4	42,6
2012	2,7	93,5	2,0	70,0	0,1	0,7	1,9	51,6

Fuente: Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. Anuario de Estadística 2013. (MAGRAMA, 2014b). S: superficie (miles de hectáreas). P: producción (miles de toneladas).

Con respecto al total del gasto en alimentación en los hogares españoles, que fue de 101.205 millones de euros, se vio incrementado en el año 2013 con respecto al 2012. El consumo dentro del hogar ascendió 2,4%, totalizando 69.225 millones de euros y decreció el consumo fuera del hogar un 3,1%, lo que supone 32.025 millones de euros (MAGRAMA, 2014c).

Por grupos de alimentos, las frutas y hortalizas son, dentro de toda la alimentación en el hogar, las que mayor volumen ocupan en la cesta de la compra, mientras que la carne es la que concentra mayor presupuesto dentro del hogar, según se desprende de los datos del Panel de Consumo Alimentario del Ministerio de Agricultura. Según esta misma fuente, en España en el 2013 se incrementó el consumo de hortalizas frescas en un 1,8% con respecto al 2012, siendo el brócoli la hortaliza cuyo consumo está experimentando el mayor crecimiento en los últimos años (MAGRAMA, 2014c).

Con todo ello, se puede afirmar que este aumento es debido a que los consumidores demandan, cada vez más, alimentos sanos y nutritivos que les aporten beneficios para la salud. Puede decirse que las brassicas en general y, particularmente el brócoli, son hortalizas que en los últimos años han ganado popularidad, gracias a sus buenas características organolépticas, a su fácil limpieza y preparación, a que están

incluidas en muchos de los preparados de verdura congelada, y a la difusión de los numerosos efectos beneficiosos para la salud que se les atribuyen.

1.3. Alimentos funcionales: marco legal europeo

Hoy en día no existe una definición consensuada de lo que es un alimento funcional. De hecho, la aproximación legislativa en los distintos países que se han ocupado del tema es muy diferente. Así, en el ámbito de la Unión Europea no se ha llevado a cabo una regulación de los alimentos funcionales como una categoría específica, a diferencia de Japón, país pionero no solo en la investigación sino también en la regulación de los alimentos funcionales. Desde el punto de vista normativo no existe el término alimento funcional, sino lo que se ha venido a regular son las declaraciones nutricionales y de propiedades saludables en los alimentos. El motivo es que no se trata de unos alimentos concretos sino de una denominación genérica que abarca a alimentos pertenecientes a diversas categorías y que coinciden en el hecho de que, consumidos a diario dentro de una dieta equilibrada, además de su valor nutritivo intrínseco, aportan un beneficio para la salud derivado de uno o varios de sus nutrientes, ingredientes o compuestos funcionales o bioactivos.

Los alimentos funcionales han despertado, en la industria alimentaria y en los consumidores europeos, un enorme interés derivado de su potencial como elementos que contribuyan a superar los retos que suponen las enfermedades de la civilización y el incremento de las expectativas de vida. Sin embargo, puede suponer un peligro potencial el consumo de productos cuya elaboración y comercialización no esté regulada por una normativa específica que garantice seguridad e información veraz a los consumidores así como lealtad comercial.

Todo ello explica la creación en el año 1996, en el marco de la Unión Europea, de la Acción Concertada de la Comisión Europea sobre la Ciencia de Alimentos Funcionales en Europa (FUFOSE, Functional Food Science in Europe) con el fin de proporcionar bases y fundamentos apropiados para el futuro desarrollo científico de la alimentación funcional (Roberfroid, 2002; FECYT, 2005). Así, según el documento de

consenso publicado en el año 1999 en Europa, se puede considerar que un alimento es funcional si:

- Está suficientemente demostrado que afecta de forma beneficiosa a una o más funciones en el organismo, más allá de sus adecuados efectos nutricionales, mejorando la salud y binenestar y/o reduciendo el riesgo de enfermedad. Por lo tanto, el efecto funcional es distinto al nutritivo.

- Es un alimento o forma parte de un alimento (ingrediente funcional). No deben considerarse medicamentos. Por lo tanto, se trata de un alimento no de una píldora, cápsula u otra presentación farmacéutica, y debe consumirse como parte de una dieta normal, esto es lo que los diferencia de los nutracéuticos.

- Demuestra sus efectos en cantidades que se supone que pueden ser consumidas normalmente en la dieta. No se debe inducir a un consumo excesivo.

- No tienen porqué resultar, o al menos no necesariamente, funcionales para todos los potenciales consumidores, dada la interacción que, a nivel individual, se da entre genes y dieta.

Por lo que respecta a su origen, los expertos consideran que un alimento funcional puede ser bien:

- Un producto sin transformar.

- Un alimento al que se le ha añadido un componente.

- Un alimento al que se le ha eliminado un componente por procedimientos tecnológicos o biotecnológicos.

- Un alimento cuya naturaleza o componentes han sido modificados.

- Una combinación de cualquiera de ellos.

El problema que existe con todo esto es la información que le llega al consumidor. En los últimos años el etiquetado y la publicidad de un número cada vez mayor de alimentos en la UE contienen, con carácter voluntario, declaraciones nutricionales y de propiedades saludables. El Reglamento (CE) 1924/2006 del

Parlamento Europeo y del Consejo de 20 de diciembre de 2006, relativo a las declaraciones nutricionales y de propiedades saludables en los alimentos, tuvo como fin complementar principios generales del etiquetado. Para ello, este Reglamento vino a establecer disposiciones específicas relativas al uso de las declaraciones nutricionales y de propiedades saludables en alimentos que vayan a suministrarse como tales a los consumidores, con el fin de garantizar un elevado nivel de protección de los consumidores y de facilitar que puede elegir entre los diferentes alimentos que deben ser seguros y poseer un etiquetado adecuado. Por eso el 25 de octubre de 2011 entra en vigor el Reglamento (UE) 1169/2011 del Parlamento Europeo y del Consejo sobre la información alimentaria facilitada al consumidor, por el que se modifican y derogan los reglamentos y directivas anteriores.

El fundamento científico debe ser el aspecto principal a tener en cuenta para uso de declaraciones nutricionales y de propiedades saludables. Las declaraciones solamente deben autorizarse para su uso en la Comunidad Europea después de efectuar una evaluación científica del nivel más elevado posible, tomando en consideración la totalidad de los datos científicos disponibles y la ponderación de las pruebas. Con el fin de garantizar una evaluación científica armonizada, es la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, European Food Safety Authority) la encargada de realizar estas evaluaciones. En el ámbito de las declaraciones, el papel de EFSA se centra en la evaluación de la eficacia, no de la seguridad, dado que el alimento o nutriente o bien tiene historia de consumo seguro o debe llevar un procedimiento paralelo de evaluación de su seguridad de acuerdo con la normativa de nuevos alimentos.

En este sentido, la Comisión Europea propuso basar el reconocimiento de los alimentos funcionales en estudios epidemiológicos y experimentales que serían evaluados, como ya se ha dicho, por la EFSA. De forma resumida dichos estudios deben cumplir:

- Que se hayan determinado analíticamente su compuestos bioactivos.
- Que exista evidencia científica de su eficacia, incluyendo estudios clínicos con humanos que representen la población diana.

- Se recomienda el uso de biomarcardores como indicadores de la eventual mejora de las funciones fisiológicas o como indicadores de la disminución del riesgo de enfermedad, como por ejemplo usar el colesterol-LDL, como biomarcador, para considerar que su reducción en sangre provoca un efecto beneficioso para la salud cardiovascular.

Hoy en día se sigue investigando para definir y obtener mayor conocimiento a cerca de los alimentos funcionales, sus propiedades y efectos sobre las funciones fisiológicas del cuerpo humano.

1.4. Compuestos funcionales en Brassicas

El aumento de la prevalencia de las enfermedades crónicas no transmisibles, como la hipertensión, la arteriosclerosis, el cáncer y la diabetes, entre otras, ha conducido a un mayor interés por estudiar la composición de la dieta, ya que parece haber una relación inversa entre la aparición de estas enfermedades y patrones alimentarios que involucran un alto consumo de frutas y verduras (García Casal, 2015). Así, un gran número de estudios epidemiológicos han demostrado que un consumo regular de vegetales de la familia de las Brasicáceas ayuda a la disminución del riesgo de padecer diferentes tipos de cáncer (Cohen et al., 2000; Vallejo et al., 2002). Este efecto beneficioso puede ser atribuido a los compuestos funcionales o bioactivos que poseen estos vegetales.

Las brassicas son consideradas alimentos funcionales, que se definen como "*aquellos alimentos, que en forma natural o procesada, contienen componentes biológicamente activos que ejercen efectos beneficiosos para la salud que van más allá de la nutrición*" (Vidal, 2008). Por ello es importante saber el contenido de compuestos funcionales en brassicas, así como, su actividad biológica.

Por tanto, los compuestos funcionales o compuestos bioactivos, presentes en los alimentos, son sustancias que proporcionan al alimento unas propiedades fisiológicas que van más allá de las nutricionales propiamente dichas. Estas sustancias parecen ser responsables, al menos en parte, del papel beneficioso para la salud asociado al consumo de frutas y hortalizas y alimentos derivados de ellas (Steinmetz y Potter,

1996). Entre estas sustancias o compuestos bioactivos se encuentran diversas familias químicas que poseen estructuras y propiedades muy variadas.

Los principales compuestos funcionales que poseen las brassicas son vitamina C, carotenoides, clorofilas, compuestos fenólicos y glucosinolatos, cuya actividad es sinérgica y actúan reduciendo el nivel de las especies reactivas de oxígeno (Podsedek, 2007), siendo por tanto, compuestos con actividad antioxidante.

Hay que destacar que la variación en el contenido de compuestos funcionales, así como de la capacidad antioxidante de las brassicas, es causada por muchos factores, entre los que cabe destacar: variedad, maduración y cosecha, condiciones de cultivo, condiciones ambientales, condiciones post-cosecha y formas de consumo (Vallejo et al., 2002; Jeffery et al., 2003).

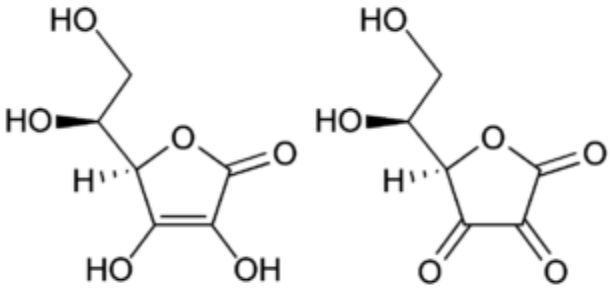
1.4.1. Vitamina C

Se considera que forma parte de las propiedades nutricionales de un alimento, pero cada vez más se está incluyendo dentro de las funcionales, por tener un efecto pronunciado sobre la mejora de la salud y la disminución del riesgo de sufrir ciertas enfermedades.

Más del 85% de la vitamina C en la dieta humana es suministrada por frutas y hortalizas (Davey et al., 2000; Lee y Kader, 2000). La vitamina C, que incluye el ácido ascórbico (Figura 1.9A) y su producto de oxidación, el ácido dehidroascórbico (Figura 1.9B), tiene muchas actividades biológicas en el cuerpo humano. Block y colaboradores en 2004 encontraron que la vitamina C podía reducir los niveles de proteína C-reactiva, un marcador de inflamación y, posiblemente, un predictor para enfermedades del corazón.

La vitamina C tiene un papel fundamental dentro de los vegetales ya que interviene en los sistemas de oxidación de la célula vegetal y establece potenciales favorables de oxidación-reducción. Pero una vez consumida, formando parte de algún alimento, es el ácido L-ascórbico el que tiene mayor función biológica, pudiéndose definir como un cofactor enzimático, como un captador de radicales y como un donador/aceptor en el trasporte de electrones en la membrana plasmática (Davey et al.,

2000); por tanto el ácido ascórbico tiene mayor capacidad antioxidante que el ácido dehidroascórbico.



A **B**

Figura 1.9. Estructura química del ácido L-ascórbico (A) (forma reducida de la vitamina C) y del ácido dehidroascórbico (B) (forma oxidada de la vitamina C).

Estudios más recientes de Martínez Silva y Bastidas Pacheco (2009) han comprobado que las propiedades de la vitamina C, más concretamente del ácido ascórbico, son variadas y complejas, referidas la mayoría de ellas al papel como antioxidante de las especies de oxígeno reactivas que se generan durante la respiración mitocondrial, que afecta irremediablemente al sistema inmunitario, circulatorio y respiratorio, visión, metabolismo, piel y, en general, a todas las células del organismo. De esta complejidad funcional de la vitamina C deriva la necesidad de la ingesta diaria de esta vitamina, teniendo en cuenta que es una vitamina muy sensible a la luz y al calor.

1.4.2. Carotenoides

Los carotenoides son pigmentos orgánicos del grupo de los terpenos o isoprenoides que se encuentran de forma natural en plantas y otros organismos fotosintéticos como algas, algunas clases de hongos y bacterias. Se conoce la existencia de más de 700 compuestos pertenecientes a este grupo.

Los carotenoides son el grupo más representativo de los tetraterpenos, compuestos que se caracterizan por una estructura con 40 átomos de carbono, aunque no todos los carotenoides se ajustan estrictamente a esta regla. Estos átomos de carbono se

encuentran ordenados formando cadenas poliénicas conjugadas, en ocasiones terminadas en anillos de carbono. Se dividen en dos tipos básicos: los carotenos que son hidrocarburos y las xantofilas que son sus derivados oxigenados.

El color de los carotenoides varía desde amarillo pálido, pasando por anaranjado, hasta rojo oscuro. El color está directamente relacionado con su estructura, los enlaces dobles carbono-carbono interactúan entre sí en un proceso llamado conjugación. Cuando aumenta el número de dobles enlaces conjugados, la longitud de onda de la luz absorbida también lo hace, dando al compuesto una apariencia más rojiza.

La principal función de los pigmentos carotenoides, tanto en vegetales como en bacterias, es captar energía luminosa, energía que es luego transferida a las clorofilas para ser transformada durante la fotosíntesis. Además, también intervienen especialmente en la protección contra la foto-oxidación, ya que los dobles enlaces conjugados de su estructura química (Figura 1.10) hacen que sean captadores de radicales, aportándoles efectos antioxidantes, como son la protección cardiovascular y antitumoral (Podsedek, 2007) una vez que son consumidos. Por esto, los carotenoides juegan un papel importante en la salud humana, actuando como antioxidantes biológicos, protegiendo a las células y tejidos del daño provocado por los radicales libres.

El β-caroteno y la luteína (Figura 1.10A y 1.10B, respectivamente) son los principales carotenoides en el género *brassica*. Como todos los carotenoides forman parte de la fracción lipídica de los sistemas biológicos, protegiendo a las membranas de los radicales libres. Tienen un efecto muy importante sobre la vista, puesto que el β-caroteno es precursor de la vitamina A, y la luteína se encuentra específicamente en la mácula y la lente del ojo, reduciendo el riesgo de enfermedades oculares graves, tales como la degeneración macular relacionada con la edad y las cataratas (Bone et al., 1997; Singh et al., 2006).

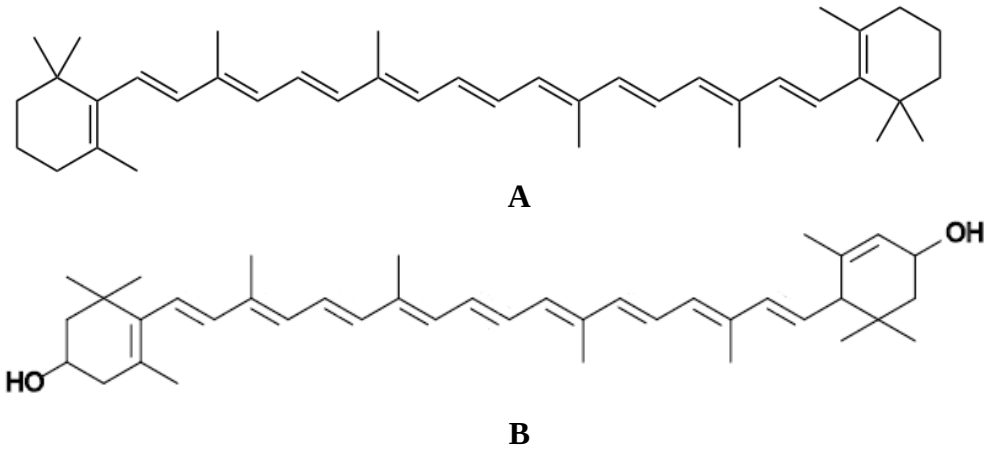


Figura 1.10. Estructura química del β-caroteno (caroteno) (A) y de la luteína (xantofila) (B).

Resulta de gran importancia conocer qué factores intervienen en la degradación de los carotenoides, ya que su pérdida, además de producir cambios de color en el alimento, conlleva una disminución de su valor nutritivo y funcional. La inestabilidad de los carotenoides se debe al hecho de que son compuestos altamente insaturados, degradándose fundamentalmente debido a procesos oxidativos. Otros factores como la temperatura, la luz o el pH también pueden producir importantes cambios cualitativos en estos compuestos debido a reacciones de isomerización (Meléndez-Martínez et al., 2004).

1.4.3. Clorofilas

Las clorofilas son una familia de pigmentos que están ampliamente distribuidos en la naturaleza. Se encuentran en diversos eucariotas que poseen cloroplastos (plantas, algas) y en algunos procariotas como bacterias (cianobacterias, bacterias verdes y púrpuras), las cuales no poseen cloroplastos, y por lo tanto, sus pigmentos se encuentran en sistemas de membrana internos. La clorofila es una biomolécula muy importante, responsable de la existencia de vida superior en la Tierra, debido a que es el pigmento fotorreceptor responsable de la primera etapa de la fotosíntesis, donde el contacto de las partículas luminosas (fotones) con la clorofila produce una excitación de la misma, desencadenando una serie de reacciones fotoquímicas, produciendose la transformación de la energía de la luz solar en energía química.

La clorofila presenta color verde porque es capaz de absorber la luz violeta, roja y azul, y reflejar la verde.

La estructura de la molécula de clorofila tiene dos partes: un anillo de porfirina (con un ion magnesio en el centro) y una cadena larga llamada fitol. Es un tetrapirrol, con cuatro anillos pentagonales de pirrol enlazados para formar un anillo mayor que es la porfirina. Los compuestos clorofílicos mayoritarios en las plantas son la clorofila A y la clorofila B (Figura 1.11). Ambas clorofilas son componentes genuinos de las membranas fotosintéticas, y están normalmente en un ratio de 3:1 (Chen y Chen, 1993), si bien las condiciones de crecimiento y los factores medioambientales, entre otros, modifican este ratio clorofila A/clorofila B (Lichtenthaler et al., 1982).

La descomposición de las clorofilas está fuertemente ligada a la senescencia de los vegetales verdes después de la recolección, así como a la marchitez de las hojas (Deschene et al., 1991; Zhuang et al., 1995). La oxidación-degradación de las clorofilas da productos como feofitina, feofórbido y clorofilina que son de colores más pardos, y es debida a factores tales como la temperatura, pH, luz, oxígeno, así como a la acción de la enzima clorofilasa.

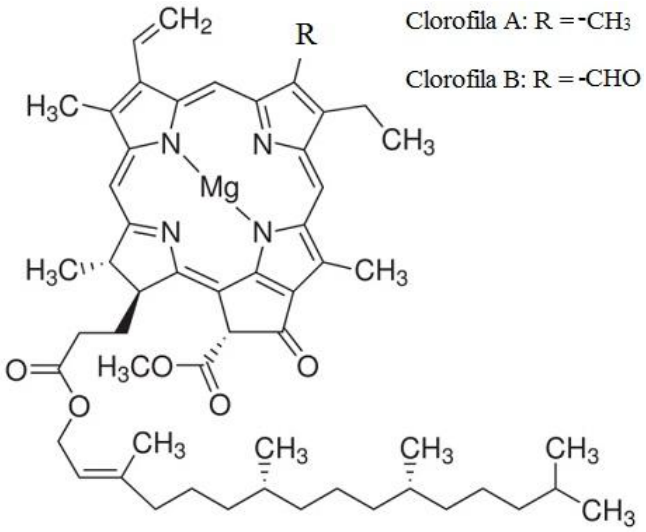


Figura 1.11. Estructura química de la clorofila A y de la clorofila B.

Pero además de estar relacionada con la calidad de los vegetales verdes, Lai et al. (1980) demostraron que existía una relación entre la actividad antimutagénica y antioxidante y el contenido en clorofilas en muchos extractos vegetales.

1.4.4. Compuestos fenólicos

Los fenoles o compuestos fenólicos son compuestos orgánicos cuyas estructuras moleculares contienen al menos un grupo fenol, un anillo aromático con un grupo hidroxilo (-OH) unido al menos a un grupo funcional. El término "compuestos fenólicos" engloba a todas aquellas sustancias que poseen varias funciones fenol (nombre tradicional del hidroxibenceno) unidas a estructuras aromáticas o alifáticas. Únicamente, algunos compuestos fenólicos de la famila de los ácidos fenólicos no son polifenoles, sino monofenoles (Gimeno Creus, 2004).

Los compuestos fenólicos son unos de los principales metabolitos secundarios de las plantas, por lo tanto, son productos biosintetizados en las plantas en las que desarrollan diversas funciones, como la protección frente a condiciones externas adversas. Se encuentran en casi todos los alimentos de origen vegetal aportando color, sabor amargo, astringencia y/o aroma, siendo su distribución muy diversa dentro de las plantas (hojas, flores, frutos, semillas, tallos, raíces). Los compuestos fenólicos, especialmente los flavonoides, poseen diferente actividad biológica en el ser humano, siendo las más importantes la actividad antioxidante y el efecto inhibidor de varias clases de tumores (Czeczot, 2000).

Los compuestos fenólicos de las plantas son un grupo heterogéneo de productos con más de 10.000 compuestos. Algunos son solubles en disolventes orgánicos, otros son solubles en agua, y otros son polímeros muy grandes e insolubles.

Se pueden clasificar de muchas maneras debido a su diversidad estructural. Según su estructura química, pueden dividirse en dos grandes grupos (Gimeno Creus, 2004):

1) No flavonoides, entre los que se pueden establecer tres subgrupos:

    - Fenoles no carboxílicos.

    - Ácidos fenólicos: derivados del ácido benzoico y derivados del ácido cinámico.

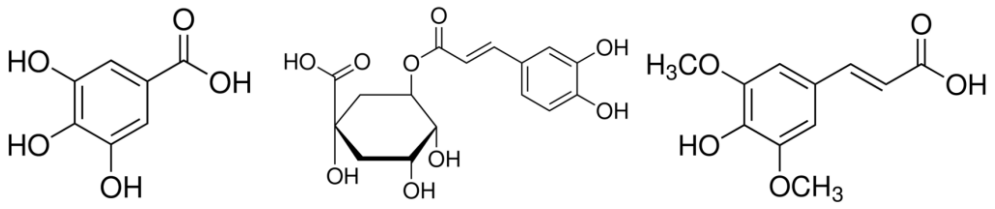
    - Estilbenos.

2) Flavonoides, formados por dos grupos bencénicos unidos por un puente tricarbonado, que pueden agruparse en siete subgrupos:

- Antocianos o antocianinas.
- Flavanoles (flavan-3-oles).
- Flavanonas.
- Flavonoles.
- Flavonas.
- Isoflavonoides.
- Chalconas.

Hay que tener en cuenta, que la mayoría de los compuestos fenólicos se presentan en las células vivas de forma combinada, generalmente como *O*-glicósidos. Se denomina aglicona a la porción diferente del azúcar que se obtiene por hidrólisis de los glicósidos (Gimeno Creus, 2004).

En las brassicas objeto de este estudio, después de la hidrólisis ácida de las muestras, se consiguieron identificar los siguientes compuestos fenólicos: tres ácidos fenólicos (ácidos gálico, clorogénico y sinápico, Figura 1.12A, B y C, respectivamente) y dos flavonoles (quercetina y kaempferol, Figura 1.13).



A **B** **C**

Figura 1.12. Estructuras químicas de los ácidos fenólicos: gálico (A) (derivado hidroxibenzoico), clorogénico (B) y sinápico (C) (derivados hidroxicinámicos).

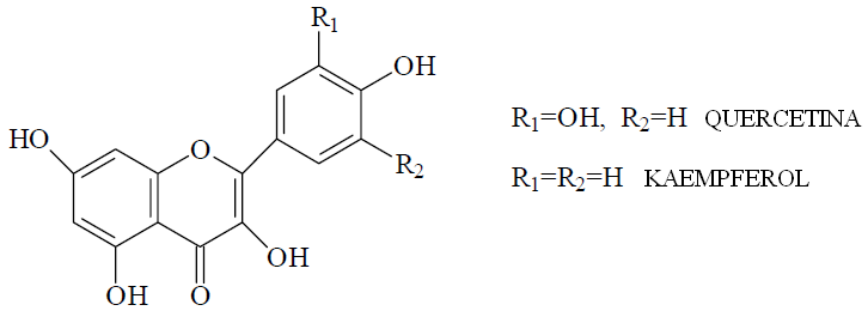


Figura 1.13. Estructura química de los flavonoles: quercetina y kaempferol.

El desarrollo y evolución de los compuestos fenólicos incide sobre la calidad de los productos y está en parte regulado por la actividad de la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL), que interviene en la formación de compuestos fenólicos, y por la actividad de la enzima polifenol oxidasa (PPO), que interviene en la degradación de polifenoles a quinonas, las cuales proporcionan una coloración oscura o parduzca en la zona dañada (por oxidación, corte, etc) del producto hortofrutícola (Dixon, 2001). Resaltar, que la degradación de los compuestos fenólicos, a parte de por oxidación enzimática, en la que interviene la enzima PPO, puede producirse por oxidación no enzimática, ya sea de naturaleza química o microbiológica.

1.4.5. Glucosinolatos

El término glucosinolatos fue sugerido por primera vez en 1961 por GP Dateo (Ettlinger y Kjaeer, 1968), y la interpretación dada hace referencia a la fracción de glucosilo (“gluco”), la presencia de un grupo sulfato (“ato”) y la propiedad de ser un precursor de un aceite de mostaza (“sinol”) (Agerbirk y Olsen, 2012).

Los glucosinolatos son compuestos azufrados también llamados tioglucósidos. Son metabolitos secundarios presentes en once familias de dicotiledóneas. Pero es el género *brassica* el que presenta una tercera parte de los 100 tipos de glucosinolatos conocidos. Estos compuestos se encuentran tanto en los tejidos vegetativos como en los tejidos reproductivos de la planta, y constituyen un mecanismo de defensa de la misma ante plagas y enfermedades (Mithen, 1992).

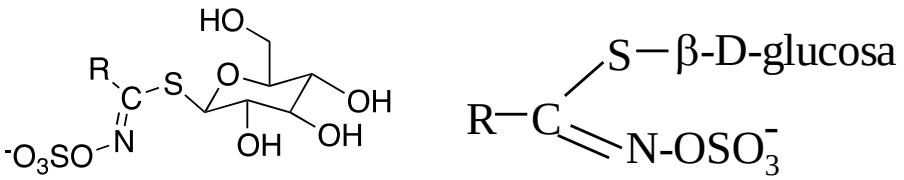
Las rutas de biosíntesis de los glucosinolatos comprenden procesos de elongación de la cadena de aminoácidos de proteínas y consta de tres etapas que son (Sonderby et al., 2010):

1ª etapa: alargamiento del aminoácido de cadena.

2ª etapa: formación de la estructura del núcleo.

3ª etapa: modificación secundaria del glucosinolato inicial.

La molécula de los glucosinolatos está constituida por un grupo β-D-tioglucósido unido a una oxima sulfatada con una cadena lateral (R) derivada de un aminoácido (metionina, valina, alanina, leucina, isoleucina, fenilalanina, tirosina o triptófano) (Mikkelsen et al., 2002) (Figura 1.14).



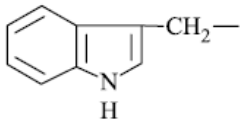
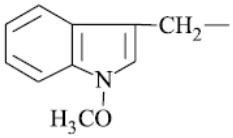
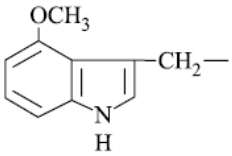
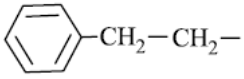
A **B**

Figura 1.14. Estructura química general desarrollada (A) y abreviada (B) de los glucosinolatos.

Dependiendo de la cadena lateral (R), los glucosinolatos se dividen en tres grandes grupos: alifáticos, derivados de la metionina, alanina, valina, leucina o isoleucina; indólicos, derivados del triptófano; y aromáticos; derivados de la fenilalanina o tirosina (Wittstock y Halkier, 2002). Estos glucosinolatos se transportan por el floema y pueden ayudar a la planta a defenderse de los organismos que se alimentan de los productos del floema y también a adquirir la capacidad para coordinar la síntesis y el uso de los recursos de protección entre los distintos órganos (Chena y Andreassonb, 2001).

En la Tabla 1.3 se muestran los glucosinolatos alifáticos, indólicos y aromáticos identificados en las brassicas estudiadas, así como la estructura de la cadena lateral R para cada uno de ellos, su nombre científico y su nombre común.

Tabla 1.3. Estructura de la cadena lateral R, nombre químico y nombre común de los glucosinolatos identificados.

Estructura de R	Nombre químico	Nombre común
1. Alifáticos		
1.1. Alquílicos		
CH_3-SO-CH_2-CH_2-CH_2-	3-metilsulfinilpropil glucosinolato	Glucoiberina
CH_3-SO-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-	4-metilsulfinilbutil glucosinolato	Glucorafanina
CH_3-SO-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-	5-metilsulfinilpentil glucosinolato	Glucoalisina
1.2. Alquenílicos		
CH_2=CH-CH_2-	2-propenil o alil glucosinolato	Sinigrina
CH_2=CH-CH_2-CH_2-	3-butenil glucosinolato	Gluconapina
CH_2=CH-CH_2-CH_2-CH_2-	4-pentenil glucosinolato	Glucobrasicanapina
1.3. Hydroxialquenílicos		
CH_2=CH-CHOH-CH_2-	2-hidroxi-3-butenil glucosinolato	Progoitrina
2. Indólicos		
	3-indolilmetil glucosinolato	Glucobrasicina
	1-metoxi-3-indolilmetil glucosinolato	Neoglucobrasicina
	4-metoxi-3-indolilmetil glucosinolato	4-Metoxiglucobrasicina
3. Aromáticos		
	2-feniletil glucosinolato	Gluconasturtina

La identificación y cuantificación de los glucosinolatos puede realizarse sin llevar a cabo la desulfatación o eliminación del grupo sulfato, y en este caso, se denominan glucosinolatos intactos, de esta forma es como se han determinado en esta Tesis Doctoral. Sin embargo, en otros trabajos experimentales, como en los de Jia et al.

(2009) y Kiddle et al. (2001), se determinan como glucosinolatos desulfatados o desulfoglucosinolatos, después de realizar una ruptura química o enzimática del grupo sulfato (mediante la utilización de la enzima arilsulfatasa) para facilitar la separación cromatográfica y la detección por espectrometría de masas.

La hidrólisis de los glucosinolatos está catalizada por la enzima mirosinasa, que es una β-tioglucosidasa llamada tioglucósido glucohidrolasa (Figura 1.15). Los glucosinolatos y la enzima mirosinasa se encuentran localizados en compartimentos independientes en la célula. Cuando se produce un proceso de estrés en la planta, se origina la ruptura de la célula, y la molécula de glucosinolato y la enzima entran en contacto, produciéndose la liberación de moléculas de glucosa, de bisulfato y de la correspondiente aglucona (Campas-Baypoli et al., 2009).

El proceso de hidrólisis también ocurre en la masticación y en la digestión, debido a la mirosinasa presente en la microflora del tracto digestivo de los humanos (Bones y Rossiter, 1996; Fahey et al., 2001).

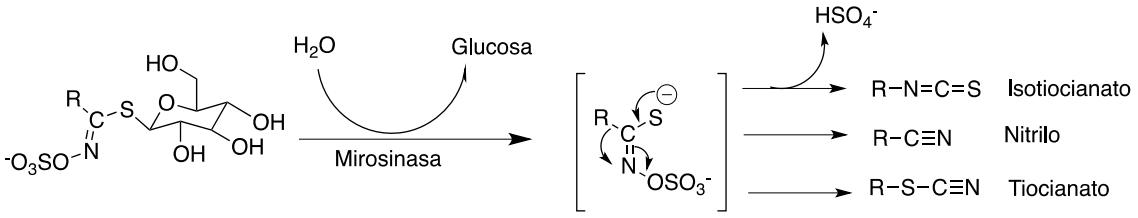


Figura 1.15. Hidrólisis de los glucosinolatos catalizada por la enzima mirosinasa.

Uno de los productos de la hidrólisis o degradación de los glucosinolatos son los isotiocianatos, que son los compuestos volátiles responsables del olor y del sabor amargo atribuido a las brassicas, así como de la acción biológica de los glucosinolatos (Fahey et al., 2001). Además, según estudios científicos, se ha detectado que dietas ricas en vegetales del género *brassica* reducen la inidencia de ciertos tipos de cáncer, especialmente de pulmón y del tracto digestivo (Wollowski et al., 2001).

Hay que tener en cuenta que la enzima mirosinasa es sensible a la temperatura y, consecuentemente, durante los tratamientos térmicos ocurridos en los procesos de

cocción se inactiva, y no puede transformar los glucosinolatos en productos beneficiosos (Cartea et al., 2008a).

1.5. Actividad antioxidante

Un antioxidante es una molécula capaz de retardar o prevenir la oxidación de otras. La oxidación es una reacción química de transferencia de electrones de una sustancia a un agente oxidante. Las reacciones de oxidación pueden producir radicales libres que comienzan reacciones en cadena que dañan las células. Los antioxidantes terminan estas reacciones quitando intermedios del radical libre e inhiben otras reacciones de oxidación oxidándose ellos mismos.

Las reacciones de oxidación son cruciales para la vida, ya que el oxígeno es esencial para los organismos vivos. Aunque la generación de especies reactivas del oxígeno (ROS) y radicales libres (RL) es inevitable en el metabolismo aerobio. Las especies oxidantes provocan daños acumulativos en moléculas muy importantes para el correcto funcionamiento del organismo. Sin embargo, éste tiene sus propios mecanismos de defensa para hacer frente a la acción de las especies oxidantes. Aunque en determinadas situaciones las defensas antioxidantes pueden verse desbordadas por la excesiva generación de ROS. Este desequilibrio entre especies oxidantes y antioxidantes se conoce como estrés oxidativo, el cual está asociado a numerosas enfermedades y al proceso normal de envejecimiento (Lee et al., 2004).

El estrés oxidativo puede originarse por dos motivos fundamentales:

1. Disminución de los niveles de antioxidantes debido a mutaciones que afectan a la actividad de los enzimas antioxidantes, o a toxinas que causan depleción de las defensas antioxidantes. Por ejemplo, dietas inadecuadas que aportan niveles bajos de minerales y/o compuestos antioxidantes pueden causar también estrés oxidativo.

2. Aumento en la producción de especies reactivas a causa de la exposición a elevados niveles de O_2 u otras especies reactivas y debido a la activación excesiva de los mecanismos naturales que generan especies reactivas, como por ejemplo la activación inapropiada de fagocitos en la inflamación crónica.

Debido a la acción oxidante de las especies reactivas sobre los lípidos de membrana, las proteínas celulares y los ácidos nucleicos (ADN, ARN), éstas han sido asociadas con numerosas enfermedades crónicas, entre las que se encuentran las dos mayores causas de mortalidad en las sociedades occidentales, el cáncer y las enfermedades cardiovasculares (Lee et al., 2004), así como con el proceso de envejecimiento.

La alimentación juega un papel importante en la prevención de enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo, fundamentalmente a través del aporte de compuestos bioactivos de origen vegetal. Entre ellos se encuentran las vitaminas hidrosolubles y liposolubles, carotenoides, clorofilas, una gran variedad de compuestos fenólicos y de glucosinolatos, cuya actividad antioxidante y potenciales efectos beneficiosos han sido ampliamente investigados en los últimos años (Lai et al., 1980; Lampe, 1999; Prior, 2003; Sonderby et al., 2010). Las evidencias epidemiológicas que asocian el consumo de vegetales y frutas con una menor incidencia de enfermedades crónicas, así como la mayor preocupación de los consumidores por mantener un estado de salud adecuado, están haciendo que se investigue cada vez más en la composición funcional de los alimentos y sobre cómo actúan éstos en el organismo humano.

Seguidamente se relacionan algunos antioxidantes aportados con la dieta, así como su bioactividad:

Ácido ascórbico: Reacción con superóxido, oxígeno singlete y radical peroxilo. Regeneración de tocoferoles.

Tocoferoles: Protección de membranas lipídicas. Bloqueo de la cadena de reacciones de peroxidación.

Carotenoides: Desactivación del oxígeno singlete. Bloqueo de la cadena de reacciones de peroxidación.

Compuestos fenólicos: Captación de radicales libres y actividad quelante de metales.

Glucosinolatos: Captación de radicales libres y actividad quelante de yodo.

Clorofila: Captación de radicales libres. Formación de nuevos complejos.

El efecto beneficioso del consumo de Brassicas es atribuido principalmente a la gran cantidad de compuestos antioxidantes que poseen estos vegetales. Estos compuestos, como se ha dicho antes, poseen la capacidad para donar un electrón a los radicales libres y detener así la reacción en cadena dañina para el organismo, ya que se convierten en otros radicales o compuestos menos reactivos, es decir, más estables (García Casal, 2015).

1.6. Digestión

La digestión se define como "*el proceso de transformación de los alimentos, previamente ingeridos, en sustancias más sencillas para ser absorbidas*", y tiene lugar tanto en los organismos pluricelulares como en las células.

La digestión en los animales y algunas plantas tiene lugar a niveles multicelular, celular y subcelular. Este proceso se lleva a cabo en el aparato digestivo, tracto gastrointestinal o canal alimentario.

El sistema gastrointestinal en el hombre incluye el tracto gastrointestinal (tubo digestivo o tracto digestivo) y las glándulas anejas.

El tracto digestivo comienza en la boca y termina en el ano (Figura 1.16). A lo largo de su recorrido (unos 9-10 m) existen una serie de segmentos y estructuras diferenciadas que cumplen un papel específico en la función global de este sistema orgánico. Estas estructuras son, en sentido oral-aboral, boca, faringe, esófago, estómago, intestino delgado, que incluye tres segmentos, duodeno, yeyuno e íleon, intestino grueso que se subdivide en ciego, colon ascendente, transverso, descendente y sigmoideo, recto y ano.

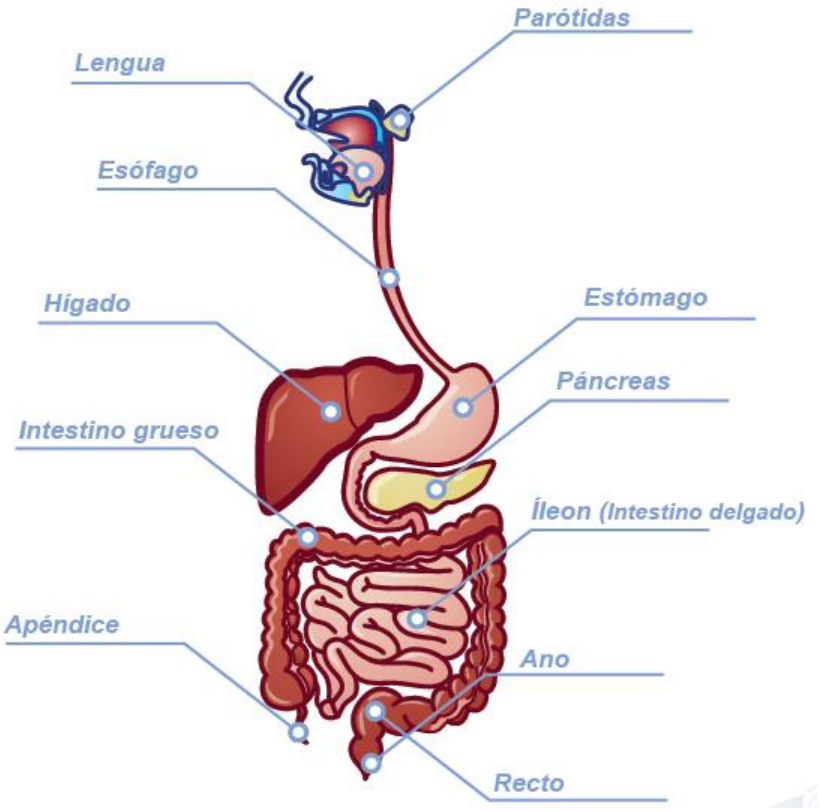
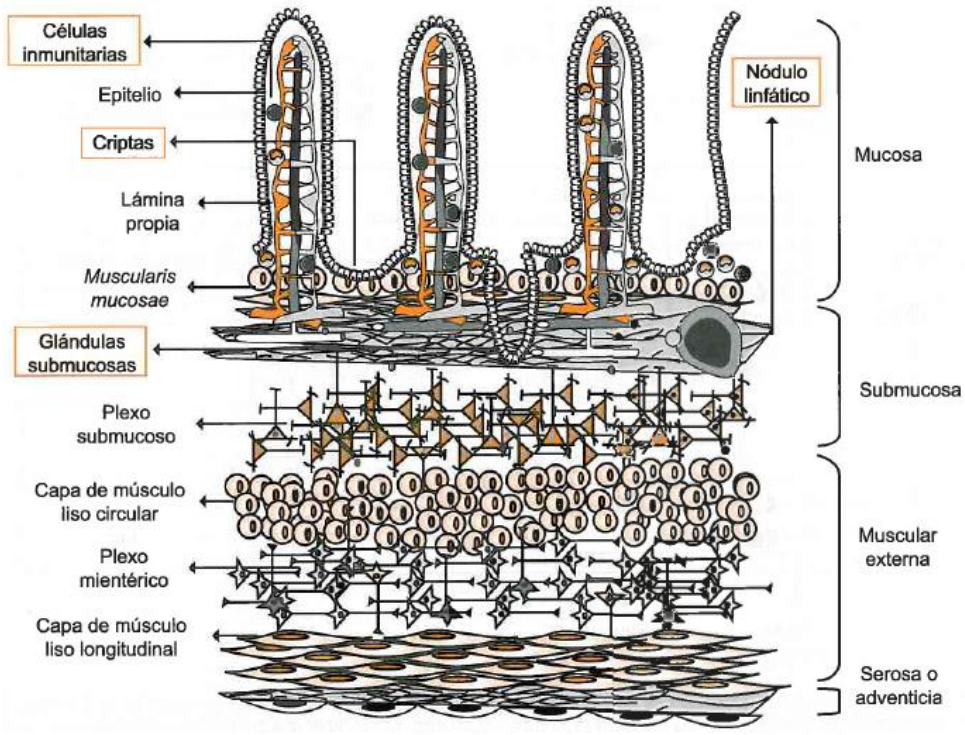


Figura 1.16. Esquema del tracto digestivo.

Las glándulas anejas son las glándulas salivares, el páncreas y el hígado (incluyendo la vesícula biliar).

La estructura de la pared del tubo digestivo es diferente en los distintos segmentos que lo componen, aunque existe un patrón común que se repite en toda su longitud (Figura 1.17), siendo la capa más interna la mucosa.

La digestión usualmente está dividida en procesos mecánicos, para reducir el tamaño de los alimentos, y en una acción química para reducir adicionalmente el tamaño de las partículas y prepararlas para la absorción (Matón et al., 1993), es decir, que puedan atravesar la pared del aparato digestivo y pasar a la sangre. En la mayoría de los vertebrados, la digestión es un proceso de varias etapas en el sistema digestivo.



Fuente: www.uco.es/master_nutricion/nb/Gil%20Hernandez/digestion.pdf (Fisiología de la Digestión)

Figura 1.17. Esquema de un corte longitudinal de la pared del tracto gastrointestinal.

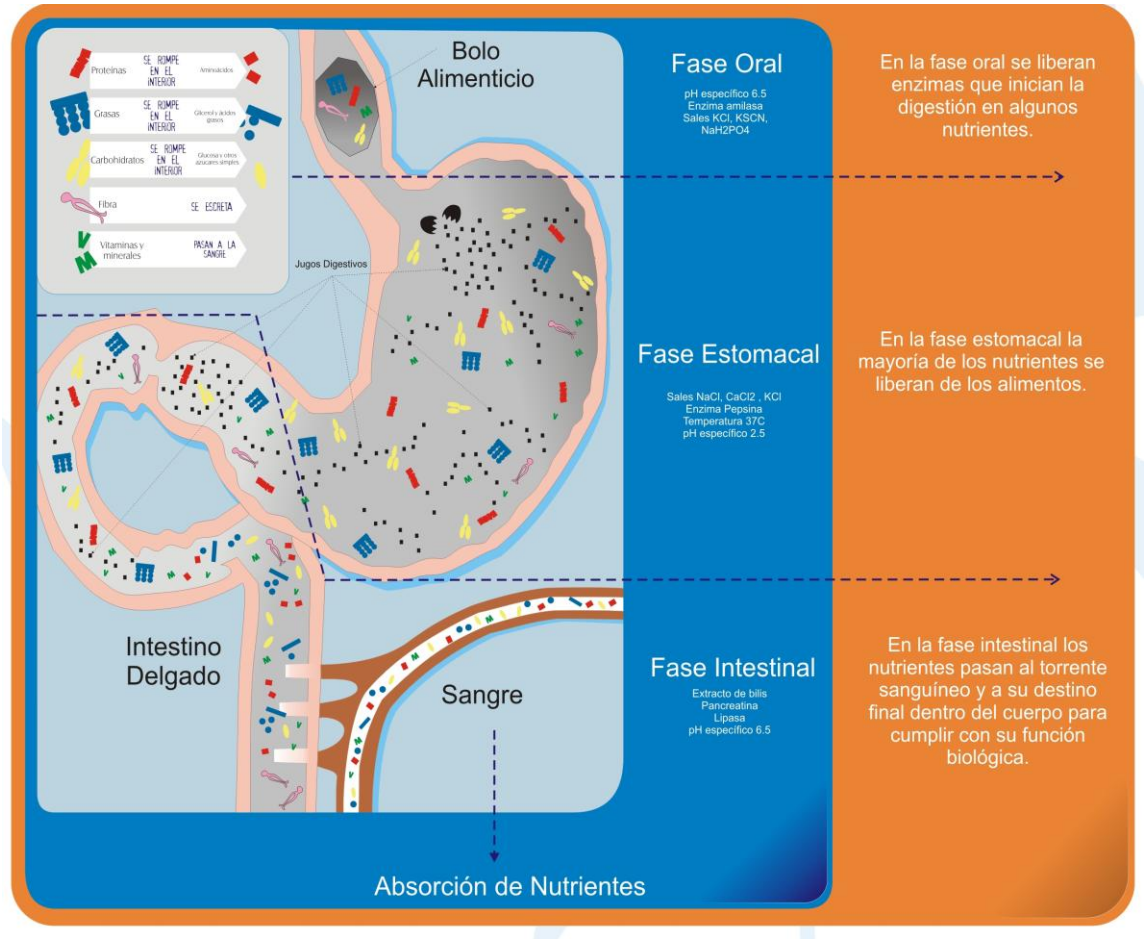
La parte mecánica de la digestión incluye la masticación, deglución, la peristalsis y la defecación o eliminación de los alimentos (Martínez de Victoria Muñoz et al., 2005).

En la boca se produce la mezcla y humectación del alimento con la saliva, mientras éste es triturado mecánicamente por masticación, facilitando la deglución. La saliva contiene ptialina, una enzima que hidroliza una pequeña parte del almidón a maltosa.

La lengua ayuda a movilizar los alimentos mientras se mastica con los dientes y empuja la comida triturada y ablandada, llamada bolo alimenticio, hacia la parte posterior de la garganta, para que entre por la abertura del esófago.

De la boca, el alimento pasa rápidamente al esófago que conduce el bolo alimenticio desde la parte posterior de la garganta hasta el estómago (Figura 1.18). Una

vez que la comida entra en el esófago, no va inmediatamente al estómago. En lugar de ello, los músculos de las paredes del esófago se mueven describiendo un movimiento ondulatorio para ir aplastando el alimento, al tiempo que lo hacen descender hacia el estómago.



Fuente: CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). HarvestPlus, Agrosalud.
Figura 1.18. Fases de digestión gastrointestinal.

Después pasa al estómago, donde se mezcla con los jugos gástricos constituidos por pepsina (una enzima que comienza la digestión de las proteínas), ácido clorhídrico y el factor intrínseco, necesario para que la vitamina B12 se absorba posteriormente. El tiempo de permanencia del quimo (mezcla semilíquida del alimento) depende de múltiples factores, como por ejemplo, el tipo de alimento. Aquellos ricos en grasas permanecen más tiempo y los que tienen grandes cantidades de hidratos de carbono pasan rápidamente.

En el intestino delgado tiene lugar la mayor parte de los procesos de digestión y absorción. El alimento se mezcla con la bilis, el jugo pancreático y los jugos intestinales. Durante la fase química de la digestión diferentes enzimas rompen las moléculas complejas en unidades más sencillas que ya pueden ser absorbidas y utilizadas. Algunas de las enzimas más importantes son la lipasa (que rompe las grasas en ácidos grasos), la amilasa (que hidroliza el almidón) y las proteasas (tripsina y quimotripsina, que convierten las proteínas en aminoácidos).

En el intestino grueso, las sustancias que no han sido digeridas pueden ser fermentadas por las bacterias presentes en él, dando lugar a la producción de gases. Igualmente las bacterias pueden sintetizar vitaminas del grupo B y vitamina K, aportando cantidades adicionales de estas vitaminas que serán absorbidas (Monagas et al., 2010; Queipo-Ortuño et al., 2012).

El proceso de absorción de nutrientes se produce principalmente y con una extraordinaria eficacia a través de las paredes del intestino delgado, donde se absorbe la mayor parte del agua, alcohol, azúcares, minerales y vitaminas hidrosolubles así como los productos de digestión de proteínas, grasas e hidratos de carbono. Las vitaminas liposolubles se absorben junto con los ácidos grasos.

La absorción puede disminuir notablemente si se ingieren sustancias que aceleran la velocidad de tránsito intestinal, como la fibra dietética ingerida en grandes cantidades y los laxantes. Igualmente, la fibra y el ácido fítico pueden reducir la absorción de algunos minerales, como el hierro o el zinc, por ejemplo. En la enfermedad celíaca (o intolerancia al gluten), la destrucción de las vellosidades intestinales puede reducir significativamente la superficie de absorción.

En el intestino grueso, donde se reabsorbe una importante cantidad de agua del residuo que llega del intestino delgado, se almacenan las heces hasta ser excretadas por el ano. Las heces, además de los componentes no digeridos de los alimentos, contienen gran cantidad de restos celulares, consecuencia de la continua regeneración de la pared celular.

Una vez absorbidos los nutrientes son transportados por la sangre hasta las células en las que van a ser utilizados.

Los ácidos grasos que pasan a la pared intestinal son transformados inmediatamente en triglicéridos que serán transportados hasta la sangre por la linfa. La grasa puede ser transformada posteriormente en el hígado y finalmente se deposita en el tejido adiposo, una importante reserva de grasa y de energía.

Los hidratos de carbono en forma de monosacáridos pasan a la sangre y posteriormente al hígado desde donde pueden ser transportados como glucosa a todas las células del organismo para ser metabolizada y producir energía. La insulina es necesaria para la incorporación de la glucosa a las células. Los monosacáridos también pueden ser transformados en glucógeno, una fuente de energía fácilmente utilizable que se almacena en el hígado y en los músculos esqueléticos.

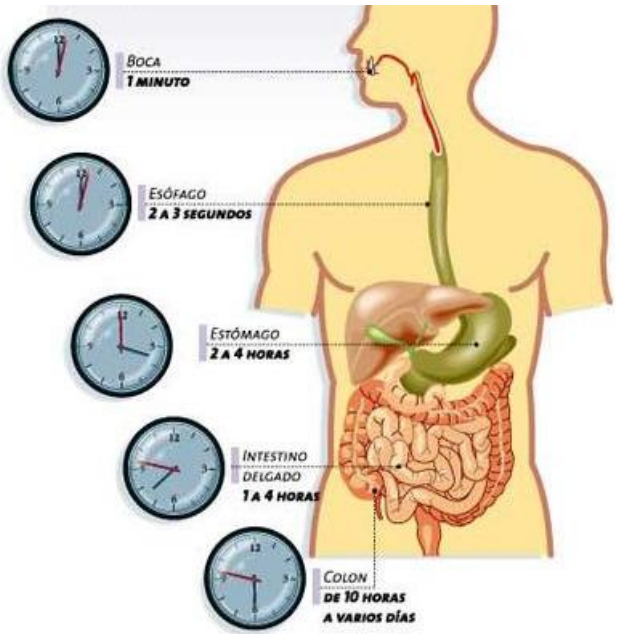
Los aminoácidos de las proteínas pasan igualmente a la sangre y de ésta al hígado. Posteriormente pueden pasar a la circulación general para formar parte del pool de aminoácidos, un importante reservorio que será utilizado para la síntesis de proteínas estructurales y enzimas. Los aminoácidos en exceso también pueden ser oxidados para producir energía.

Por tanto la digestión está dividida en cuatro procesos:

- Ingestión: Es el comienzo del proceso, y consiste en poner la comida en la boca.
- Digestión mecánica y química: la masticación para rasgar y aplastar los alimentos y la agitación del estómago. La adición de químicos (ácidos, bilis, enzimas y agua) para degradar moléculas complejas hasta estructuras simples.
- Absorción: movimiento de los nutrientes desde el sistema digestivo hasta los capilares circulatorios y linfáticos a través de la ósmosis, el transporte activo y la difusión.
- Excreción: remoción de materiales no digeridos del tracto digestivo a través de la defecación o la regurgitación.

Un proceso subyacente es el movimiento muscular a través del sistema, tragado y peristalsis.

El tiempo que tarda el alimento en recorrer los distintos segmentos del tracto digestivo se muestra en la Figura 1.19. Aunque la duración de estas fases puede variar de una persona a otra y según el tipo de alimento.



Fuente:www.nutricion.pro/alimentacion/el-aparato-digestivo-funcionamiento.
Figura 1.19. Tiempo aproximado del transito digestivo.

De esta forma, conociendo el mecanismo de digestión, se pueden desarrollar modelos que simulen de manera precisa los procesos que tienen lugar en el tracto gastrointestinal, y así obtener información de cómo se liberan de los alimentos que los contienen determinados compuestos, considerados saludables.

Los modelos de digestión *in vivo*, con animales o humanos, son los que proporcionan los resultados más exactos, pero son lentos y caros, por lo que se tiende a desarrollar procedimientos *in vitro* (Boisen y Eggum, 1991), que en principio, constituyen una alternativa útil y rápida. En la práctica, es imposible que con un método *in vitro* se consiga la precisión que se puede lograr mediante un estudio *in vivo*, debido a la complejidad inherente del proceso (Coles et al., 2005). Durante los últimos años se han utilizado una serie de modelos de digestión *in vitro* para poner a prueba los cambios estructurales y químicos que ocurren en diferentes alimentos, sometidos a las mismas condiciones que se producen en el tracto gastrointestinal, llegándose a la conclusión que

estos sistemas de digestión son una herramienta útil para el análisis de los alimentos. Sin embargo, hay que tener en cuenta que existen diferencias entre los modelos *in vivo* e *in vitro*, por lo que es necesario profundizar más en la relación existente entre ellos para que se puedan desarrollar modelos *in vitro* que se ajusten más a la realidad (Hur et al., 2011).

1.7. Biodisponibilidad y Bioactividad

Cuando se consume un alimento o una bebida, los nutrientes que contiene se liberan de la matriz, pasan al torrente sanguíneo y son transportados hasta sus respectivos destinos finales. Sin embargo, no todos los nutrientes se utilizan del mismo modo, es decir, su biodisponibilidad es diferente. Comprender la biodisponibilidad de los nutrientes ayuda a optimizar la alimentación y a poder establecer recomendaciones nutricionales apropiadas.

Existen distintas definiciones de biodisponibilidad o bioaccesibilidad pero, en general, este concepto se refiere a la proporción de un nutriente, o compuesto biológicamente activo, que nuestro organismo absorbe de los alimentos y que utiliza para las funciones corporales normales (Aggett, 2010; Hurrell y Egli, 2010). Sin embargo, la bioactividad o bioeficacia se define, como la actividad biológica (Ej. actividad antioxidante) que posee o poseen algunos de los componentes de ese alimento a la llegada al tejido o célula diana (Holst y Williamson, 2008). Un ejemplo claro de la diferencia entre estas dos definiciones es lo que ocurre con la fibra de los alimentos, que según la definición dada no es biodisponible, pues no se absorbe, pero sin embargo es bioactiva pues tiene una acción biológica clara en la digestión-excreción.

La biodisponibilidad de un nutriente se rige por factores externos e internos. Entre los factores externos se incluye la matriz alimentaria y la forma química del nutriente en cuestión (que dependeran, entre otras cosas, de la transformación y/o tratamiento culinario al que se someta al alimento); mientras que por otro lado el sexo, la edad, el estado nutricional y la etapa de la vida (Ej. embarazo) son algunos de los factores internos. Dado que algunos aspectos, como el estado nutricional, también determinan la cantidad de un nutriente que el cuerpo utiliza, almacena o excreta,

algunas definiciones de biodisponibilidad se limitan a la fracción del nutriente que es absorbida (Heaney, 2001).

La biodisponibilidad de los macronutrientes (carbohidratos, proteínas y grasas) suele ser muy elevada, llegando a superar el 90% de la cantidad consumida. Sin embargo, en el caso de los micronutrientes (vitaminas y minerales) y de los compuestos biológicamente activos o funcionales (Ej. flavonoides o carotenoides) hay grandes diferencias en la proporción en que se absorben y se utilizan (Holst y Williamson, 2008).

El primer paso para que un nutriente esté biodisponible es su liberación de la matriz alimentaria y su conversión en una forma química que pueda unirse e introducirse en las células del intestino o incluso atravesarlas. Los nutrientes se hacen biodisponibles mediante los procesos de masticación y digestión enzimática inicial del alimento en la boca, su combinación con ácidos y otras enzimas en los jugos gástricos al tragarlos y, finalmente, su liberación en el intestino delgado, el principal lugar de absorción de los nutrientes. Una vez aquí, otras enzimas procedentes de los jugos pancreáticos siguen descomponiendo la matriz del alimento (Figura 1.20).

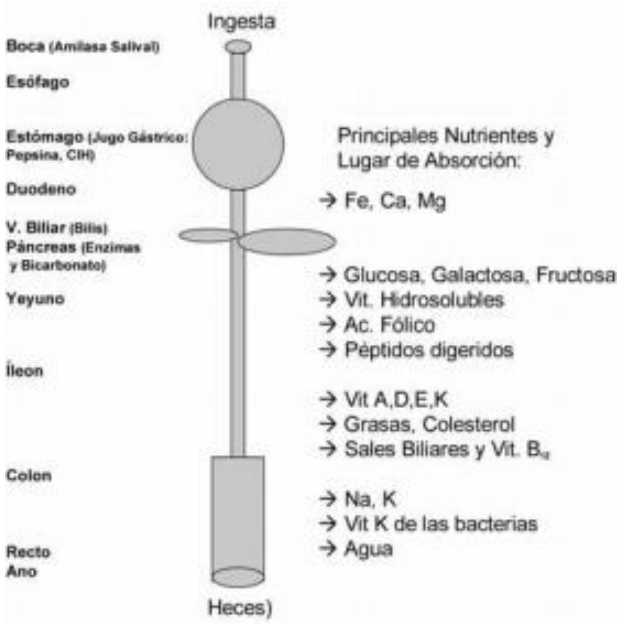


Figura 1.20. Lugar de absorción de los diferentes macro y micro nutrientes en el tubo digestivo (Peláez et al., 2006).

Vitamina C

La vitamina C puede absorberse como ácido ascórbico y como ácido dehidroascórbico a nivel de mucosa bucal, estómago y yeyuno (intestino delgado), luego es transportada vía vena porta hacia el hígado para después ser conducida a los tejidos que la requieran.

A nivel intestinal se absorbe mediante transporte activo saturable (ATP y sodio dependiente), una vez absorbido, el ác. ascórbico (AA) se acumula en los tejidos en forma de ascorbato. El mecanismo de transporte del ác. dehidroascórbico (ADHA) (10 veces más rápido que el del AA), está mediado por transportadores de glucosa y su posterior reducción intracelular, por la glutarredoxina (tioltransferasa) (Levine et al., 1996). La vitamina C, en forma de ascorbato, es metabolizada en el hígado donde parte será reabsorbida de forma activa en los túbulos renales, de forma proporcional a la concentración (Levine et al., 1996).

Se excreta por vía renal (en la orina), bajo la forma de ácido oxálico principalmente, por heces se elimina sólo la vitamina no absorbida (Martínez Silva y Bastidas Pacheco, 2009).

La absorción suele ser completa, aunque puede disminuir hasta un 75% debido a diferentes factores, como puede ser diferencia de pH entre los alimentos y los jugos gástricos, un elevado contenido en fibra, principalmente insoluble, un elevado contenido de grasa y/o bien otros componentes que pudieran ejercer un impedimento estérico impidiendo su absorción.

Hay que tener en cuenta que la biodisponibilidad de la vitamina C disminuye con la dosis, ya que los tejidos se saturan con dosis de 200 a 400 mg/día, con lo cual se limita la cantidad de vitamina C absorbida por el intestino y reabsorbida por el riñón (Nelson et al., 1978; Wilson, 2005). Además en la mayoría de los casos el cuerpo no la almacena, por tanto la biodisponibilidad sérica de esta vitamina está ceñida por la interacción entre absorción intestinal y excreción renal. Es por esto, y por su complejidad funcional, que es necesario el consumo diario de este nutriente, ya que además favorece la absorción del hierro y otros minerales (Martínez Silva y Bastidas Pacheco, 2009).

Carotenoides

Para que los carotenoides se absorban y ejerzan acciones en estructuras y tejidos, es necesario que se liberen de la matriz alimentaria y se incorporen en micelas. Aun así, no todos los carotenoides ingeridos se encuentran en cantidades apreciables en plasma.

La liposolubilidad de los carotenoides es la principal característica que determina las etapas del proceso de liberación, transporte y asimilación desde el alimento, y la eficacia de las mismas. En el hombre, la eficiencia del proceso es baja, ya que sólo un 30% del total de carotenoide ingerido se absorbe de forma efectiva. El proceso incluye una etapa de liberación del conjunto de carotenoides desde la matriz alimentaria y su incorporación a glóbulos lipídicos, que tiene lugar en el estómago, la formación de micelas, y la absorción del contenido de éstas por las células intestinales (Baracaldo y Castro de Navarro, 1998; Olmedilla Alonso et al., 2001).

El principal factor que afecta a la biodisponibilidad de los carotenoides es la matriz, por ejemplo, los carotenoides disueltos en aceite se absorben más eficientemente y se ha observado que los de las frutas suelen ser más biodisponibles que los de hortalizas, ya que los carotenoides se encuentran disueltos en gotas de aceite favoreciendo la absorción intestinal (Yeum y Russell, 2002; Faulks y Southon, 2005; Maiani et al., 2009; Ornelas-Paz et al., 2012).

La fibra dietética parece tener un papel negativo en la absorción de carotenoides, esto puede deberse a que secuestra las sales biliares necesarias para la micelarización de carotenoides y aumentar la viscosidad del medio gastrointestinal, dificultando el paso de las micelas hacia las células intestinales.

Clorofila

En lo referente a la biodisponibilidad de la clorofila y de los pigmentos clorofílicos existe un gran vacío científico. Lo que sí se ha comprobado es que la administración de clorofila a animales de laboratorio reduce la absorción de compuestos cancerígenos incluidos en la dieta, ya que forma complejos con estos compuestos mientras recorren el tracto digestivo, limitando así su biodisponibilidad. Puesto que la clorofila natural es liposoluble, los efectos reparadores y bactericidas no pueden ser

aplicados al colon, puesto que éste se encuentra más allá del lugar donde la clorofila es absorbida (Peréz-Gálvez y Mínguez-Mosquera, 2007).

Compuestos fenólicos

En general la absorción de los compuestos polifenólicos es baja; se absorbe el 1% del contenido total del alimento y esta cuestión hay que tenerla muy en cuenta al considerar las cantidades de alimento necesarias para conseguir una dosis eficaz.

Los datos existentes sobre la biodisponibilidad de los compuestos fenólicos en humanos aún se consideran escasos y controvertidos, por lo tanto la biodisponibilidad de los compuestos fenólicos no está bien establecida. Los escasos datos existentes indican que sólo una pequeña parte del compuesto es absorbido como tal y encontrado en plasma u orina. Sin embargo, diversos estudios evidencian la absorción y excreción urinaria de estos compuestos (Prior, 2003; Manach et al., 2005). No obstante, el análisis de compuestos fenólicos en los fluidos biológicos es complicado debido a las amplias diferencias estructurales de estos compuestos, ya que la estructura de los mismos determinará su capacidad para atravesar las membranas biológicas y su reparto entre distintos compartimentos celulares, así como la gran variedad de metabolitos generados en los procesos digestivos. Los compuestos fenólicos no absorbidos parasarán al colon (sobre todo los flavonoides) donde podrán ser metabolizados por la flora bacteriana (Figura 1.21). Algunas bacterias presentes en el colon son capaces de hidrolizar dichos compuestos hacia compuestos fenólicos más sencillos que pueden ser absorbidos (Scalbert y Williamson, 2000).

La absorción y metabolización de compuestos fenólicos está influida por factores tales como la liposolubilidad o hidrosolubilidad de la molécula, la unión a azúcares o ácidos orgánicos, o el grado de polimerización. Los coeficientes de partición parecen ejercer un efecto importante en la absorción de agliconas, glicósidos y compuestos fenólicos unidos a ácidos orgánicos. Así, las agliconas hidrofílicas no son capaces de atravesar la pared intestinal por difusión pasiva y por tanto su absorción depende de transportadores de membrana. Por ejemplo, se ha identificado en ratas un mecanismo de transporte saturable dependiente de sodio para los ácidos ferúlico y cinámico (Manach et al., 2004). El coeficiente de partición influirá también en el caso

de compuestos fenólicos hidrofóbicos glicosilados, unidos a ácidos orgánicos o con sustituyentes esterificados. Compuestos hidrofílicos de similares características estructurales serán degradados por esterasas de la microflora del colon, como paso previo a su absorción (Karakaya, 2004).

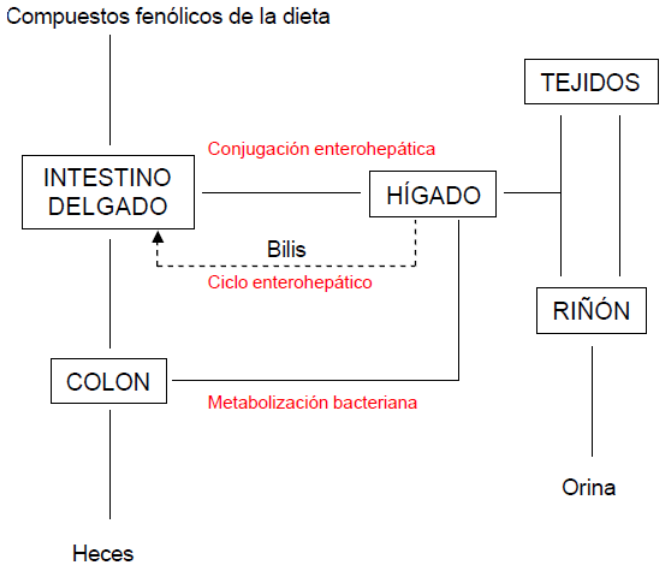


Figura 1.21. Posibles rutas de los compuestos fenólicos de la dieta (Scalbert y Williamson, 2000).

La glicosilación influye claramente en la absorción de compuestos fenólicos. La absorción gástrica de flavonoides como quercetina ha sido observada en estudios en ratas, pero no así la de sus glicósidos (Manach et al., 2004). Las agliconas y los polifenoles unidos a glucosa, galactosa o xilosa son absorbidos en el intestino delgado tras su deglicosilación por los enzimas β-glucosidasa y lactasa floricina hidrolasa (Karakaya, 2004), mientras que los compuestos fenólicos unidos a ramnosa deben llegar al colon y ser hidrolizados por las ramnosidasas bacterianas antes de su absorción (Manach et al., 2004). Flavonoides acilados como la epicatequina y epigalocatequina son absorbidos sin deconjugación ni hidrólisis previa. Las agliconas de las isoflavonas son absorbidas en el estómago, mientras que sus glicósidos son absorbidos en el intestino (Karakaya, 2004). Los antocianos, por contra, parecen constituir una excepción ya que las formas predominantes en sangre son sus glicósidos intactos. Algunos autores han sugerido la existencia de un mecanismo específico de absorción de los antocianos a

nivel gástrico, que podría implicar su transporte vía bilitranslocasa gástrica (Passamonti et al., 2002; Manach et al., 2005).

Además, el grado de polimerización de los compuestos fenólicos determina la facilidad con que son absorbidos en el intestino.

Glucosinolatos

La biodisponibilidad de los glucosinolatos, también es poco conocida y existen pocos datos científicos. Algunos de estos estudios avalan que los glucosinolatos se degradan en isotiocianatos mediante las enzimas mirosinasas presentes en la microflora del tracto digestivo en los humanos. Los glucosinolatos se degradan en el intestino delgado por la mirosinasa de la planta y en el colon por la mirosinasa bacteriana. Recientemente se han identificado poblaciones de bacterias como *Bifidobacterium sp*. capaces de digerir determinados glucosinolatos *in vitro*. Estas bacterias podrían estar implicadas en la degradación de los glucosinolatos en el tracto intestinal, afectando a la disponibilidad final de los glucosinolatos presentes en brassicas. Finalmente, la interacción de los glucosinolatos con las mirosinasas presentes en la flora del colon va a influir en la disponibilidad de estas sustancias potencialmente beneficiosas para la salud (Cartea et al., 2008b).

Además, un hecho muy importante y cada vez más estudiado es el efecto antinutriente de algunos compuestos o ingredientes funcionales en condiciones de consumo o suplementación excesiva, acumulación y/o enfermedad. Ya que pueden actuar interfiriendo en los procesos metabólicos, así como en la biodisponibilidad de nutrientes. A continuación se relacionan algunos ejemplos: La vitamina C, aunque no es común su acumulación, puede causar daños cuando su suplementación es excesita, ya que el ácido ascórbico moviliza el hierro almacenado en el cuerpo (férrico) y lo conviente en la forma dañina (ferroso). El exceso de carotenoides es perjudicial debido a que estos compuestos liposolubles se acumulan en los tejidos dañándolos. El efecto antinutritivo de los compuestos fenólicos está basado en la capacidad que poseeen para quelar hierro, con lo que un exceso en su consumo puede ser perjudicial sobre todo para personas propensas a padecer anemia. Y por último, destacar el efecto bociógeno de los glucosinalatos, que interfieren en la disponibilidad del yodo en la glándula tiroidea, causando hipertrofia de esta glándula, sobre todo en personas con una cierta

predisposición a padecer la enfermedad del bocio o hipotiroidismo (Camean Fenández y Repetto Jiménez, 2012).

Por tanto, todavía queda mucho por investigar en el ámbito de la biodisponibilidad de compuestos funcionales. Incluso muchos estudios aportan datos confusos sobre estos aspectos, y es de esperar que en los próximos años se produzcan importantes avances en la elucidación de los mismos, utilizando para ello modelos de digestión bien definidos o mediante el estudio de los metabolitos generados en su digestión (metabolómica).

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

2.1. Justificación

La demanda por parte de los consumidores de alimentos más saludables ha aumentado considerablemente en los últimos años. Así, entre los vegetales más consumidos están los de la familia *Brassicaceae*, especialmente del género *brassica*, ya que un gran número de estudios epidemiológicos (Cohen et al., 2000; Vallejo et al., 2002; Vallejo et al., 2003a; Vallejo et al., 2003b; Vallejo et al., 2003c; Vallejo et al., 2003d; Tian et al., 2005; Moreno et al., 2006; Borowski et al., 2008) indican que contienen importantes cantidades de compuestos bioactivos o funcionales, siendo productos muy saludables, y por tanto, muy apreciados.

Uno de los factores que más influye en el tipo y concentración de estos compuestos en los vegetales, y más concretamente en las brassicas, es la variedad o genotipo. Además no todos estos compuestos se absorben y utilizan de la misma manera al ser digeridos, es decir presentan una biodisponibilidad y bioactividad distinta dependiendo del tipo de alimento o matriz alimenticia con la que se ingieran o consuman. Con lo que el primer problema que surge a la hora de caracterizar la biodisponibilidad de los compuestos funcionales es la dificultad que existe para determinar con exactitud la cantidad y tipo de compuesto con actividad biológica que se ingiere con la dieta.

La biodisponibilidad de las sustancias que se ingieren se define como la cantidad de sustancia que se absorbe y alcanza la circulación sistémica, momento en el cual puede distribuirse por los tejidos y llegar a los lugares donde ejercer su efecto fiosiológico (bioactividad) (Parada y Aguilera, 2007). Debido a esto es fundamental que los compuestos funcionales sean biodisponibles para que las propiedades funcionales que se les otorgan puedan realmente manifestarse en el organismo del consumidor, teniendo en cuenta que la cantidad de alimento funcional a ingerir, para conseguir el efecto beneficioso, sea razonable en una dieta equilibrada.

Por lo que conocer los contenidos de compuestos funcionales, así como su biodisponibilidad y bioactividad, ayuda a conocer las propiedades saludables de los

alimentos de origen vegetal para optimizar la alimentación y poder establecer recomendaciones nutricionales.

2.2. Objetivos

Por todo esto, el **objetivo general** de este trabajo fue determinar la biodisponibilidad y bioactividad de los compuestos funcionales mayoritarios en dos tipos de Brassicas, brócoli y col de Milán. Para alcanzar este objetivo principal, se propusieron los siguientes **objetivos específicos,** que se dividieron en dos estudios:

Primer estudio

- Caracterización funcional de los cultivares de brócoli (‘Parthenon’ y ‘Mónaco) y col de Milán (‘Dama’ y ‘Leticia’) más producidos en Extremadura, para establecer, mediante comparación entre ellos, cuáles presentan mayor contenido en compuestos bioactivos y por tanto, mayor valor de actividad antioxidante.

Segundo estudio

- Detección, identificación y cuantificación de los compuestos funcionales (vitamina C, carotenoides, clorofilas, compuestos fenólicos y glucosinolatos) del brócoli y la col de Milán en fresco, es decir sin digerir, así como la determinación de su actividad antioxidante.

- Detección, identificación y cuantificación de los compuestos funcionales biodisponibles (vitamina C, carotenoides, clorofilas, compuestos fenólicos y glucosinolatos) en el brócoli y la col de Milán después de su digestión *in vitro*, así como la determinación su actividad antioxidante, parámetro usado para la evaluación de su bioactividad.

- Determinación y comparación de la biodisponibilidad y bioactividad de dichos compuestos funcionales en los dos tipos de Brassicas.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Material vegetal

En el primer estudio se evaluaron dos cultivares de brócoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica* Plenck), 'Parthenon' y 'Mónaco', y dos cultivares de col de Milán (*Brassica oleracea* L. var. *sabauda*), 'Dama' y 'Leticia'. Mientras que en el segundo sólo se estudió un cultivar de cada brassica, para brócoli el cultivar 'Parthenon' y para col de Milán el cutlivar 'Dama'. Se eligieron estos dos cultivares debido a que fueron los que presentaron mejores características funcionales en el primer estudio (Fernández-León et al., 2010; Fernández-León et al., 2012).

Se utilizaron 6 pellas de brócoli y 6 pellas de col de Milán. Cada pella de brócoli fue floreteada y cada pella o cogollo de col de Milán fue deshojada cogiéndose hojas de distintas profundidades para realizar los análisis (Figura 3.1).

Figura 3.1. Brócoli y col de Milán.

3.2. Diseño experimental

En la Figura 3.2 se muestra el diseño experimental utilizado.

Tanto el brócoli como la col de Milán se procesaron por separado, realizándose en el mismo día las digestiones *in vitro* de ambas brassicas.

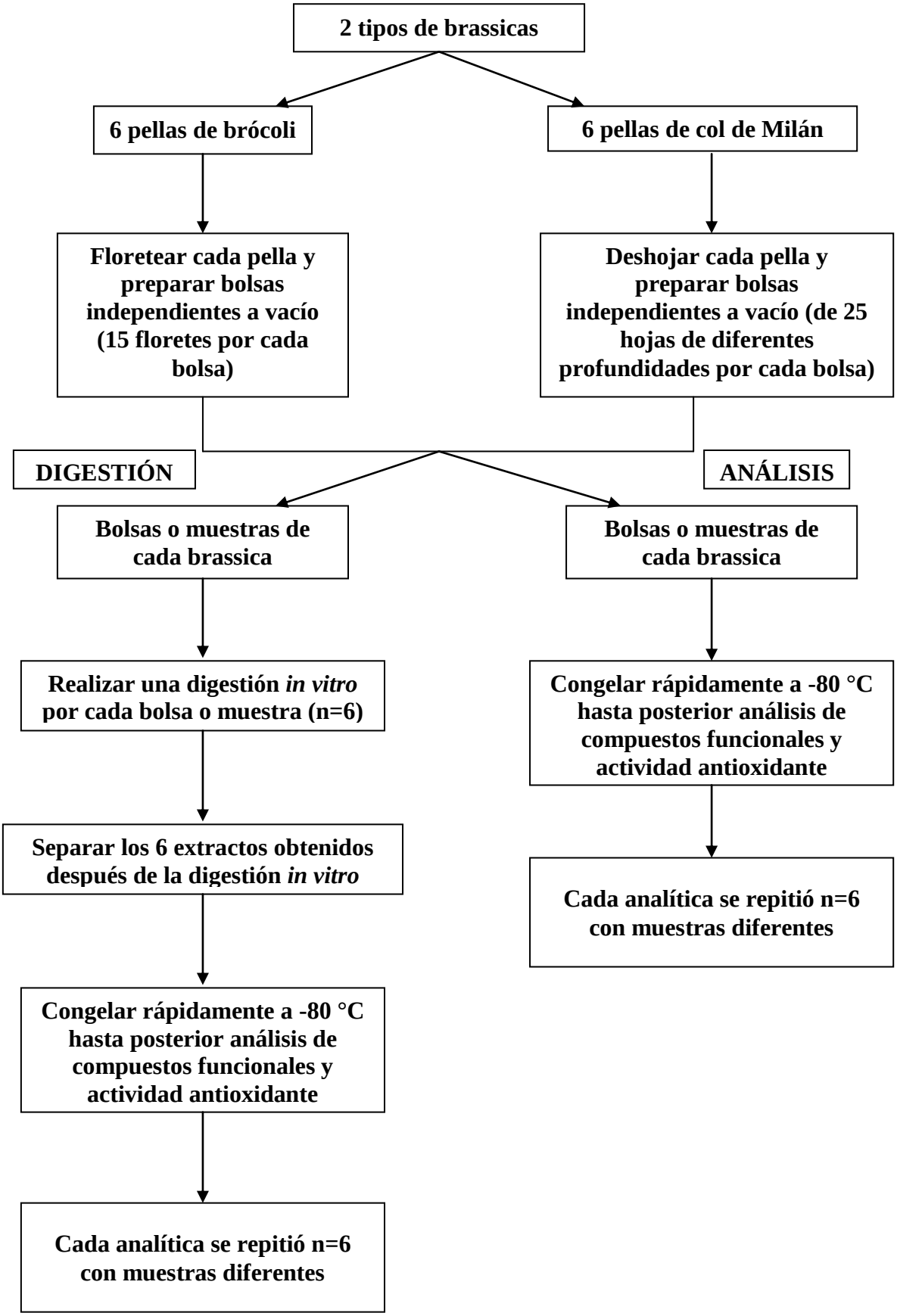


Figura 3.2. Diagrama del diseño experimental.

3.3. Métodos

3.3.1. Determinación de compuestos funcionales

3.3.1.1. Vitamina C

En la determinación de la vitamina C se utilizaron dos métodos, el primero consistió en la determinación del contenido en ácido ascórbico (componente principal de la vitamina C), y el segundo método, usado únicamente en el segundo estudio, consistió en la determinación conjunta de ácido ascórbico y ácido dehidroascórbico (forma oxidada del ácido ascórbico). A continuación se describen los dos métodos:

Contenido en ácido ascórbico

Para la determinación del contenido en ácido ascórbico se utilizó el método descrito por Bernalte et al. (2007), donde un peso determinado de muestra fue homogeneizado en un Omni-Mixer (Onmi International, GA, USA) con aproximadamente 20 ml de solución extractora de ácido ortofosfórico al 85% y EDTA al 1%, este homogeneizado se preparó en oscuridad y frío, filtrándose a continuación sobre lana de vidrio y llevándose hasta un volumen final de 100 ml con solución extractora. El EDTA (ácido etilendiaminotretracético) se usa como quelante para ayudar a prevenir que la muestra se oxide. Antes de la inyección en el sistema cromatográfico, la muestra se filtró a través de un filtro de nylon Millipore de 0,45 μm.

La separación e identificación se realizó en un cromatógrafo de líquidos HPLC Agilent 1200 (Agilent Technologies, S.L., Madrid, España) equipado con una columna Zorbax SB-C8 de 5 μm, 250 mm x 4,6 mm, termostatizada a 30 ºC. Para la separación cromatográfica se utilizó como fase móvil el tampón ácido acético:acetato sódico (50 mM, pH=4), metanol y agua ultrapura MilliQ, siguiendo la elución en gradiente descrita en la Tabla 3.1, con un flujo de 0,5 ml/min y usando volumen de inyección de la muestra de 10 μl.

La detección se llevó a cabo usando un detector de diodo de array (DAD) acoplado al HPLC, usando una λ=260 nm (Figura 3.3). El contenido en ácido ascórbico de la muestra se determinó por la técnica de patrón externo y los resultados se expresaron como mg ácido ascórbico/100 g peso fresco (pf).

Tabla 3.1. Condiciones de elución en gradiente para la determinación de ácido ascórbico.

Tiempo (min)	% Ácido acético:acetato sódico	% Metanol	% Agua
7	100	0	0
8	0	0	100
10	0	100	0
14	0	100	0
16	0	0	100
19	0	0	100
20	100	0	0
23	100	0	0

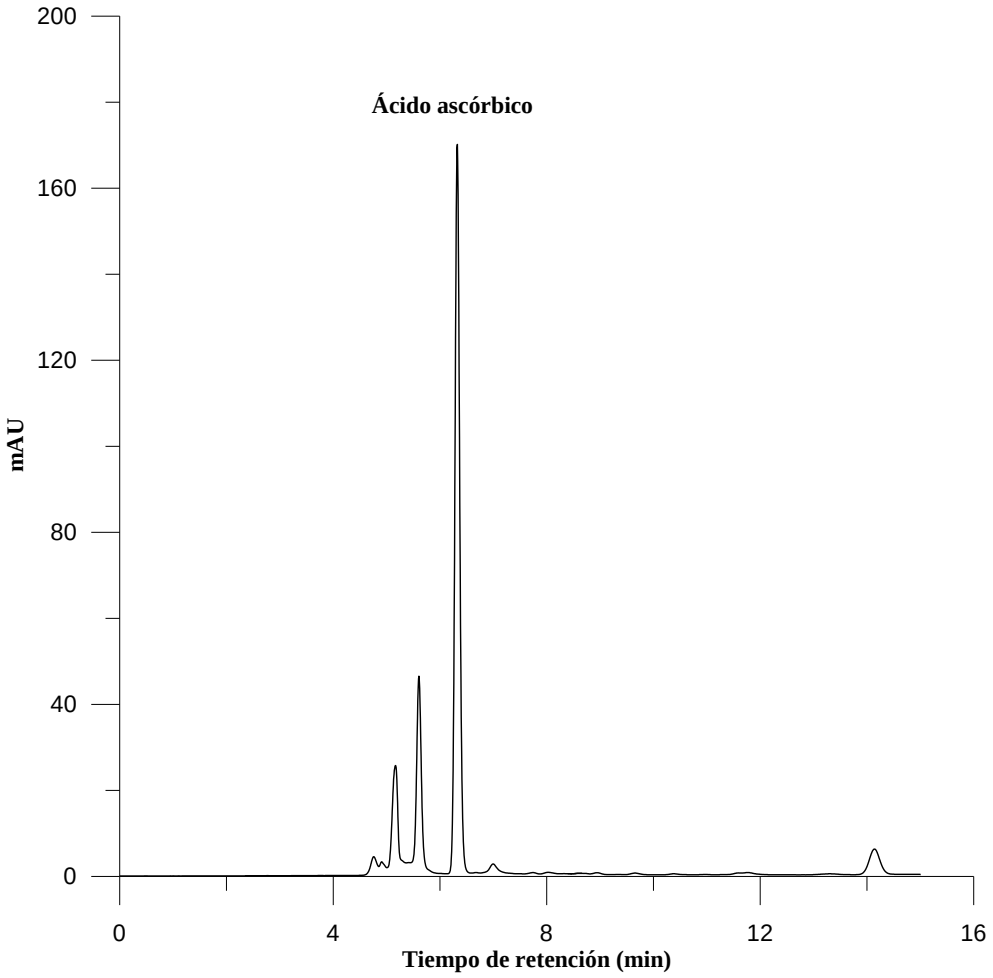


Figura 3.3. Cromatograma del ácido ascórbico presente en una muestra de brócoli, registrado a 260 nm.

Contenido en ácido ascórbico y dehidroascórbico

Un peso determinado de muestra se homogeneizó con metanol:agua destilada (5:95) más ácido cítrico (21 g/l) y EDTA (0,5 g/l) en un equipo Ultra Turrax T-18 (IKA, Wimington, NC, USA) en frío y bajo campana en oscuridad. A continuación el homogeneizado fue filtrado a través de una gasa, ajustándose su pH a 2,2-2,4 con HCl 6N y después se centrifugó a 9000 rpm y 4 ºC durante 5 minutos en una centrífuga Beckman Coulter (Beckman Coulter Inc, CA, USA).

Seguidamente se filtró el sobrenadante a través de un Sep-pak C18 (Waters, Milford, MA, USA) acoplado a un filtro de nylon Millipore de 0,45 μm. Esta determinación del contenido en ácido ascórbico y ácido dehidroascórbico fue realizada siguiendo el método descrito por Zapata y Dufour (1992) con algunas modificaciones (Gil et al., 1999). El análisis cromatográfico se realizó después de la derivatización del ácido dehidroascórbico en el fluoróforo 3-(1,2-dihidroxietil)furol[3,4-b]quinoxalina-1-ona (DFQ) con 1,2-fenilendiamina dihidrocloruro (OPDA).

Para ello, a 750 μl del extracto obtenido anteriormente se le añadieron 250 μl de OPDA (0,034 g/10 ml agua ultrapura) y se incubaron en oscuridad durante 36 minutos. Pasado este tiempo se inyectaron 20 μl de muestra en un HPLC Agilent 1100 (Agilent Technologies, S.L., Madrid, España), realizándose la separación cromatográfica en una columna Zorbax C18 de 5 μm, 250 mm x 4,6 mm y la detección en DAD a 261 nm para la determinación de ácido ascórbico y a 348 nm para el ácido dehidroascórbico (Figura 3.4). Se utilizó elución isocrática, usando como fase móvil metanol:agua ultrapura MilliQ (5:95, v:v) conteniendo 5 mmol/l de cetrimida y 50 mmol/l de dihidrogenofosfato a pH=4,5. El flujo fue de 1 ml/min. Y el contenido en vitamina C fue expresado como mg ácido ascórbico y dehidroascórbico/100 g peso fresco (pf), utilizando para cada uno su correspondiente recta de calibración por patrón externo.

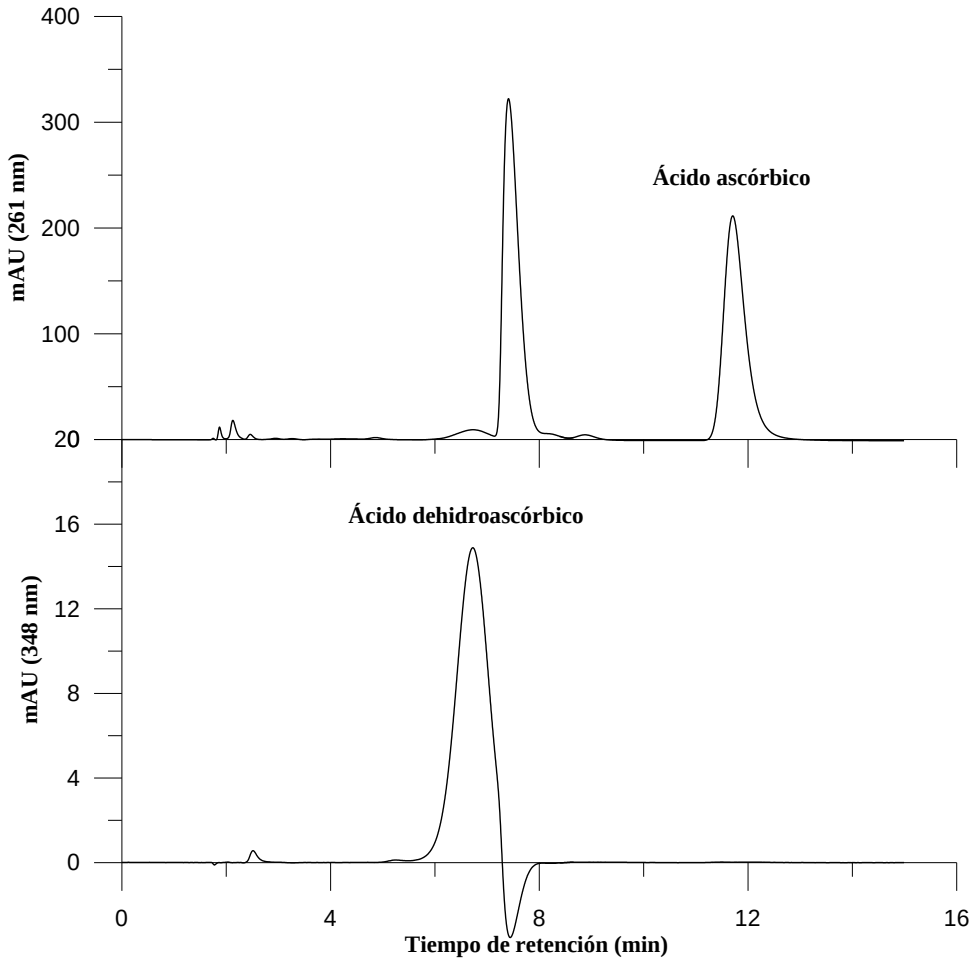


Figura 3.4. Cromatogramas de los ácidos ascórbico y dehidroascórbico presentes en una muestra de brócoli, registrados a 261 y a 348 nm, respectivamente.

3.3.1.2. Carotenoides

Los pigmentos carotenoides fueron extraídos y determinados mediante el método de Mínguez-Mosquera y Hornero-Méndez (1993) modificado por García et al. (2007). Un peso determinado de muestra triturada se extrajo cuatro veces, usando para cada extracción 25 ml de acetona, que posteriormente se eliminó mediante evaporación en rotavapor (Buchi Laboratoy Equipment, Suiza). El extracto seco obtenido se redisolvió en 5 ml de metanol mediante agitación en ultrasonidos (Ultrasons-P, JP Selecta S.A., Barcelona, España) y se sometió a saponificación durante toda la noche usando para ello 100 ml de una disolución de KOH al 20% en metanol. La saponificación se usa para eliminar clorofilas y lípidos indeseables y para hidrolizar hidroxicarotenoides esterificados con ácidos grasos, liberando así los carotenoides.

Al día siguiente, se añadieron 100 ml de éter dietílico y se hicieron varios lavados con agua destilada. Tras los lavados, el extracto hidrofóbico separado se filtró a través de placa filtrante sobre un lecho de sulfato sódico anhidro, para quitar posibles restos de agua. A continuación, el extracto lipofílico obtenido se llevó hasta sequedad en rotavapor (Buchi Laboratoy Equipment, Suiza), eliminándose así todo el éter. A cada extracto seco se le añadieron 5 ml de acetona de grado HPLC para redisolverlo. El extracto redisuelto y filtrado a través de un filtro de nylon Millipore de 0,45 µm fue inyectado en un cromatógrafo Agilent 1100 (Agilent Technologies, S.L., Madrid, España) equipado con una columna Agilent Lichrosorb RP-18 de 10 µm, 200 mm x 4,6 mm, termostatizada a 30 °C, y con un detector de diodo de array (DAD) a 460 nm (Figura 3.5), siguiendo la elución en gradiente descritas en la Tabla 3.2.

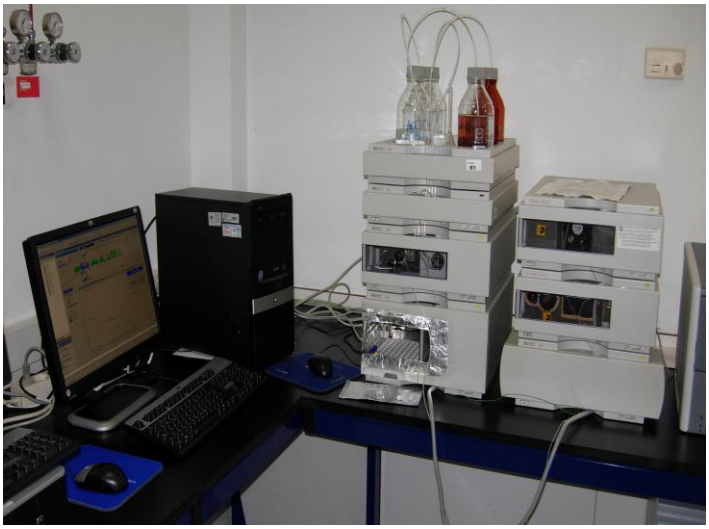


Figura 3.5. Cromatógrafo de líquidos Agilent 1100 con detector de diodo de array (HPLC-DAD).

Tabla 3.2. Condiciones de elución en gradiente para la determinación de carotenoides.

Tiempo (min)	% Acetona	% Agua
5	75	25
10	95	5
17	95	5
22	100	0
27	75	25
30	75	25

Se determinaron dos pigmentos carotenoides en las muestras de brassicas analizadas, β-caroteno y luteína (Figura 3.6); se cuantificaron por la técnica de patrón externo y los resultados se expresaron como mg β-caroteno/100 g pf y mg luteína/100 g pf, respectivamente. El contenido de carotenoides totales se calculó como suma de ambos compuestos y expresado en mg β-caroteno/100 g pf, por ser éste el pigmento carotenoide más abundante en las muestras de brassicas estudiadas.

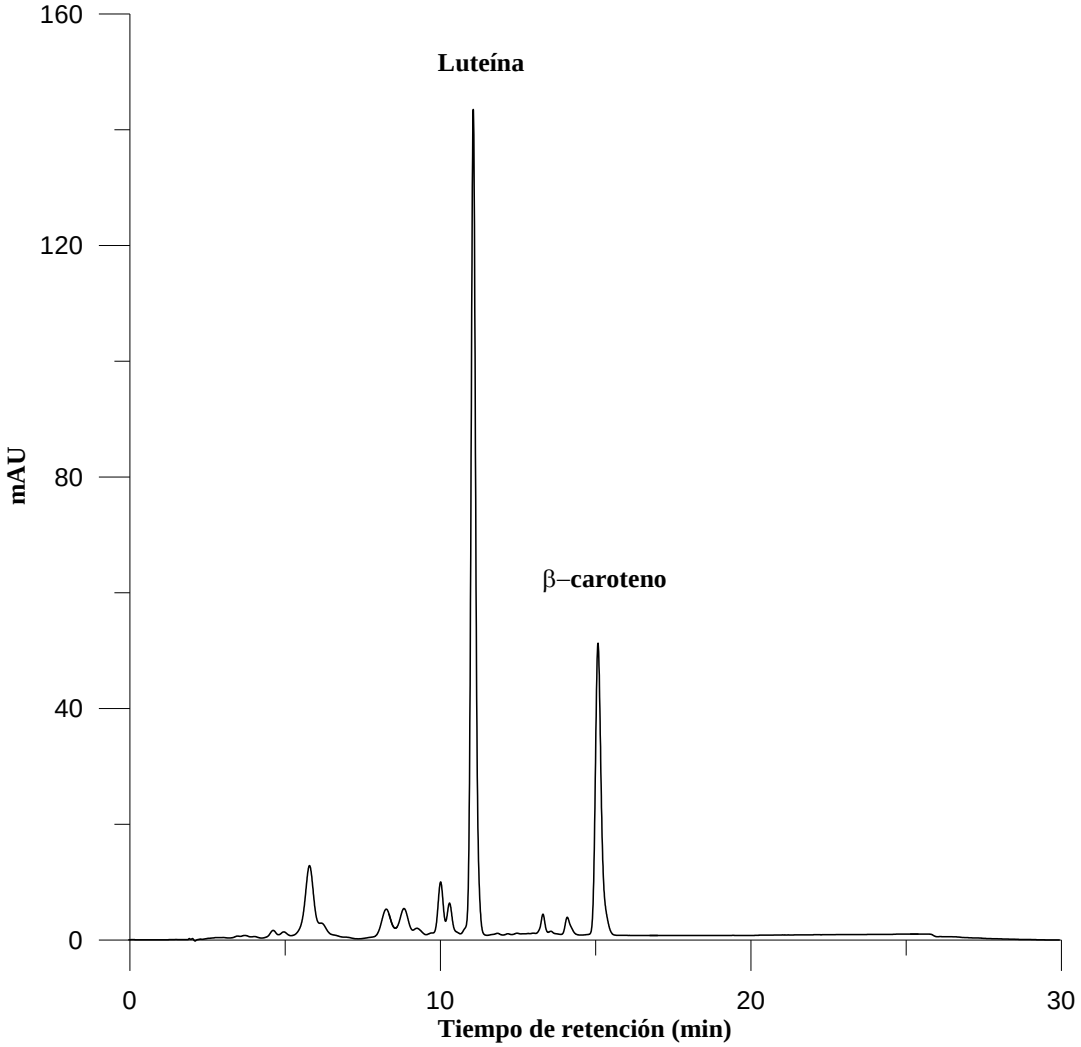


Figura 3.6. Cromatograma de los pigmentos carotenoides presentes en una muestra de brócoli, registrado a 460 nm.

3.3.1.3. Clorofilas

La extracción de los pigmentos clorofílicos fue realizada siguiendo el método de García et al. (2005). Para ello, se preparó un homogeneizado de muestra en 15 ml de acetona usando un Omni Mixer (Onmi International, GA, USA). A continuación, los extractos se centrifugaron en una centrífuga Beckman Coulter (Beckman Coulter Inc, CA, USA) durante 15 min a 14000 rpm y 4 °C recogiendo el sobrenadante. Esta operación se realizó dos veces más, hasta completa decoloración de la muestra, y los sobrenadantes se juntaron y filtraron sobre lana de vidrio llevándolos a un volumen final con acetona. Antes de realizar la medida espectrofotométrica las muestras fueron filtradas por un filtro de nylon Millipore de 0,45 μm. El espectro de absorción fue recogido entre 600 y 700 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV-2450 UV-vis (Shimadzu Corporation, Japón) (Figura 3.7).

Figura 3.7. Espectrofotómetro Shimadzu UV-2450 UV-vis.

Las clorofilas A y B fueron cuantificadas mediante análisis de calibración multivariante usando el método de mínimos cuadrados parciales (PLS). Los cálculos fueron realizados a través de la aplicación desarrollada por Olivieri et al. (2004), mediante la utilización de códigos de cálculo escritos en entorno MATLAB 7.3 (The Math Works Inc., Natick, USA) (Figura 3.8). Los resultados fueron expresados en mg clorofila A/100 g pf y mg clorofila B/100 g pf, respectivamente, y como la suma de las dos clorofilas en mg clorofila A/100 g pf, por ser el pigmento clorofílico más abundante.

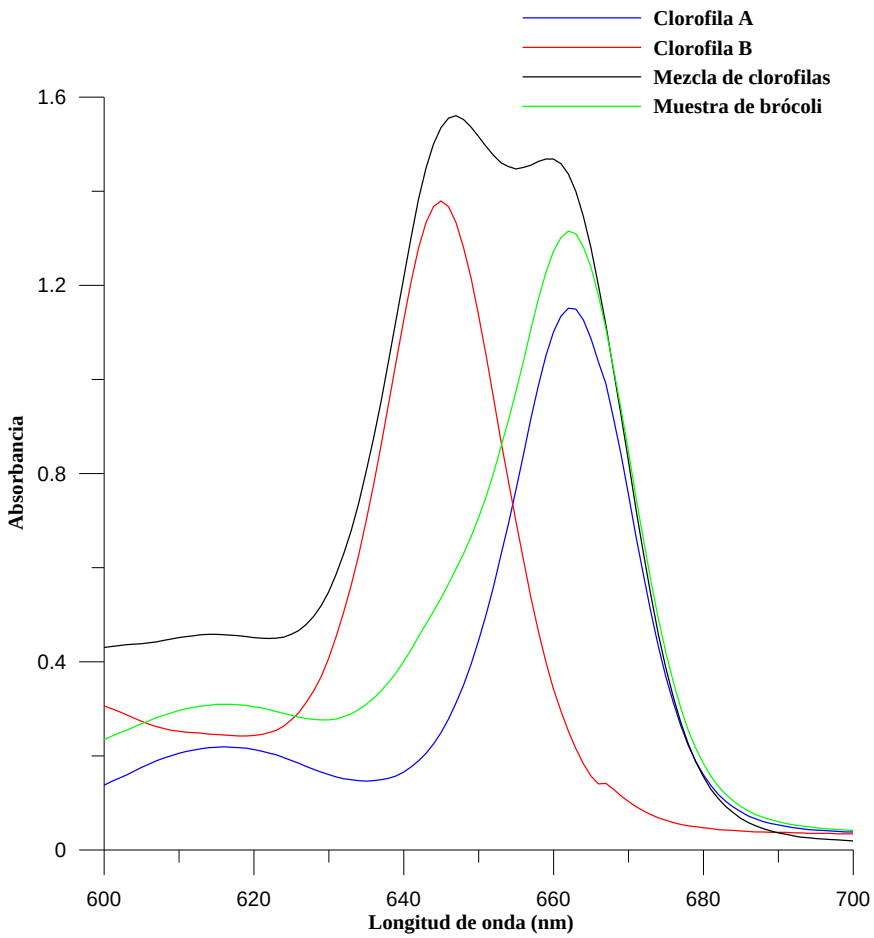


Figura 3.8. Espectros de absorción de patrones de clorofila A, B y mezcla de ambas, así como de una muestra de brócoli, registrados de 600 a 700 nm.

3.3.1.4. Compuestos fenólicos

La determinación del contenido fenólico total se realizó siguiendo el método de Lima et al. (2005), en el que un peso determinado de muestra se extrae con 30 ml de solvente (80% de etanol acuoso con un 1% de HCl concentrado), manteniéndose en agitación durante 20 min, en ausencia de luz y a temperatura ambiente (25 °C), filtrándose a continuación. El proceso de extracción fue repetido tres veces. Los extractos etanólicos se juntaron, se evaporaron y se reconstituyeron hasta un volumen final de 100 ml con agua ultrapura. El contenido total de fenoles fue medido espectrofotométricamente a 760 nm (Bernalte et al., 2007) usando el reactivo de Folin-Ciocalteu (Singleton y Rossi, 1965). Para ello una alícuota de muestra se hizo reaccionar con 1 ml de reactivo de Folin-Ciocalteu, 2 ml de carbonato sódico (al 20% en

agua destilada) y agua ultrapura hasta enrase a 20 ml, dejándose durante 1 hora aproximadamente en oscuridad para que se desarrolle así la reacción, midiendo posteriormente a 760 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV-2450 UV-vis (Shimadzu Corporation, Japón). En esta reacción el reactivo de Folin-Ciocalteu, inicialmente de color amarillo, se reduce por la acción de los compuestos fenólicos que son antioxidantes, pasando a color azul, permitiendo así su determinación espectrofotométrica. Los resultados fueron expresados como mg de ácido clorogénico equivalente/100 g pf, una vez realizada la calibración por patrón externo.

Para la determinación de los compuestos fenólicos individuales se utilizaron los extractos etanólicos obtenidos después de la hidrólisis ácida y que, por tanto, contenían las agliconas de dichos compuestos. Estos extractos fueron filtrados a través de un filtro de nylon Millipore de 0,45 µm, inyectándose a continuación 10 µl en un cromatógrafo de líquidos Varian 212-LC (Varian Ibérica SL, Madrid, España) acoplado a un espectrómetro de masas de trampa de iones Varian 500-MS (Varian Ibérica SL, Madrid, España) (Figura 3.9). La separación por HPLC se realizó en una columna Pursuit C18 de 3 µm, 150 mm x 2,0 mm, termostatizada a 40 °C y se utilizó un gradiente de elución similar al propuesto por Vallejo et al. (2002) (Tabla 3.3), utilizando como fase móvil una mezcla de agua ultrapura MilliQ:ácido fórmico (99:1, v:v) y metanol calidad LC-MS, con un flujo de 200 µl/min.

Figura 3.9. Cromatógrafo Varian LC- 500 MS Ion Trap.

Tabla 3.3. Condiciones de elución en gradiente para la determinación de compuestos fenólicos.

Tiempo (min)	% Agua:ácido fórmico	% Metanol
0	90	10
5	85	15
20	70	30
35	50	50
40	10	90
45	90	10

Para la identificación de las agliconas, antes de inyectar las muestras, los parámetros del espectrómetro de masas fueron optimizados mediante la infusión directa de los compuestos fenólicos patrón. Los diferentes parámetros fueron optimizados para alcanzar las señales máximas para los iones precursores y para los fragmentos de iones durante el proceso MS/MS (Tabla 3.4) obteniéndose así, las condiciones de trabajo óptimas para esta determinación en modo SIM (monitorización selectiva de iones).

Tabla 3.4. Parámetros del espectrómetro de masas ajustados para los patrones usados.

Patrones	Ventana de tiempo (min)	Ion precursor (*m/z*)	Iones de fragmentación (*m/z*)	Polaridad	Voltaje del capilar (voltios)	Carga de radiofrecuencia (%)	Amplitud de excitación (voltios)
Ácido Gálico	0-25	169	125, 85	Negativa	47	96	1,23
Ácido Clorogénico	0-25	353	191, 163	Negativa	43	82	0,88
Ácido Sinápico	0-25	223	208, 164, 149, 179	Negativa	45	58	1,83
Quercetina	25-45	303	229, 257, 165	Positiva	115	90	1,55
Kaempferol	25-45	287	213, 241, 165	Positiva	110	85	1,60

Antes se ajustó también el sistema de ionización por electrospray (ESI), obteniéndose los siguientes valores de los parámetros optimizados: 5000 voltios de voltaje de aguja, 600 voltios de placa del aerosol o fragmentador, 50 psi de presión del gas nebulizador (N_2), 25 psi de presión del gas de secado (N_2) y 250 °C de temperatura del gas de secado (N_2).

Así pues, con estas condiciones óptimas, en las muestras de brassicas estudiadas se identificaron tres derivados de ácidos fenólicos (ácido gálico, ácido clorogénico y ácido sinápico) y dos flavonoides (quercetina y kaempferol) (Figura 3.10). Para la cuantificación, se utilizaron las rectas de calibración por patrón externo de cada compuesto, expresándose los resultados en mg/100 g pf para cada uno de ellos.

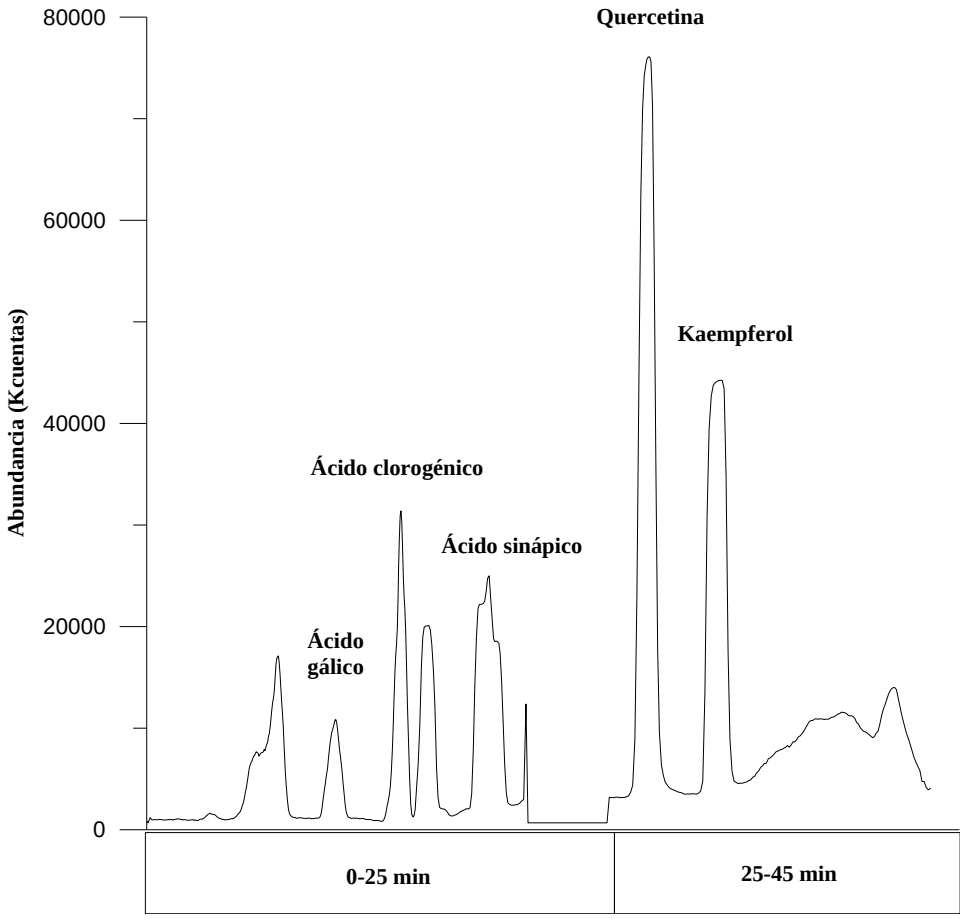


Figura 3.10. Cromatograma de masas en modo SIM de los compuestos fenólicos presentes en una muestra de brócoli.

3.3.1.5. Glucosinolatos intactos

Los glusosinolatos intactos (glucosinolatos sin desulfatar) fueron extraídos siguiendo el método de Kiddle et al. (2001) y Vallejo et al. (2003b) con ligeras modificaciones realizadas por nuestro grupo (Fernández-León et al., 2011b). Un peso determinado de muestra se homogeneizó en un Utra Turrax T-10 (IKA, Alemania) con

7 ml de una solución de metanol calidad LC-MS:agua ultrapura MilliQ (70:30, v:v) y se mantuvo tapado y en agitación durante 15 min en un baño termostatizado (Selecta Unitronic OR, JP Selecta S.A., Barcelona, España) con agua a 70 °C para inactivar la enzima mirosinasa (Moreno et al., 2006).

Los extractos obtenidos fueron filtrados por lana de vidrio para purificar las muestras y después por un filtro de nylon de Millipore de 0,45 µm antes de la inyección en el cromatógrafo de líquidos Varian 212-LC (Varian Ibérica SL, Madrid, España) que se encuentra acoplado a un detector de masas de trampa de iones Varian 500-MS (Varian Ibérica SL, Madrid, España).

La separación cromatográfica se realizó usando una columna Pursuit C18 de 3 µm, 150 mm x 2,0 mm, termostatizada a 40 °C y un volumen de inyección de 10 µl. Se utilizó una disolución al 0,1% de ácido fórmico en agua ultrapura MilliQ y metanol calidad LC-MS como fase móvil, utilizando el gradiente de elución descrito en la Tabla 3.5 y usando un flujo de 200 µl/min.

Tabla 3.5. Condiciones de elución en gradiente para la determinación de glucosinolatos intactos.

Tiempo (min)	% Disolución al 0,1% de ácido fórmico	% Metanol
0	100	0
15	85	15
20	60	40
25	50	50
30	100	0

Previamente a la inyección de la muestra, las condiciones del espectrómetro de masas fueron optimizadas por infusión directa de una solución patrón de sinigrina, obteniéndose la máxima abundancia con las señales del ion precursor de *m/z* 358 ($[M-H]^-$) y del ion de fragmentación *m/z* 97 ($[SO_3H]^-$) (Figura 3.11) según lo descrito por Tian et al. (2005). Obteniéndose en nuestro caso, los siguientes valores de los parámetros optimizados para el espectrómetro de masas: polaridad negativa: 75 voltios de voltaje de capilar, rango de masas (*m/z*) de 90 a 480 y carga de radiofrecuencia (RF) de 118%.

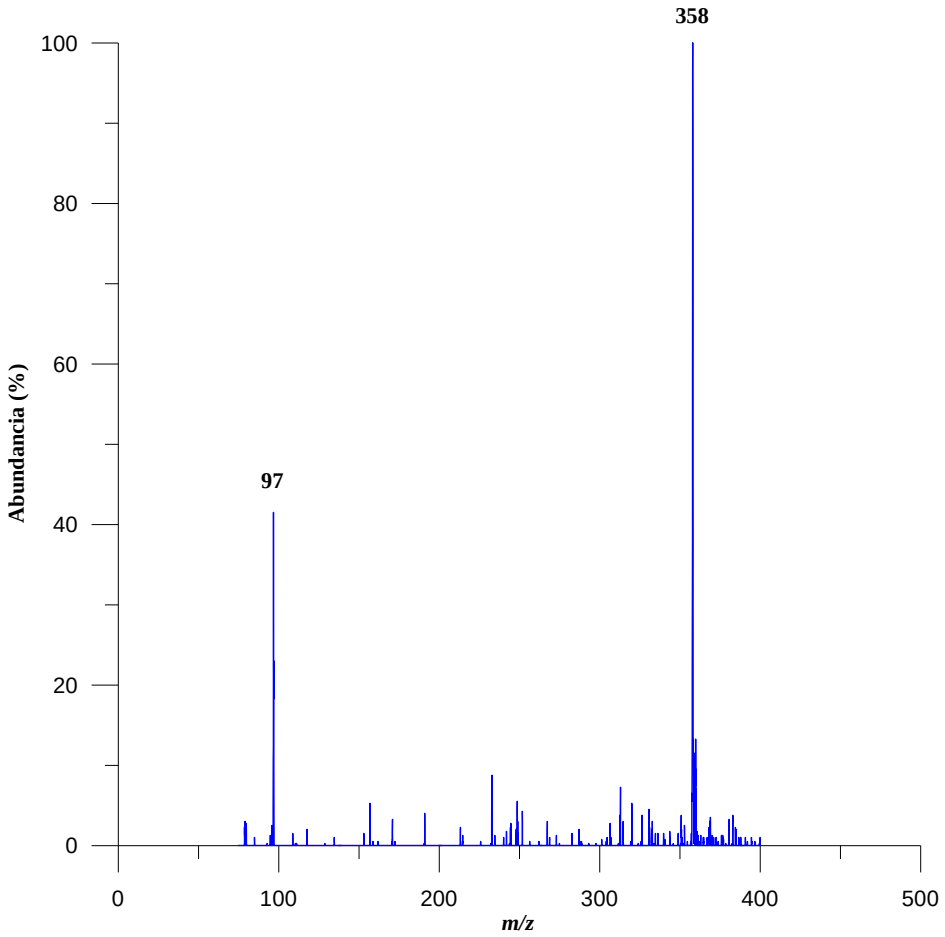


Figura 3.11. Espectro de masas del ión precursor (*m/z* 358) y del ión de fragmentación (*m/z* 97) en una muestra patrón de sinigrina.

También se optimizaron las condiciones del sistema de ionización por electrospray (ESI) con el patrón de sinigrina, en este caso los parámetros optimizados fueron: 5000 voltios de voltaje de aguja, 600 voltios de placa del aerosol o fragmentador, 50 psi de presión del gas nebulizador (N_2), 25 psi de presión del gas de secado (N_2) y 250 °C de temperatura del gas de secado (N_2).

Con estas condiciones optimizadas del espectrómetro de masas se pudieron detectar e identificar, en modo Full Scan (barrido completo del espectro), 11 glucosinolatos intactos (Figura 3.12).

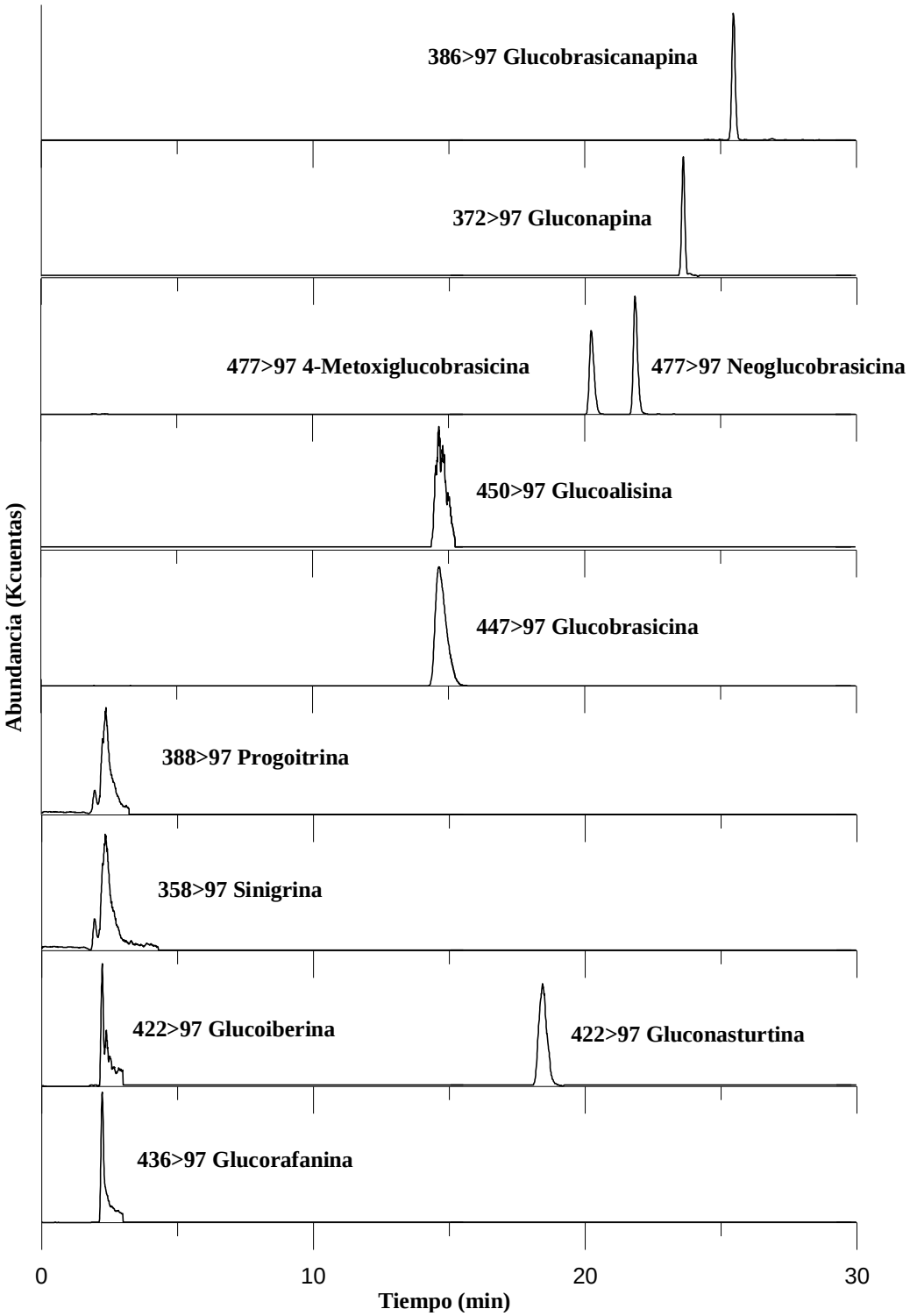


Figura 3.12. Cromatogramas, de las masas extraídas en modo Full Scan, de los glucosinolatos intactos presentes en una muestra de brócoli.

Estos 11 glucosinolatos fueron clasificados en tres grupos o familias químicas:

1. Glucosinolatos alifáticos:

a. Alquílicos: glucorafanina (436>97), glucoiberina (422>97) y glucoalisina (450>97).
b. Alquenílicos: sinigrina (358>97), gluconapina (372>97) y glucobrasicanapina (386>97).
c. Hidroxialquenílicos: progoitrina (388>97).

2. Glucosinolatos indólicos: glucobrasicina (447>97), 4-metoxiglucobrasicina (477>97) y neoglucobrasicina (477>97).

3. Glucosinolatos aromáticos: gluconasturtina (422>97).

La cuantificación se realizó por el método de patrón externo usando sinigrina como estándar y expresando los resultados como µmoles sinigrina equivalente/100g pf o como mg sinigrina equivalente/100 g pf. Los glucosionolatos intactos totales fueron calculados como suma de todos ellos y expresados de la misma forma que los individuales (Fernández-León et al., 2011b).

3.3.2. Actividad Antioxidante Total

Para la determinación de la actividad antioxidante total (AAT) se siguió el método descrito por Cano et al. (1998). Este método se basa en la caída de absorbancia que provoca un compuesto antioxidante al radical cromóforo ABTS (2,2′-azino-bis-(3-etil-benzotiazolin-6-sulfónico) (Figura 3.13), estable en una disolución de tampón fosfato 50 mM (pH 7,5), peróxido de hidrógeno 0,1 M y enzima peroxidasa tipo VI.

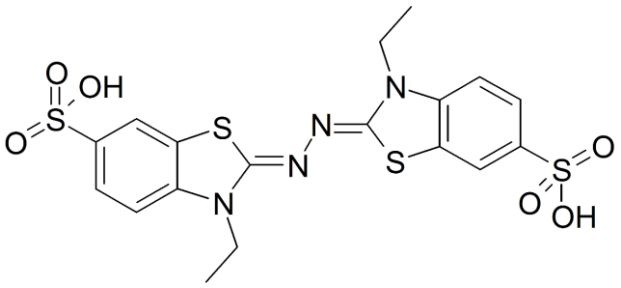


Figura 3.13. Estructura química del ABTS.

El compuesto antioxidante es la muestra en estudio, de la que se toman 20 µl que se hacen reaccionar durante 20 minutos sobre 1 ml de ABTS, utilizando para ello un fotómetro de microplacas Thermo Scientific Appliskan (Figura 3.14) a λ=750 nm.

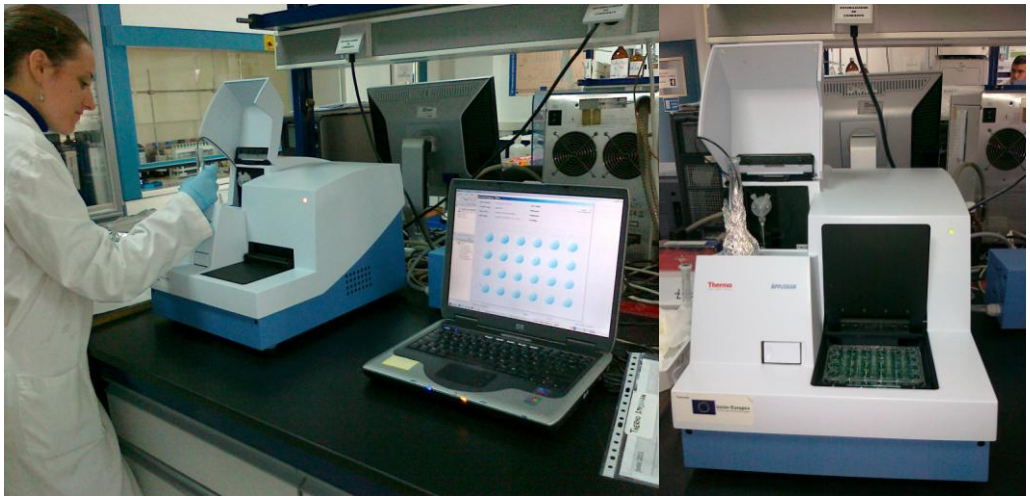


Figura 3.14. Fotómetro de microplacas Thermo Scientific Appliskan.

La cuantificación se llevó a cabo a través de patrón externo, Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico) (Figura 3.15), a partir de la recta de calibrado. El Trolox es un compuesto de alta capacidad antioxidante, análogo a la vitamina E, que permite medir capacidad antioxidante. Los resultados se expresaron en mg Trolox/100 g pf.

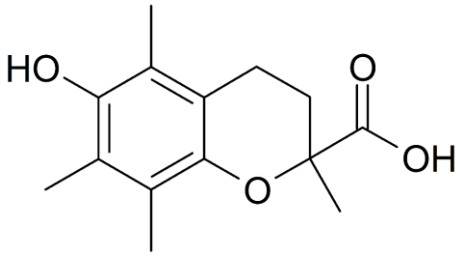


Figura 3.15. Estructura química del Trolox.

3.3.3. Digestión in vitro

Para el estudio de la biodisponibilidad de los compuestos funcionales, las 6 muestras de brócoli y col de Milán se sometieron a un proceso de digestión *in vitro*

(Figura 3.16). Se realizó una digestión *in vitro* por cada muestra, obteniéndose así 6 extractos para cada brassica digerida, n=6 (Figura 3.2).

El fluido gástrico (FG) se preparó según el método de la USP (United States Pharmacopeia) (Pharmacopeia, 2000). Para ello 0,2 g de pepsina y 0,125 g de cloruro sódico se disolvieron en agua destilada hasta un volumen final de 62,5 ml a pH 1,5. El fluido intestinal (FI) se preparó en tampón PBS (tampón fosfato salino) 0,1M. A 100 ml de este tampón a pH 3,4 se le añadieron 20 mg de pancreatina, 5 mg de lipasa, 10 de mM ácido cólico y 10 mM de ácido desoxicólico (Lee et al., 2003).

Para simular el proceso de digestión, a 10 g de muestra triturada (brócoli o col de Milán) se le añadieron 50 ml de este fluido gástrico y se mantuvo en agitación durante 20 min a pH 2,2 y 37 °C en un baño orbital con agua. Transcurrido este tiempo el pH se ajustó 6,5 para inactivar la pepsina (Fruton, 1971) y se le añadió 50 ml del fluido intestinal. Se mantuvo en agitación durante 20 min a pH 6,5 y 37 °C.

Una vez digeridas, las muestran se centrifugaron a 14000 rpm durante 10 min a 5 °C. En el sobrenadante obtenido después de la centrifugación se realizó el análisis de la fracción biodisponible, la parte sólida fue la parte residual o heces (Figura 3.16). La parte líquida se filtró después de centrifugarla, se congeló a -80 ºC para conservarla y se utilizó posteriormente para realizar los análisis de compuestos funcionales y de actividad antioxidante anteriormente descritos. Se realizó un anális por cada fracción o extracto digerido obtenido, n=6 (Figura 3.2).

Para el cálculo del porcentaje de biodisponibilidad de los compuestos funcionales se tuvieron en cuenta los contenidos iniciales de éstos en las muestras frescas y en las digeridas.

% Biodisponibilidad = (Biodisponible/Fresco) x 100

Donde:

Biodisponible es el contenido de los compuestos funcionales en las muestras después de la digestión *in vitro*.

Fresco es el contenido de los compuestos funcionales en las muestras frescas (o no digeridas).

Para calcular la bioactividad de los compuestos funcionales se tuvo en cuenta el valor de activad antioxidante de éstos en las muestras frescas y en las digeridas.

% Bioactividad = (Bioactividad/AAT Fresco) x 100

Donde:

Bioactividad es el valor de actividad antioxidante total (AAT) en las muestras después de la digestión *in vitro*.

AAT Fresco es el valor de AAT en las muestras frescas (o no digeridas).

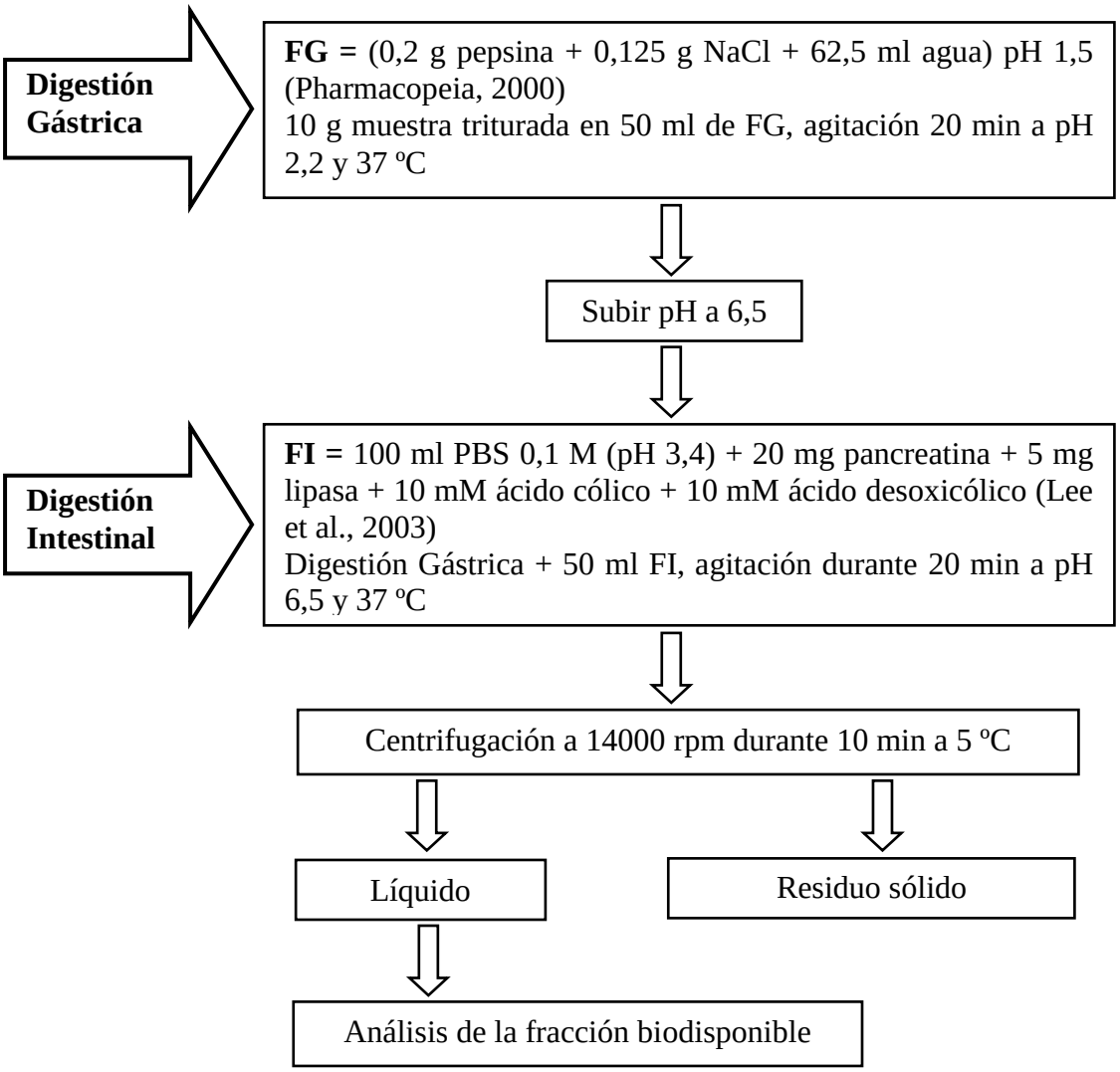


Figura 3.16. Diagrama de digestión *in vitro*.

3.3.4. Reactivos y patrones

Todos los patrones usados en las determinaciones descritas fueron adquiridos de Sigma-Aldrich SA., Madrid, España, excepto los de pigmentos carotenoides que fueron suministrados por Extrasynthese, Lyon, Francia.

Los reactivos usados en la digestión *in vitro* fueron adquiridos por Sigma-Aldrich SA., Madrid, España.

Los reactivos tanto de calidad HPLC, LC-MS como de análisis fueron suministrados por Panreac Química S.L.U., Barcelona, España.

El agua destilada y ultrapura MilliQ fueron obtenidas de un equipo Millipore, y al igual que los filtros de nylon de 0,45 µm fueron suministrados por Millipore Iberica, S.A.U., Madrid, España.

3.3.5. Análisis estadístico

Para el estudio estadístico se utilizó el programa SPSS 15.0 (SPSS Inc. Chicago, IL, USA). Los datos son expresados como media ± desviación estándar de seis análisis y muestras independientes. Los valores de las medias fueron analizados por el test de Student para comprobar la existencia de diferencias significativas entre ellos. Y para estimar la correlación entre variables se usó el test de Pearson a $p<0,05$ y 0,01 como niveles de significación.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados y discusión se presentan en dos partes:

- Una primera (4.1) en la que se aborda la caracterización funcional de los dos cultivares de brócoli, 'Parthenon' y 'Mónaco (4.1.1), y de col de Milán, 'Dama' y 'Leticia' (4.1.2), más producidos en Extremadura, con objeto de comprobar qué cultivar de cada brassica presenta mayor valor funcional.

Los resultados obtenidos en esta parte han sido ya publicados:

- Identification, quantification and comparison of the principal bioactive compounds and external quality parameters of two broccoli cultivars. *Journal of Functional Foods*, 2012, 4, 465-473

- Bioactive compounds content and total antioxidant activity of two Savoy cabbages. *Czech Journal of Food Sciences*, 2014, 32, 549-554

- Y una segunda parte (4.2) donde en primer lugar (4.2.1) se estudian los parámetros funcionales de brócoli 'Parthenon' y de col de Milán 'Dama', determinándose el contenido en compuestos funcionales y el valor de actividad antioxidante total, así como la correlación entre ambos; y en segundo lugar (4.2.2) se muestran y discuten los resultados obtenidos de biodisponibilidad y bioactividad de los compuestos funcionales determinados en las dos brassicas objeto de estudio, después de ser sometidas al proceso de digestión *in vitro*.

4.1. Caracterización funcional de los cultivares de brócoli (‘Parthenon’ y ‘Mónaco) y col de Milán (‘Dama’ y ‘Leticia’)

4.1. Caracterización funcional de los cultivares de brócoli (‘Parthenon’ y ‘Mónaco) y col de Milán (‘Dama’ y ‘Leticia’)

4.1.1. Caracterización funcional de los cultivares de brócoli (‘Parthenon’ y ‘Mónaco’)

El brócoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica)* se distingue por tener un gran número de compuestos funcionales tales como fenoles, glucosinolatos, carotenoides, clorofilas y diferentes vitaminas (Vallejo et al., 2003a; Vallejo et al., 2003b; Vallejo et al., 2003c; Vallejo et al., 2003d; Tian et al., 2005; Moreno et al., 2006; Borowski et al., 2008). El contenido de estos compuestos varía dependiento de muchos factores (Kurilich et al., 1999), siendo el cultivar el más importante en la variabilidad de los compuestos bioactivos presentes en las plantas de brócoli.

Los dos cultivares de brócoli estudiados, ‘Parthenon’ y ‘Mónaco’, fueron cultivados en Extremadura bajo condiciones similares y cosechados con los índices de madurez adecuados. Todos los parámetros estudiados en el brócoli se evaluaron con el fin de determinar las variaciones cualitativas y cuantitativas entre los dos cultivares, utilizando para ello los mismos procedimientos analíticos.

4.1.1.1. Ácido ascórbico y actividad antioxidante

En este trabajo se tomó el contenido de ácido ascórbico como representativo de la cantidad de vitamina C. En la Tabla 4.1 se muestra el contenido de ácido ascórbico y el valor de la actividad antioxidante total (AAT), que fue estadísticamente superior en brócoli ‘Parthenon’, 64,19 en comparación con los 45,24 mg de ácido ascórbico/100 g pf encontrados para ‘Mónaco’.

Por otro lado, el valor de la AAT determinado en ‘Parthenon’ (104,79 mg Trolox/100 g pf) fue más del doble que en ‘Mónaco’ (45,24 mg Trolox/100 g pf). Los valores de ácido ascórbico y AAT fueron similares a los encontrados por otros autores para los mismos cultivares (Favell, 1998; Kurilich et al., 1999; Vallejo et al., 2002; Vallejo et al., 2003a; USDA / ARS, 2006; Singh et al., 2007; Koh et al., 2009). Se encontró una alta correlación ($r=0,958$ $p<0,01$), según el test de Pearson, entre la actividad antioxidante y el contenido en ácido ascórbico (Tabla 4.2).

4.1.1.2. Pigmentos carotenoides y clorofílicos

Los pigmentos carotenoides encontrados en los dos cultivares de brócoli fueron β-caroteno y luteína, aunque hay estudios (Podsedek, 2007) que indican también la presencia de zeaxantina.

La luteína y la zeaxantina son dos compuestos que con el método cromatográfico empleado en este trabajo (García et al., 2007) coeluyen al mismo tiempo, por lo que para comprobar la presencia de estos dos compuestos en las muestras de brassicas se utilizó el método de calibración por mínimos cuadrados parciales (PLS), utilizando los espectros de ultravioleta-visible recogidos en el pico cromatográfico, y que fue puesto a punto por nuestro grupo de investigación. Al realizar este estudio, se observó que el brócoli no contenía zeaxantina, sino solo luteína y β-caroteno (González-Gómez et al., 2012).

Para la determinación de las clorofilas se utilizó también el método quimiométrico de mínimos cuadrados parciales (PLS), que fue aplicado a las señales espectrofotométricas conjuntas obtenidas por la clorofila A y la clorofila B, para cuantificarlas de forma individual (Fernández-León et al., 2010).

El contenido de pigmentos carotenoides y de clorofilas se resume en la Tabla 4.1. Los resultados obtenidos fueron comparables con los de otros autores (Kurilich et al., 1999; García et al., 2005; Singh et al., 2007; Fernández-León et al., 2010).

El β-caroteno fue el principal carotenoide encontrado en brócoli. Su concentración fue significativamente mayor en 'Parthenon' que en 'Mónaco' (0,80 y 0,71 mg β-caroteno/100 g pf, respectivamente). También se encontraron cantidades apreciables de luteína, si bien no se observaron diferencias significativas entre cultivares en ambos cultivares.

La luteína y el β-caroteno se encuentran solubilizados en las fracciones lipídicas de los sistemas biológicos. Estos pigmentos protegen las membranas celulares de los radicales libres (Singh et al., 2007), por lo que son considerados los antioxidantes liposolubles más importantes. Por tanto, la cantidad de β-caroteno debería estar relacionada con el valor AAT. Sin embargo, la prueba de correlación de Pearson indicó

una correlación significativa pero baja (r=0,599 p<0,05) (Tabla 4.2). Esto puede ser debido a que los carotenoides son especialmente sensibles a la fotoxidación (Singh et al., 2007), con lo que en el proceso de extracción y análisis de los mismos podrían haberse producido pérdidas, de ahí que la correlación sea positiva pero baja.

Tabla 4.1. Concentración de los principales compuestos bioactivos y actividad antioxidante total de los cultivares de brócoli 'Parthenon' y 'Mónaco'.

		MUESTRAS		
		'Parthenon'	**'Mónaco'**	**Significación**
[1]Ácido Ascórbico		64,19±3,65	45,24±2,97	**
[1]β-caroteno		0,80±0,03	0,71±0,09	*
[1]Luteína		0,60±0,01	0,54±0,09	ns
[1]Clorofila A		9,38±1,17	8,07±0,74	*
[1]Clorofila B		3,24±0,42	3,23±0,39	ns
[2]Contenido Fenólico Total		147,15±5,86	81,55±3,02	**
Ácidos Fenólicos	**[1]Ác. Gálico**	1,80±0,09	1,85±0,34	ns
	[1]Ác. Clorogénico	1,38±0,23	0,96±0,10	**
	[1]Ác. Sinápico	1,25±0,56	0,64±0,01	*
Flavonoides	**[1]Quercetina**	6,02±0,22	4,44±0,09	**
	[1]Kaempferol	3,29±0,32	2,28±0,14	**
[3]AAT		104,79±0,39	92,74±0,86	**

[1] Expresado como mg/100 g peso fresco.
[2] Expresado como mg ác. clorogénico equivalente/100 g peso fresco.
[3] Expresado como mg Trolox/100 g peso fresco.
Media±Desviación estándar, n=6.
(ns) no existen diferencias significativas entre los valores.
(*) existen diferencias significativas entre los valores (p<0,05).
(**) existen diferencias significativas entre los valores (p<0,01).

Tabla 4.2. Correlaciones entre los diferentes parámetros estudiados y la actividad antioxidante total (AAT) mediante el test de Pearson.

	Correlación de Pearson
Parámetros	**AAT**
Ácido Ascórbico	0,958(**)
β-caroteno	0,599(*)
Clorofila A	0,590(*)
Contenido Fenólico Total	0,987(**)
[1]Ácidos Fenólicos	0,787(**)
[2]Flavonoides	0,972(**)
Glucosinolatos Totales	0,967(**)

[1] Ácidos Fenólicos: gálico, clorogénico y sinápico.
[2] Flavonoides: quercetina y kaempferol.
(*) La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral).
(**) La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

Con respecto a los valores de clorofila (Tabla 4.1), la clorofila A fue el pigmento más abundante en los brócolis estudiados, observándose mayor concentración en 'Parthenon' que en 'Mónaco' (9,38 y 8,07 mg clorofila A/100 g pf, respectivamente). Resultados similares han sido obtenidos por otros autores para diferentes vegetales verdes (Khachik et al., 1986; Burns et al., 2003; García et. al., 2005). Para la clorofila B no se observaron diferencias significativas entre los dos cultivares de brócoli estudiados.

Las clorofilas son los pigmentos fitoquímicos más abundantes en las plantas superiores. Además, Lai et al. (1980) demostraron una relación entre la actividad anti-mutagénica y antioxidante y el contenido de clorofila de una serie de extractos vegetales comunes. También se ha encontrado que la clorofila A es más eficaz contra los radicales libres que la clorofila B (Ferruzzi et al., 2002). Se estudió la correlación entre el contenido de clorofila A y el valor de actividad antioxidante en estos dos cultivares de brócoli, que resultó significativa pero baja ($r=0,590$ $p<0,05$) (Tabla 4.2),

aproximadamente del mismo orden de magnitud que la del β-caroteno, debido también a que las clorofilas son fotosensibles (Singh et al., 2007) y por tanto resulta casi inevitable que se produzcan pérdidas en su extracción.

Además, los datos de correlación obtenidos para el β-caroteno y la clorofila A, están deacuerdo a los publicados por otros autores (Singh et al., 2007; Podsedek et al., 2006; Koh et al., 2009) que indican que son, de forma general, los pigmentos carotenoides y clorofílicos los que menos contribuyen a la actividad antioxidante total en las brassicas (Tabla 4.2).

4.1.1.3. Compuestos fenólicos

En la Tabla 4.1 se muestra el contenido fenólico total de los dos cultivares de brócoli, expresado como mg de ác. clorogénico equivalente/100 g de peso fresco (pf). Dicho contenido concuerda con los valores encontrados en la literatura (Sousa et al., 2008; Koh et al., 2009), con diferencias estadísticas entre ambos cultivares, siendo el contenido fenólico total mayor en 'Parthenon' que en 'Mónaco' (147,15 y 81,55 mg ác. clorogénico equivalente/100 g pf, respectivamente). Además, los valores de actividad antioxidante encontrados estuvieron muy correlacionados ($r=0,987$ $p<0,01$) con el alto contenido fenólico total en esta planta (Ou et al., 2002; Wu et al, 2004; Podsedek, 2007) (Tabla 4.2).

Teniendo en cuenta los compuestos fenólicos individuales determinados (Tabla 4.1), los resultados obtenidos en este trabajo fueron comparables con los encontrados en la literatura (Vallejo et al., 2003c; Vallejo et al., 2003d; USDA/ARS, 2007; Koh et al., 2009), siendo la quercetina el compuesto fenólico más abundante seguido del kaempferol. Se observaron diferencias significativas en el contenido de ácidos fenólicos y flavonoides determinados en ambos cultivares de brócoli. Los contenidos fueron mayores en el cultivar 'Parthenon' (1,38 mg ác. clorogénico, 1,25 mg ác. sinápico, 6.02 mg quercetina y 3,29 mg kaempferol por 100 g de peso fresco) que en el cultivar 'Mónaco' (0,96 mg ác. clorogénico, 0,64 mg ác. sinápico, 4,44 mg quercetina y 2,28 mg kaempferol por 100 g de peso fresco); sin embargo, en el caso del ácido gálico no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los dos cultivares de brócoli.

En la Tabla 4.2 se resumen las correlaciones, según la prueba de Pearson, entre los valores de actividad antioxidante total y el contenido en ácidos fenólicos (r=0,787 p<0,01) y en flavonoides (r=0,972 p<0,01). Los compuestos flavonoides son muy abundantes en las brassicas, por lo que deben ser los que más contribuyen a la capacidad antioxidante de estos vegetales (Ou et al., 2002; Wu et al., 2004; Podsedek, 2007; Fernández-León et al., 2011a), como se puede deducir del valor del coeficiente de correlación.

4.1.1.4. Glucosinolatos intactos

Existe una gran diversidad de compuestos de este tipo, también llamados tioglucósidos, que están presentes en las hortalizas de la familia de las Crucíferas o Brasicáceas. Está demostrado que, tanto los glucosinolatos (GS) como algunos de sus derivados (isotiocianatos), son anticancerígenos (Wong et al., 1998). Los principales isotiocianatos son: sulforafano, derivado de la glucorafanina; alil isotiocianato, derivado de la sinigrina; crambeno, derivado de la progoitrina; indol-3-carbinol, derivado de la glucobrasicina y fenetil isotiocianato, derivado de la gluconasturtina (Keck y Finley, 2004).

Los glucosinolatos encontrados se clasificaron teniendo en cuenta su estructura química, y los valores obtenidos para las brassicas estudiadas (Tabla 4.3), expresados en mg de sinigrina equivalente/100 g (pf), estuvieron en el rango de concentraciones encontrado por otros autores para otros cultivares de brócoli (Kushad et al., 1999; Ciska et al., 2000; Vallejo et al., 2002; Tian et al., 2005; Cartea et al., 2008b).

Los 11 glucosinolatos identificados fueron clasificados en tres familias químicas:

1) Alifáticos:

- Alquílicos: glucorafanina, glucoiberina y glucoalisina

- Alquenílicos: sinigrina, gluconapina y glucobrasicanapina

- Hidroxialquenílicos: progoitrina

2) Indólicos: glucobrasicina, 4-Metoxiglucobrasicina y neoglucobrasicina

3) Aromáticos: gluconasturtina

Se observaron diferencias significativas entre los dos cultivares de brócoli estudiados en el contenido en glucosinolatos alifáticos totales (Tabla 4.3), mostrando el cultivar 'Parthenon' mayores concentraciones que 'Mónaco' (72,28 y 67,83 µmol sinigrina equivalente/100 g pf, respectivamente). Sin embargo, dentro de los glucosinolatos alifáticos se observaron diferentes comportamientos en función de su estructura química. Así, glucoiberina y glucoalisina (GS alquílicos) y gluconapina (GS alquenílico) presentaron mayor abundancia en 'Mónaco' (1,17, 1,39 y 15,35 µmol sinigrina equivalente/ 100 g de peso fresco, respectivamente) que en 'Parthenon' (0,12, 0,57 y 13,88 µmol sinigrina equivalente/100 g pf, respectivamente). Mientras que sinigrina y glucobrasicanapina (GS alquenílicos) fueron más abundantes en el cultivar 'Parthenon' (0,57 y 53,89 µmol sinigrina equivalente/100 g pf, respectivamente) que en 'Mónaco' (0,23 y 46,88 µmol sinigrina equivalente/100 g pf). Por otro lado, no se observaron diferencias significativas para glucorafanina (GS alquílico) ni progoitrina (GS hidroxialquenílico), glucosinolatos precursores de isotiocianatos con propiedades anticancerígenas. A diferencia de otros estudios (Tian et al., 2005; Verkerk et al., 2009), glucorafanina no fue el glucosinolato más abundante en los cultivares de brócoli estudiados en nuestro trabajo.

Los derivados indólicos constituyen los GS más numeros en ambos cultivares (Tabla 4.3). Se encontraron mayores concentraciones de GS indólicos totales en 'Parthenon' (120,73 µmol sinigrina equivalente/100 g pf) que en 'Mónaco' (92,87 µmol sinigrina equivalente/100 g pf). Dentro del grupo de GS indólicos, el contenido de glucobrasicina y 4-metoxiglucobrascina fue mayor en el cultivar 'Parthenon' (113,93 y 6,31 µmol sinigrina equivalente/100 g pf, respectivamente) que en 'Mónaco' (87.30 y 5.00 µmol sinigrina equivalente/100 g pf, respectivamente), mientras que para el GS neoglucobrasicina no fueron encontradas diferencias estadísticamente significativas entre cultivares. El GS glucobrasicina es el precursor del indol-3-carbinol (isotiocianato anticancerígeno) y como se muestra en la Tabla 4.3, este compuesto es el glucosinolato más abundante en ambos cultivares. Resultados similares han sido publicados por otros autores para otros cultivares de brócoli (Vallejo et al., 2002).

Tabla 4.3. Contenido de glucosinolatos (GS) intactos en los cultivares de brócoli ‘Parthenon’ y ‘Mónaco’.

		MUESTRAS		
		‘Parthenon’	**‘Mónaco’**	**Significación**
[1]GS Totales		**203,85±3,52**	**164,44±9,66**	**
[1]Alifáticos				
Alquílicos	Glucorafanina	2,33±0,03	2,03±0,65	ns
	Glucoiberina	0,12±0,03	1,17±0,24	**
	Glucoalisina	0,57±0,10	1,39±0,20	**
Alquenílicos	Sinigrina	0,57±0,03	0,23±0,09	**
	Gluconapina	13,88±0,33	15,35±0,97	**
	Glucobrasicanapina	53,89±3,00	46,88±2,40	**
Hidroxialquenílicos	Progoitrina	0,92±0,17	0,77±0,18	ns
Totales		**72,28±3,35**	**67,83±2,19**	*
[1]Indólicos				
	Glucobrasicina	113,93±0,56	87,30±8,52	**
	4-Metoxiglucobrasicina	6,31±0,23	5,00±0,43	**
	Neoglucobrasicina	0,50±0,11	0,57±0,26	ns
Totales		**120,73±0,59**	**92,87±8,96**	**
[1]Aromáticos				
	Gluconasturtina	10,83±0,18	3,74±0,31	**

[1] Expresado como µmol sinigrina equivalente/100 g peso fresco.
Media±Desviación estándar, n=6.
(ns) no existen diferencias significativas entre los valores
(*) existen diferencias significativas entre los valores (p<0,05).
(**) existen diferencias significativas entre los valores (p<0,01).

Entre los glucosinolatos aromáticos, gluconasturtina fue el único determinado en ambos cultivares (Tabla 4.3), encontrándose un mayor contenido en 'Parthenon' (10,83 μmol sinigrina equivalente/ 100 g pf).

Finalmente, los resultados de la Tabla 4.3 muestran diferencias significativas en la concentración de glucosinolatos totales para los cultivares estudiados, siendo mayor en 'Parthenon' (203,85 equivalente/100 g pf) que en el cultivar 'Mónaco' (3,74 μmol sinigrina equivalente/μmol sinigrina equivalente/100 g pf) que en 'Mónaco' (164,44 μmol sinigrina equivalente/100 g pf).

En los vegetales del género *brassica*, diferentes especies del mismo género y diferentes cultivares de la misma especie tienen concentraciones de glucosinolatos muy variables (Kushad et al., 1999; Ciska et al., 2000; Fahey et al., 2001). Los glucosinolatos se caracterizan por poseer una elevada capacidad antioxidante (Moreno et al., 2006; Verkerk et al., 2009). Como se muestra en la Tabla 4.2, existe una fuerte correlación entre el contenido total de glucosinolatos y la actividad antioxidante ($r=0,967$ $p<0,01$).

4.1.1.5. Resumen de resultados

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en conjunto, se puede concluir que el cultivar 'Parthenon' es más rico en β-caroteno, clorofila A, compuestos fenólicos, ácidos fenólicos, flavonoides y glucosinolatos. Además, este cultivar mostró valores más elevados de vitamina C (cuantificada como ácido ascórbico) y de actividad antioxidante *in vitro*. La diferencia más destacada estuvo en la cantidad de compuestos fenólicos totales, que en el cultivar 'Parthenon' fue alrededor de un 50% mayor que en 'Mónaco'. Además, también hay que destacar el mayor contenido de gluconasturtina encontrado en 'Parthenon' respecto a 'Mónaco'; este glucosinolato es el precursor del fenetil isotiocianato, compuesto anticancerígeno muy estudiado en la actualidad.

4.1.2. Caracterización funcional de los cultivares de col de Milán ('Dama' y 'Leticia')

El objetivo de este trabajo fue identificar, cuantificar y comparar los compuestos bioactivos, así como la actividad antioxidante *in vitro* de dos cultivares de col de Milán, 'Dama' y 'Leticia', cultivados en Extremadura, en condiciones similares y cosechados con los índices de calidad adecuados.

4.1.2.1. Ácido ascórbico

En este estudio, la vitamina C se ha determinado como contenido de ácido ascórbico en los dos cultivares de col de Milán. No se observaron diferencias significativas entre ambos cultivares en el contenido de ácido ascórbico (Tabla 4.4). Estos valores fueron más altos que los valores medios obtenidos por Martínez et al. (2010) para coles rizadas y similares a los obtenidos por Podsedek et al. (2006). En general, entre los vegetales del género *brassica*, el repollo blanco y la col rizada son las más pobres en vitamina C, sin embargo, en muchos países, estas son las hortalizas más populares y consumidas del género *brassica* (Podsedek, 2007).

4.1.2.2. Pigmentos carotenoides y clorofílicos

El contenido en carotenoides y clorofilas se resume en la Tabla 4.4. Los resultados obtenidos fueron comparables a los publicados por otros autores (Singh et al. 2006; Singh et al., 2007; Fernández-León et al., 2010; Martínez et al., 2010).

Al realizar este estudio, se observó que la col de Milán, al igual que el brócoli, no presentaba zeaxantina, en el análisis quimiométrico-cromatográfico solo se encontraron cantidades relevantes de luteína y de β-caroteno (González-Gómez et al., 2012).

No se observaron diferencias significativas en la concentración de β-caroteno para los dos cultivares de col de Milán estudiados. Sin embargo, la concentración de luteína fue significativamente mayor en 'Leticia' (0,48 mg luteína/100 g peso fresco) que en el cultivar 'Dama' (0,18 mg luteína/100 g peso fresco).

Tabla 4.4. Concentración de los principales compuestos bioactivos y actividad antioxidante total de col de Milán 'Dama' y 'Leticia'.

		MUESTRAS		
		'Dama'	**'Leticia'**	**Significación**
[1]Ácido Ascórbico		49,06±7,52	43,69±4,86	ns
[1]β-caroteno		0,37±0,05	0,33±0,08	ns
[1]Luteína		0,18±0,02	0,48±0,03	**
[1]Clorofila A		2,26±0,18	1,16±0,02	**
[1]Clorofila B		0,85±0,04	0,50±0,01	**
[2]Contenido Fenólico Total		102,71±4,10	50,00±6,51	**
Ácidos Fenólicos	**[1]Ác. Gálico**	0,89±0,14	0,22±0,01	**
	[1]Ác. Clorogénico	0,20±0,01	0,54±0,08	**
	[1]Ác. Sinápico	1,59±0,27	0,46±0,07	**
Flavonoides	**[1]Quercetina**	1,21±0,03	1,27±0,16	ns
	[1]Kaempferol	1,47±0,03	1,45±0,15	ns
[3]AAT		56,62±2,72	43,53±5,02	**

[1] Expresado como mg/100 g peso fresco.
[2] Expresado como mg ác. clorogénico equivalente/100 g peso fresco.
[3] Expresado como mg Trolox/100 g peso fresco.
Media±Desviación estándar, n=6.
(ns) no existen diferencias significativas entre los valores.
(**) existen diferencias significativas entre los valores (p<0,01).

Con respecto a las clorofilas, la clorofila A fue el pigmento más abundante encontrado en los cultivares de col de Milán estudiados (Tabla 4.4), siendo su concentración significativamente mayor en 'Dama' que en el cultivar 'Leticia' (2,26 y 1,16 mg clorofila A/100 g peso fresco (pf), respectivamente). También hubo diferencias significativas entre los dos cultivares para la clorofila B, siendo también mayor el valor en el cultivar 'Dama' (0,85 mg clorofila B/100 g de pf) que en cultivar 'Leticia' (0,50

mg clorofila B/100 g pf). Concentraciones similares a las obtenidas en este trabajo fueron encontradas por otros autores para distintos vegetales verdes (Khachik et al., 1986; García et al., 2005; Noichinda et al., 2007).

4.1.2.3. Compuestos fenólicos

El contenido fenólico total se muestra en la Tabla 4.4, observándose diferencias significativas entre ambos cultivares, siendo el contenido fenólico total mayor en 'Dama' que en 'Leticia' (102,71 y 50,00 mg ác. clorogénico equivalente/100 g peso fresco, respectivamente). Los valores que se obtuvieron en este estudio fueron similares a los obtenidos por Podsedek et al. (2006) y Martínez et al. (2010) para col de Milán, y por Bahorun et al. (2004) para col china. En otros estudios (Chu et al., 2002; Wu et al., 2004) se analizó el contenido fenólico total en diferentes brassicas, realizándose un ranking que iba desde los 15,3 mg/100 g pf en repollo blanco hasta los 337,0 mg/100 g pf en brócoli.

Teniendo en cuenta los compuestos fenólicos individuales, los resultados obtenidos (Tabla 4.4) son parecidos a los indicados previamente por otros autores (Martínez et al., 2010). Se observaron diferencias estadísticamente significativas en el contenido de ácidos fenólicos, siendo mayor los valores de ác. gálico y ác. sinápico en el cultivar 'Dama' (0,89 mg ác. gálico/100 g de pf y 1,59 mg ác. sinápico/100 g de pf) que en 'Leticia' (0,22 mg ác. gálico/100 g pf y 0,46 mg ác. sinápico/100 g pf); sin embargo el contenido de ác. clorogénico fue mayor en 'Leticia' que en 'Dama' (0,54 y 0,20 mg ác. clorogénico/100 g pf, respectivamente). Para los flavonoides no se observaron diferencias significativas entre ambos cultivares de col de Milán.

4.1.2.4. Glucosinolatos intactos

Las hortalizas del género *brassica* son la principal fuente de glucosinolatos (GS) en la dieta humana. Se sabe que determinadas especies, variedades y cultivares difieren con respecto al tipo y a la cantidad de GS (Fenwick et al., 1983). Cabe señalar, que los isotiocianatos derivados de la hidrólisis de glucosinolatos han mostrado efectos protectores contra el cáncer (Fahey et al., 2001; Keck y Finley, 2004).

Los contenidos de GS determinados para los dos cultivares de col de Milán se muestran en la Tabla 4.5, teniendo en cuenta la estructura química del GS, y están de acuerdo con los resultados obtenidos en estudios previos para otros cultivares col de Milán (Ciska et al., 2000; Cartea et al., 2008b).

Se observaron diferencias significativas entre los cultivares de col de Milán estudiados en términos de glucosinolatos alifáticos totales (Tabla 4.5), encontrándose mayores cantidades en 'Dama' que en 'Leticia' (90,82 y 86,61 µmol sinigrina equivalente/100 g pf, respectivamente). Sin embargo, dentro de los glucosinolatos alifáticos se observaron diferentes comportamientos dependiendo de la estructura química. El contenido de glucorafanina (GS alquílico) y glucobrasicanapina (GS alquenílico) fue mayor en 'Dama' (0,47 y 47,34 µmol sinigrina equivalente/100 g pf, respectivamente) que en el cultivar 'Leticia' (0,26 y 35,32 µmol sinigrina equivalente/100 g pf, respectivamente). Sin embargo, gluconapina (GS alquenílico) fue más abundante en 'Letica' que en el cultivar 'Dama' (16,85 y 8,11 µmol sinigrina equivalente/100 g pf, respectivamente). Por otro lado, no se observaron diferencias estadísticamente significativas para glucoiberina y glucoalisina (GS alquílicos), sinigrina (GS alquenílico) y progoitrina (GS hidroxialquenílico) entre los dos cultivares de col de Milán estudiados.

Los derivados indólicos constituyen los GS más abundantes en ambos cultivares (Tabla 4.5). Se encontró mayor concentración de glucosinolatos indólicos totales en el cultivar 'Dama' (104,41 µmol sinigrina equivalente/100 g pf) que en 'Leticia' (65,18 µmol sinigrina equivalente/100 g pf). El mismo comportamiento se observó para los compuestos individuales, los contenidos de glucobrasicina, 4-metoxiglucobrasicina y neoglucobrasicina fueron significativamente mayores en 'Dama' (63,62, 13,07 y 27,72 µmol sinigrina equivalente/100 g pf, respectivamente) que en 'Leticia' (44,02, 7,40 y 13,76 µmol sinigrina equivalente/100 g pf, respectivamente). Glucobrasicina es el GS más abundante en ambos cultivares y en todos los vegetales de las especies *B. oleracea*, y dependiendo del cultivar, este GS representa del 10% al 65% del total de glucosinolatos (Ciska et al., 2000); en este estudio el GS glucobrasicina representó el 33% de los GS totales para cultivar 'Dama' y el 29% para el cultivar 'Leticia'.

Tabla 4.5. Contenido de glucosinolatos (GS) intactos en los cultivares de col de Milán 'Dama' y 'Leticia'.

		MUESTRAS		
		'Dama'	**'Leticia'**	**Significación**
[1]GS Totales		**195,22±3,09**	**151,79±3,93**	**
[1]Alifáticos				
Alquílicos	Glucorafanina	0,47±0,10	0,26±0,08	**
	Glucoiberina	3,91±0,22	3,72±0,60	ns
	Glucoalisina	1,84±0,21	2,10±0,39	ns
Alquenílicos	Sinigrina	15,33±0,46	14,57±1,06	ns
	Gluconapina	8,11±1,17	16,85±1,78	**
	Glucobrasicanapina	47,34±1,17	35,32±2,76	**
Hidroxialquenílicos	Progoitrina	13,81±1,33	13,79±1,14	ns
Totales		**90,82±3,04**	**86,61±2,71**	*
[1]Indólicos				
	Glucobrasicina	63,62±2,33	44,02±3,73	**
	4-Metoxiglucobrasicina	13,07±0,86	7,40±2,04	**
	Neoglucobrasicina	27,72±0,63	13,76±0,36	**
Totales		**104,41±2,24**	**65,18±2,19**	**
[1]Aromáticos				
	Gluconasturtina	nd	nd	ns

[1] Expresado como µmol sinigrina equivalente/100 g peso fresco.
Media±Desviación estándar, n=6.
(nd) no detectado.
(ns) no existen diferencias significativas entre los valores.
(*) existen diferencias significativas entre los valores (p<0,05).
(**) existen diferencias significativas entre los valores (p<0,01).

Entre los glucosinolatos aromáticos, el GS gluconasturtina no se detectó en los cultivares de col de Milán estudiados (Tabla 4.5). Esto sucede en otras variedades de col (Ciska et al., 2000) y también está de acuerdo con los resultados de Cartea et al. (2008b) quienes encontraron que el intervalo de concentración de este glucosinolato en coles va desde 0,00 hasta 1,38 μmol sinigrina equivalente/100 g pf.

Finalmente, en la Tabla 4.5 se muestra la concentración de glucosinolatos totales, que presenta diferencias significativas entre los dos cultivares estudiados, siendo mayor en 'Dama' (195,22 μmol sinigrina equivalente/100 g pf) que en 'Leticia' (151,79 μmol sinigrina equivalente/100 g pf).

4.1.2.5. Actividad antioxidante

La actividad antioxidante total (AAT) en el cultivar 'Dama' (56,62 mg Trolox/100 g peso fresco) fue significativamente mayor que la de 'Leticia' (43,53 mg Trolox/100 g peso fresco) (Tabla 4.4), siendo estos valores similares a los obtenidos por otros autores (Podsedek et al., 2006).

En general, se observó una buena correlación de Pearson entre los valores de AAT y el contenido de biocompuestos determinados en este estudio (Tabla 4.6). El contenido en β-caroteno no tuvo correlación con la AAT, el ácido ascórbico tuvo una escasa correlación, mientras que el contenido en luteína y en clorofilas sí estuvo altamente correlacionado con el valor de actividad antioxidante total ($r \approx 0,8$ $p<0,01$) en los dos cultivares de col de Milán estudiados.

En cuanto a los compuestos fenólicos, en varios estudios *in vitro*, estos compuestos demostraron una mayor actividad antioxidante que las vitaminas y los carotenoides (Vinson et al., 1995; Podsedek, 2007). En nuestro estudio los altos valores de actividad antioxidante se asociaron fuertemente (según el coeficiente de correlación de Pearson $r=0,913$ $p<0,01$) con el contenido de compuestos fenólicos total en este vegetal (Wu et al., 2004; Podsedek, 2007) (Tabla 4.6). Entre los compuestos fenólicos, los flavonoides son muy abundantes en el género *brassica* y por lo tanto contribuyen de manera importante a la actividad antioxidante de estos vegetales (Chu et al., 2002) y en menor medida contribuyen los ácidos fenólicos.

Tabla 4.6. Correlaciones entre los diferentes parámetros estudiados y la actividad antioxidante total (AAT) mediante el test de Pearson.

	Correlación de Pearson
Parámetros	**AAT**
Ácido Ascórbico	0,450(*)
Luteína	0,856(**)
Clorofila A	0,876(**)
Clorofila B	0,894(**)
Contenido Fenólico Total	0,913(**)
[1]Ácidos Fenólicos	0,844(**)
[2]Flavonoides	0,904(**)
Glucosinolatos Totales	0,884(**)

[1] Ácidos Fenólicos: gálico, clorogénico y sinápico.
[2] Flavonoides: quercetina y kaempferol.
(*) La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral).
(**) La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

Los glucosinolatos se caracterizan por su alta capacidad antioxidante (Moreno et al., 2006; Verkerk et al., 2009.), por lo que cabe esperar que exista una fuerte correlación entre el contenido total de glucosinolatos y la actividad antioxidante, tal y como se muestra en la Tabla 4.6 ($r=0,884$ $p<0,01$) para los dos cultivares de col de Milán estudidados.

4.1.2.6. Resumen de resultados

Tras la comparación de los resultados obtenidos en este trabajo para los dos cultivares de col de Milán estudiados, se observó que 'Dama' presentaba mayores contenidos que el cultivar 'Leticia' en la mayoría de los biocompuestos estudiados. Además, el cultivar 'Dama' mostró valores más altos de actividad antioxidante *in vitro*, ya que fue el que presentó mayores contenidos, casi el doble, en los principales compuestos antioxidantes, tales como compuestos fenólicos totales, clorofila A y

glucosinolatos indólicos totales. También, fue destacable la alta concentración de glucobrasicina encontrada en este cultivar. Por último, se observó que el contendio en GS glucorafanina (precursor del sulforafano) fue aproximadamente un 50% mayor en ‘Dama’ que en cultivar ‘Leticia’.

4.2. Compuestos funcionales en brócoli ‘Parthenon’ y col de Milán ‘Dama’ en la fracción biodisponible

4.2. Compuestos funcionales en brócoli 'Parthenon' y col de Milán 'Dama' en la fracción biodisponible

Este apartado se divide en dos partes: una primera (4.2.1) en la que se aborda la caracterización funcional y la actividad antioxidante total del brócoli 'Parthenon' y la col de Milán 'Dama', que fueron los cultivares que presentaron un mayor contenido en compuestos fucionales en el primer estudio (punto 4.1. En la segunda parte (4.2.2) se muestran y discuten los resultados obtenidos de biodisponibilidad y bioactividad de esos compuestos funcionales determinados en las dos brassicas objeto de estudio, después de ser sometidas al proceso de digestión *in vitro*.

4.2.1. Compuestos funcionales y actividad antioxidante total en brócoli 'Parthenon' y col de Milán 'Dama' en fresco

4.2.1.1. Vitamina C

En la Tabla 4.7 se muestran los valores del contenido de ácido ascórbico, ácido dehidroascórbico y vitamina C obtenidos para las dos brassicas de estudio, brócoli 'Parthenon' y col de Milán 'Dama'.

El contenido de vitamina C corresponde al sumatorio de los ácidos ascórbico y dehidroascórbico (producto de oxidación del ác. ascórbico), siendo el ácido ascórbico el mayoritario en las dos brassicas. Aproximadamente el 80-85% del total del contenido en vitamina C corresponde a ácido ascórbico, expresándose como mg ác. ascórbico/100 g peso fresco (pf).

En brócoli, el contenido de ácido ascórbico fue de 64,688 mg ác. ascórbico/100 g pf, similar a lo obtenido por otros autores (Favell, 1998; Kurilich et al., 1999; Vallejo et al., 2002; Vallejo et al., 2003a; Franke et al., 2004; USDA/ARS, 2006; Singh et al., 2007; Koh et al., 2009), mientras que en col de Milán fue de 50,052 mg ác. ascórbico/100 g pf, siendo este valor más alto que los obtenidos para col rizada por Martínez et al. (2010), pero similares a los obtenidos por Podsedek et al. (2006). Por lo tanto, el contenido de ácido ascórbico en brócoli fue mayor que en la col de Milán, siendo diferentes significativamente.

No se encontraron diferencias significativas entre los valores del contenido en ácido dehidroascórbico para las dos brassicas, siendo para brócoli 12,028 mg ác. dehidroascórbico/100 g pf y para col de Milán 11,809 ác. dehidroascórbico/100 g pf (Tabla 4.16). El contenido en ácido dehidroascóbico varía dentro del género *Brassica*, existiendo una gran variabilidad entre los valores obtenidos en diferentes estudios (Vanderslice et al., 1990; Gökmen et al., 2000; Vallejo et al., 2003a).

Tabla 4.7. Contenido de ác. ascórbico, ác. dehidroascórbico y vitamina C en brócoli 'Parthenon' y col de Milán 'Dama'.

	MUESTRAS		
	Brócoli	**Col de Milán**	**Significación**
[1]Ác. Ascórbico	64,69±2,34	50,05±2,85	**
[2]Ác. Dehidroascórbico	12,03±0,65	11,81±0,76	ns
[1]Vitamina C	76,72±2,28	61,86±3,54	**

[1] Expresado como mg ác. ascórbico/100 g peso fresco.
[2] Expresado como mg ác. dehidroascórbico/100 g peso fresco.
Media±Desviación estándar, n=6.
(ns) no existen diferencias significativas entre muestras.
(**) existen diferencias significativas entre los valores ($p<0,01$).

El mayor contenido de vitamina C se obtuvo en el brócoli, con un valor de 76,72 mg ác. ascórbico/100 g peso fresco (pf), frente a la col de Milán, 61,86 mg ác. ascórbico/100 g pf, siendo ambos valores significativamente diferentes. El contenido de vitamina C varía significativamente dentro del género *brassica*, así como entre y dentro de sus subespecies (Kurilich et al., 1999; Vallejo et al., 2002; Podsedek, 2007).

El brócoli 'Parthenon' contiene aproximadamente un 20% más de vitamina C que la col de Milán 'Dama' (Tabla 4.16) y, aunque estas brassicas poseen menor contenido de vitamina C que otras, como son las coles de Bruselas y la berza o col forrajera, en muchos países son los tipos de brassica más populares (Podsedek, 2007).

4.2.1.2. Carotenoides

Los valores del contenido en los carotenoides estudiados se muestran en la Tabla 4.8, y se expresan en mg/100 g pf, el contenido total de estos pigmentos se expresó como β-caroteno, por ser éste el pigmento carotenoide mayoritario.

Tabla 4.8. Contenido de β-caroteno, luteína y carotenoides totales en brócoli 'Parthenon' y col de Milán 'Dama'.

	MUESTRAS		
	Brócoli	**Col de Milán**	**Significación**
[1]β-caroteno	0,77±0,05	0,34±0,07	**
[2]Luteína	0,56±0,06	0,17±0,04	**
[1]Carotenoides Totales	1,33±0,03	0,51±0,06	**

[1] Expresado como mg β-caroteno/100 g peso fresco.
[2] Expresado como mg luteína/100 g peso fresco.
Media±Desviación estándar, n=6.
(**) existen diferencias significativas entre los valores ($p<0,01$).

Se observó que tanto el β-caroteno como la luteína eran más abundantes en el brócoli (0,77 y 0,56 mg/100 g pf, respectivamente) que en la col de Milán (0,34 y 0,17 mg/100 g peso fresco, respectivamente), con diferencias significativas, presentando el brócoli un 56% más de β-caroteno y un 70% más de luteína que la col de Milán.

El contenido de carotenoides totales fue mayor en brócoli 'Parthenon', con un valor de 1,33 mg β-caroteno/100 g pf, frente a la col de Milán 'Dama', 0,51 mg β-caroteno/100 g pf, teniendo el brócoli aproximadamente un 62% más de carotenoides totales que la col de Milán (Tabla 4.16). Los datos obtenidos para estos compuestos estuvieron en el rango de concentraciones encontradas por otros autores (Murkovic et al., 2000; Sing et al., 2007; Fernández-León et al., 2014).

4.2.1.3. Clorofilas

El contenido de pigmentos clorofílicos en las brassicas estudiadas se muestra en la Tabla 4.9.

La clorofila A y la clorofila B son componentes genuinos de las membranas fotosintéticas y están presentes en una proporción 3:1 (Chen y Chen, 1993), como se observó en este estudio. La relación clorofila A:clorofila B puede variar debido a las condiciones de cultivo y ambientales (Lichtenthaler et al., 1982), y esta relación se considera un parámetro de calidad para las hortalizas verdes, como son las dos brassicas objeto de estudio.

La clorofila A fue el pigmento mayoritario, con valores de 8,79 mg clorofila A/100 g pf para brócoli y 2,17 mg clorofila A/100 g pf para col de Milán, diferenciándose significativamente, siendo en brócoli aproximadamente un 75% superior que en col de Milán (Tabla 4.16).

La clorofila B fue el pigmento clorofílico minoritario, siendo su contenido mayor en brócoli (3,02 mg clorofila B/100 g pf) que en col de Milán (0,82 mg clorofila B/100 g pf), en una proporción aproximada del 73% (Tabla 4.16).

Tabla 4.9. Contenido de clorofila A, clorofila B y contenido clorofílico total en brócoli 'Parthenon' y col de Milán 'Dama'.

	MUESTRAS		
	Brócoli	**Col de Milán**	**Significación**
[1]Clorofila A	8,79±1,90	2,17±0,29	**
[2]Clorofila B	3,02±0,50	0,82±0,08	**
[1]Clorofila Total	11,81±1,6	2,99±0,37	**

[1] Expresado como mg clorofila A/100 g peso fresco.
[2] Expresado como mg clorofila B/100 g peso fresco.
Media±Desviación estándar, n=6.
(**) existen diferencias significativas entre los valores ($p<0,01$).

Al ser la clorofila A el pigmento mayoritario, el contenido clorofílico total se expresó como mg clorofila A/100 g pf. Los resultados obtenidos fueron similares a los encontrados por nuestro grupo en estudios anteriores (García et al., 2005; Fernández-León et al., 2010; Fernández-León et al., 2014). Puede afirmarse que el brócoli presenta aproximadamente un 75% más de clorofilas totales que la col de Milán (Tabla 4.16).

4.2.1.4. Compuestos fenólicos

El contenido fenólico total en el brócoli y la col de Milán estudiados se muestran en la Tabla 4.10, expresándose los resultados en mg ác. clorogénico equivalente/100 g peso fresco (pf).

Se observó que dicho contenido era mayor en el brócoli que en la col de Milán (140,22 y 98,61 mg ác. clorogénico equivalente/100 g pf, respectivamente), como anteriormente ha sido referido por otros autores (Wu et al., 2004; Bernalte et al., 2007; Koh et al., 2009). Esta diferencia puede estar influenciada, además de por el tipo de brassica, por factores como las condiciones edafoclimáticas o madurez en la cosecha, así como por el método de preparación de las muestras (Singh et al., 2007), debido a que los compuestos fenólicos son especies altamente reactivas.

En la Tabla 4.10 también se muestran los valores del contenido total de ácidos fenólicos y de flavonoles, siendo ambos significativamente mayores en brócoli.

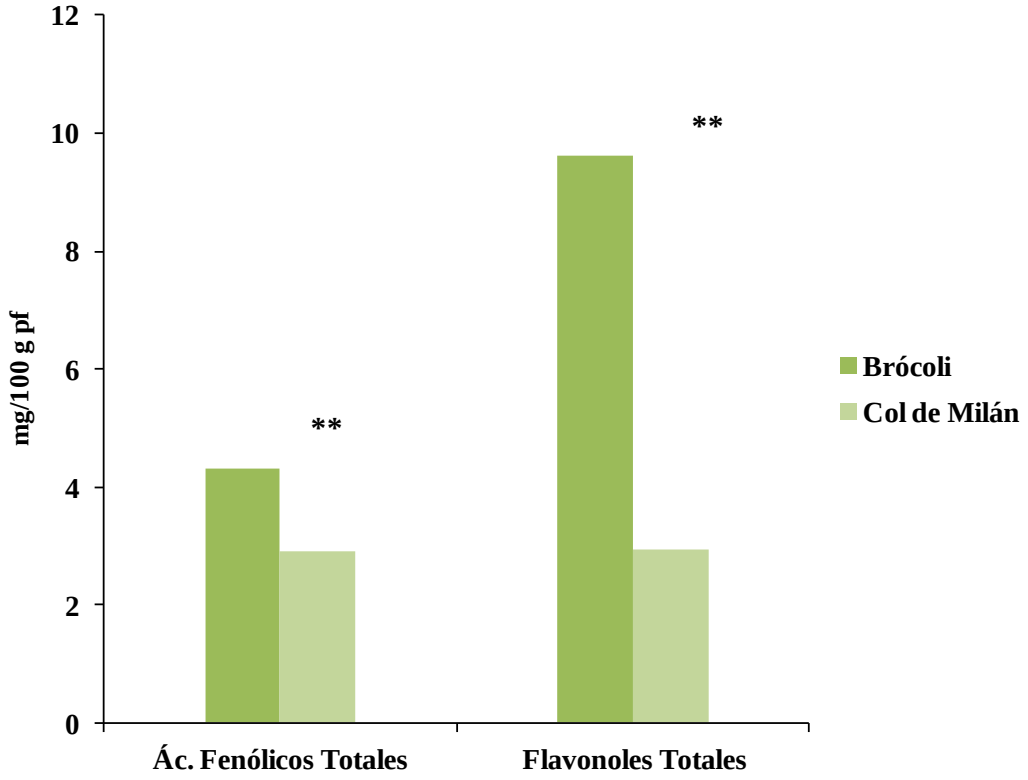
Tabla 4.10. Contenido fenólico total, de ác. fenólicos totales y flavonoles totales en brócoli ‘Parthenon’ y col de Milán ‘Dama’.

	MUESTRAS		
	Brócoli	**Col de Milán**	**Significación**
[1]Contenido Fenólico Total	140,22±6,92	98,61±7,45	**
[2]Ác. Fenólicos Totales	4,32±0,07	2,91±0,07	**
[2]Flavonoles Totales	9,61±0,26	2,95±0,10	**

[1] Expresado como mg ác. clorogénico equivalente/100 g peso fresco.
[2] Expresado como mg/100 g peso fresco.
Media±Desviación estándar, n=6.
(**) existen diferencias significativas entre los valores ($p<0,01$).

Los compuestos fenólicos se dividen en dos grandes grupos, no flavonoides y flavonoides, en el primer grupo se encuentran los ácidos fenólicos y en el segundo los flavonoles (Gimeno Creus, 2004).

El brócoli presentó mayor contenido total en ácidos fenólicos y flavonoles con valores de 4,32 mg/100 g pf y 9,61 mg/100 g pf respectivamente, siendo significativamente diferentes a los valores que se obtuvieron para col de Milán (Figura 4.1). El brócoli 'Parthenon' presentó mayor contenido de flavonoles totales que de ácidos fenólicos totales, mientras que para la col de Milán los valores obtenidos de ácidos fenólicos y flavonoles fueron muy similares, siendo próximos a 3 mg/100 g pf.



(**) existen diferencias significativas entre los valores (p<0,01).

Figura 4.1. Contenido total de ác. fenólicos y flavonoles en brócoli 'Parthenon' y col de Milán 'Dama'.

En el brócoli el contenido en ácidos fenólicos fue un 33% superior y el de flavonoles fue aproximadamente un 70% más que en la col de Milán (Tabla 4.16).

Con respecto a los compuestos fenólicos individuales, dentro del grupo de ácidos fenólicos se detectaron tres ácidos (ác. gálico, ác. clorogénico y ác. sinápico) y dos flavonoles (quercetina y kaempferol) (Tabla 4.11). En las dos brassicas objeto de estudio se observó que el contenido en cada uno de los compuestos fenólicos y flavonoles individuales fue significativamente mayor para brócoli que para col de Milán, excepto el ác. sinápico que presentó una concentración mayor en col de Milán. Las concentraciones de los ácidos fenólicos y flavonoles obtenidas, para las muestras de brassicas estudiadas, fueron similares a las encontradas por USDA/ARS (2007) y por otros autores (Vallejo et al., 2003c; Vallejo et al., 2003d; Koh et al., 2009).

Tabla 4.11. Contenido de ác. fenólicos individuales y flavonoles individuales en brócoli 'Parthenon' y col de Milán 'Dama'.

		MUESTRAS		
		Brócoli	**Col de Milán**	**Significación**
Ácidos Fenólicos	**[1]Ác. Gálico**	1,26±0,06	0,69±0,06	**
	[2]Ác. Clorogénico	1,83±0,04	0,94±0,06	**
	[3]Ác. Sinápico	1,23±0,04	1,28±0,04	*
Flavonoles	**[4]Quercetina**	6,42±0,25	1,19±0,05	**
	[5]Kaempferol	3,19±0,08	1,75±0,06	**

[1] Expresado como mg ác. gálico/100 g peso fresco.
[2] Expresado como mg ác. clorogénico/100 g peso fresco.
[3] Expresado como mg ác. sinápico/100 g peso fresco.
[4] Expresado como mg quercetina/100 g peso fresco.
[5] Expresado como mg kaempferol/100 g peso fresco.
Media±Desviación estándar, n=6.
(*) existen diferencias significativas entre los valores ($p<0,05$).
(**) existen diferencias significativas entre los valores ($p<0,01$).

Dentro del grupo de ácidos fenólicos individuales, fue el ácido clorogénico el que mayor valor presentó para brócoli (1,83 mg ác. clorogénico/100 g pf), mientras que para col de Milán fue el ácido sinápico, con una concentración de 1,28 mg ác. sinápico/100 pf. En brócoli el principal ácido fenólico fue el ác. clorogénico, seguido del ác. gálico y por último el ác. sinápico. Sin embargo en col de Milán fue el ác. sinápico el principal, luego el ác. clorogénico y por último el ác. gálico, todos ellos de concentraciones significativamente diferentes.

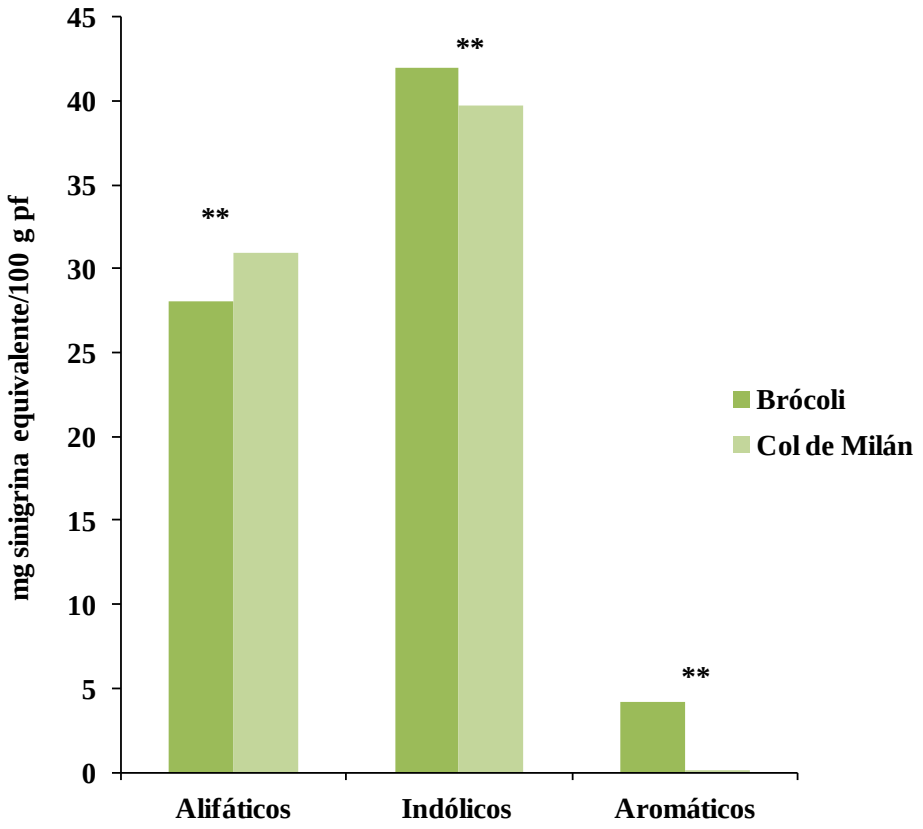
Para el grupo de los flavonoles, al analizar los compuestos individuales, también fue en brócoli donde se encontraron mayores concentraciones de todos ellos, siendo el mayoritario la quercetina, cuya concentración fue aproximadamente un 81% superior que en col de Milán (Tabla 4.11). Mientras que el flavonol individual mayoritario para col de Milán fue el kaempferol, cuya concentración fue un 32% superior a la de la quercetina en esta misma brassica.

De todos los compuestos fenólicos individuales detectados, fue el flavonol quercetina el que mayor concentración presentó en brócoli 'Parthenon', al igual que en otros trabajos (Fernández-León et al., 2012) y para col de Milán 'Dama' el compuesto fenólico individual mayoritario fue el flavonol kaempferol (Martínez et al., 2010).

4.2.1.5. Glucosinolatos intactos

Los glucosinolatos encontrados en ambos tipos de brassicas se clasificaron teniendo en cuenta su estructura química, y los valores obtenidos (Tabla 4.12) fueron expresados en mg de sinigrina equivalente/100 g de peso fresco (pf).

Se observó que el contenido total de glucosinolatos fue mayor en el brócoli 'Parthenon' (74,24 mg sinigrina equivalentes/100 g pf) que en la col de Milán 'Dama' (70,77 mg sinigrina equivales/100 g pf). Resultados similares se obtuvieron para el contenido total de glucosinolatos indólicos y aromáticos, siendo respectivamente un 5% y un 99% mayor en el brócoli que en la col de Milán (Tabla 4.17). Sin embargo, este comportamiento no se mantuvo en el caso de los glucosinolatos alifáticos, cuya concentración resultó ser aproximadamente un 9% mayor en la col de Milán que en el brócoli (Figura 4.2).

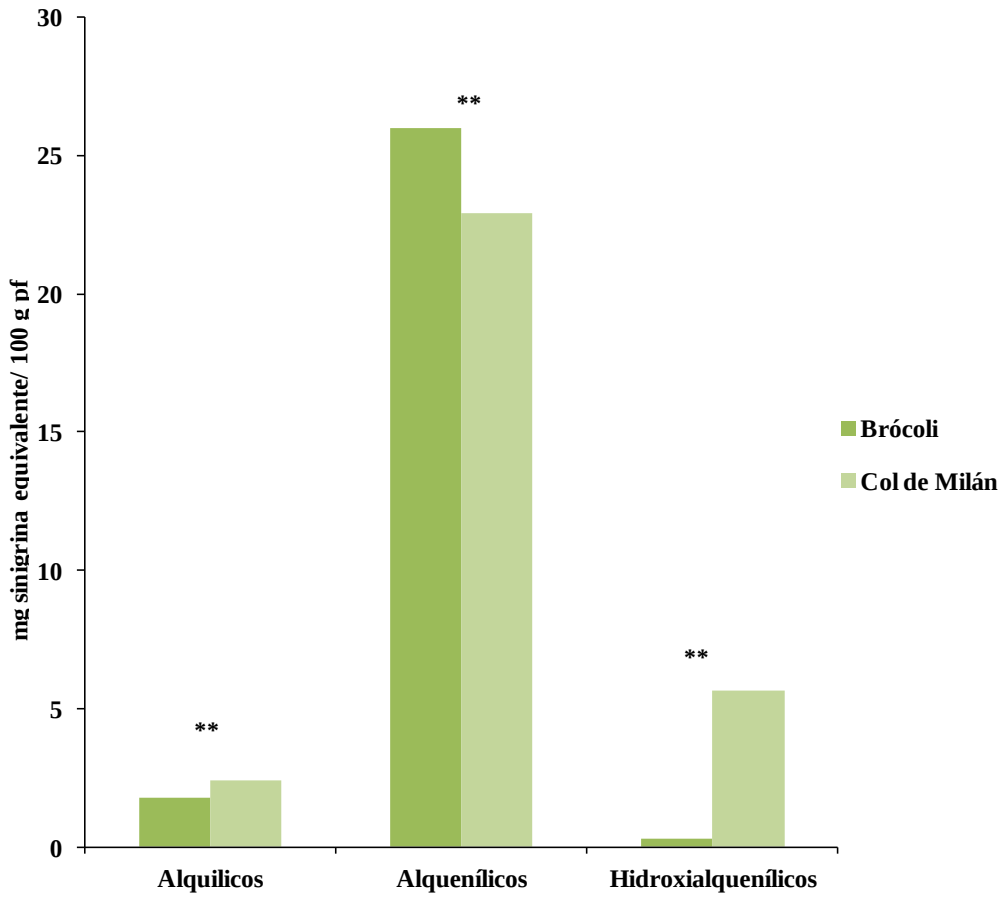


(**) existen diferencias significativas entre los valores (p<0,01).

Figura 4.2. Contenido de los tres grupos de glucosinolatos estudiados en brócoli 'Parthenon' y col de Milán 'Dama'.

Como ya se ha comentado anteriormente, el contenido total de glucosinolatos alifáticos (Tabla 4.12) fue mayor para col de Milán 'Dama' (30,98 mg sinigrina equivalente/100 g pf) que para brócoli 'Parthenon' (28,09 mg sinigrina equivalente/100 g pf), aunque dentro de esta familia se observaron comportamientos diferentes para los distintos conjuntos de compuestos identificados (Figura 4.3).

En el caso de los GS alifáticos (Tabla 4.12) para los grupos alquílico e hidroxialquenílico se encontró un mayor contenido en col de Milán que en brócoli, mientras que para el grupo de alquenílicos sucedió lo contrario, siendo las concentraciones de estos compuestos para las dos brassicas estudiadas significativamente diferentes (Figura 4.3).



(**) existen diferencias significativas entre los valores (p<0,01).

Figura 4.3. Contenido de los tres grupos de glucosinolatos alifáticos estudiados en brócoli 'Parthenon' y col de Milán 'Dama'.

En los GS alquílicos se observó que el contenido de glucorafanina (precursor del sulforafano) fue mayor en brócoli que en col de Milán, sin embargo, la concentración de glucoiberina y de glucoalisina fue mayor en col de Milán (Tabla 4.12).

Para los GS alquenílicos, el contenido de sinigrina, GS precursor del alil isotiocianato, fue mayor en col de Milán, mientras que los de gluconapina y de glucobrasicanapina fueron mayores en brócoli, con valores 5,86 mg sinigrina equivalente/100 g pf y 19,89 mg sinigrina equivalente/100 g pf, respectivamente.

El único GS identificado dentro del grupo de los GS alifáticos hidroxialquenílicos fue la progoitrina (precursor del crambeno), con un contenido significativamente mayor en col de Milán (5,67 mg sinigrina equivalente/100 g pf).

Tabla 4.12. Contenido en glucosinolatos (GS) intactos en brócoli 'Parthenon' y col de Milán 'Dama'.

		MUESTRAS		
		Brócoli	**Col de Milán**	**Significación**
[1]GS Totales		**74,24±0,82**	**70,77±0,91**	******
[1]Alifáticos				
Alquílicos	Glucorafanina	1,24±0,13	0,19±0,01	**
	Glucoiberina	0,26±0,01	1,49±0,03	**
	Glucoalisina	0,30±0,01	0,73±0,01	**
Alquenílicos	Sinigrina	0,26±0,01	3,06±0,06	**
	Gluconapina	5,86±0,09	3,64±0,02	**
	Glucobrasicanapina	19,89±0,16	16,19±0,47	**
Hidroxialquenílicos	Progoitrina	0,28±0,01	5,67±0,05	**
Totales		**28,09±0,25**	**30,98±0,59**	******
[1]Indólicos				
	Glucobrasicina	39,01±0,48	25,90±0,42	******
	4-Metoxiglucobrasicina	2,73±0,15	5,01±0,05	******
	Neoglucobrasicina	0,19±0,01	8,86±0,08	******
Totales		**41,93±0,60**	**39,77±0,48**	******
[1]Aromáticos				
	Gluconasturtina	4,23±0,07	0,02±0,01	******

[1] Expresado como mg sinigrina equivalente/100 g peso fresco.
Media±Desviación estándar, n=6.
(**) existen diferencias significativas entre los valores ($p<0,01$).

El GS alifático mayoritario para las dos brassicas estudiadas fue glucobrasicanapina, siendo su contenido aproximadamente un 19% mayor en brócoli que en col de Milán.

En los GS indólicos (Tabla 4.12) se observó que el contenido total fue mayor en el brócoli 'Pathenon' que en la col de Milán 'Dama' (41,93 y 39,77 mg sinigrina equivalente/100 g pf, respectivamente). El GS indólico glucobrasicina (precursor del indol-3-carbinol) fue el más abundante en las brassicas estudiadas, siendo su concentración mayor en brócoli (39,01 mg sinigrina equivalente/100 g pf). Por el contrario, los otros dos GS de este grupo detectados, 4-metoxiglucobrasicina y neoglucobrasicina, fueron más abundantes en col de Milán, aproximadamente un 46% y 98%, respectivamente.

La glucobrasicina es el glucosinolato mayoritario en todas las especies de *Brassica oleracea*, variando su contenido entre el 10% y el 65% del total de glucosinolatos dependiendo del cultivar (Ciska et al., 2000). En este estudio, el contenido de glucobrasicina representó aproximadamente el 53% del contenido total de GS en brócoli 'Parthenon', y el 37% en col de Milán.

El único glucosinolato aromático identificado fue la gluconasturtina (precursor del fenetil isotiocianato), cuya concentración fue aproximadamente un 99% superior mayor en brócoli que en col de Milán (Tabla 4.12).

Los resultados obtenidos para el contenido de glucosinolatos totales en brócoli y col de Milán son similares a los referidos por otros autores (Kushad et al., 1999; Vallejo et al., 2002; Tian et al., 2005; Fernández-León et al., 2012).

Por último, referir que el contenido de glusosinolatos en el género *brassica* es altamente variable y depende del cultivar así como de las diferentes condiciones agroclimáticas, de conservación, de preparación, que también afectan a los demás compuestos funcionales (Kushad et al., 1999; Ciska et al., 2000; Fahey et al., 2001).

4.2.1.6. Actividad antioxidante total (AAT)

Los compuestos con actividad antioxidante están implicados en la neutralización de los radicales libres, que son los causantes del daño oxidativo a proteínas, lípidos y

ácidos nucleicos, desempeñando una función de prevención de enfermedades degenerativas (Pineda Alonso et al., 1999).

En la Tabla 4.13 se muestran los valores de actividad antioxidante total para brócoli 'Parthenon' y col de Milán 'Dama', que fueron similares a los obtenidos por otros autores para brócoli (Fernández-León et al., 2012) y col de Milán (Podsedek et al., 2006).

Tabla 4.13. Contenido de la actividad antioxidante total (AAT) en brócoli 'Parthenon' y col de Milán 'Dama'.

	MUESTRAS		
	Brócoli	**Col de Milán**	**Significación**
AAT	231,70±2,92	130,59±15,06	**

[1] Expresado como mg Trolox/100 g peso fresco.
Media±Desviación estándar, n=6.
(**) existen diferencias significativas entre los valores ($p<0,01$).

Los resultados se expresaron en mg de Trolox/100 g pf, siendo el valor de actividad antioxidante total un 44% mayor para brócoli que para col de Milán (231,70 y 130,59 mg Trolox/100 g pf, respectivamente). Esto se debe fundamentalmente a que el contenido en compuestos funcionales totales fue también superior en el brócoli que en col de Milán (Tablas 4.16 y 4.17), estando muy relacionados la actividad antioxidante total y el contenido en compuestos funcionales (Podsedek, 2007).

4.2.1.7. Correlación entre los diferentes parámetros estudiados y la actividad antioxidantes total (AAT)

En las Tablas 4.14 y 4.15 se muestran las correlaciones, mediante el test de Pearson, entre los parámetros estudiados y la actividad antioxidante total (AAT) para las dos brassicas estudiadas.

Vitamina C

La vitamina C, constituida por el ácido ascórbico y su producto de oxidación, el ácido deshidroascórbico, tiene muchas funciones biológicas en el cuerpo humano. Block et al. (2004) encontraron que la vitamina C puede reducir los niveles de la proteína C

reactiva (CRP), un marcador de la inflamación y posible indicador de enfermedades cardiovasculares. Más del 85% de la vitamina C consumida en la dieta humana procede de frutas y hortalizas (Lee y Kader, 2000). El consumo de hortalizas del género *Brassica* está asociado con una menor incidencia y mortalidad por diferentes enfermedades crónicas (Hughes y Ong, 1998).

De acuerdo con el test de Pearson la vitamina C y la AAT están altamente correlacionadas en ambas brassicas ($r \approx 0,9$ $p<0,01$) (Tabla 4.14). El ácido ascórbico es el componente mayoritario de la vitamina C y también se encontró una alta correlación con la AAT ($r=0,996$ y 0,964 para brócoli y col de Milán, respectivamente, $p<0,01$). Otros autores también encontraron esta alta correlación, comprobando que el ácido ascórbico era un cofactor enzimático que actúa evitando la oxidación celular y capaz de regenerar el α-tocoferol (Davey et al., 2000). Para el otro componente de la vitamina C, ácido dehidroascórbico, se encontró una baja correlación con la AAT para las dos brassicas ($r \approx 0,5$ $p<0,05$), esto lo explican estudios que aseguran que es la especie menos reactiva y bioactiva de la vitamina C (Davey et al., 2000; Podsedek, 2007).

Carotenoides

Los carotenoides (carotenos y xantofilas) son de color amarillo, naranja y rojo, y son pigmentos que están presentes en frutas y hortalizas. Los pigmentos carotenoides son antioxidantes naturales lipofílicos y existe, por lo tanto, una gran correlación entre el contenido total de estos compuestos y el valor de actividad antioxidante (Podsedek, 2007), como se observa en la Tabla 4.14. La importancia de estos compuestos en la dieta radica en que no somos capaces de sintetizarlos, por lo que debemos incorporarlos mediante la alimentación.

Los dos carotenoides estudiados, β-caroteno y luteína, son pigmentos que protegen a las membranas celulares de los radicales libres (Singh et al., 2007), existiendo una alta correlación de estos dos pigmentos con la AAT y observándose una mayor correlación en el brócoli ($r \approx 0,9$ $p<0,01$) que en la col de Milán (($r \approx 0,8$ $p<0,01$).

El β-caroteno es un precursor de la vitamina A, y es un captador de radicales libre gracias a sus enlaces conjugados. Una baja ingesta de este pigmento se ha relacionado con tasas más altas de cáncer y enfermedades cardiovasculares, así como un

mayor riesgo de infarto de miocardio entre los fumadores (Rice-Evans et al., 1997). La luteína no es transformada en retinol, pero se ha relacionado con una reducción de la degeneración de la mácula ocular y también evita la progresión de las cataratas (Bone et al., 1997; Singh et al., 2006).

Clorofilas

Las clorofilas son los pigmentos mayoritarios en los vegetales y, como se puede observar en la Tabla 4.14, existe una elevada correlación entre el contenido de estos pigmentos y la actividad antioxidante encontrada en las dos brassicas estudiadas ($r \approx 0,9$ $p<0,01$, para brócoli; y $r \approx 0,8$ $p<0,01$, para col de Milán) como ha sido puesto de manifiesto por otros autores (Lai et al., 1980; Fernández-León et al., 2012).

Los estudios realizados por Lai y colaboradores en 1980 ya demostraron una relación entre la actividad antimutagénica y antioxidante y el contenido de clorofila de una serie de extractos vegetales comunes. Diferentes autores indicaron que la clorofila A (clorofila mayoritaria) es más eficaz contra los radicales libres que la clorofila B (Lai et al., 1980; Ferruzzi et al., 2002).

Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos poseen diferentes actividades biológicas, pero las más importantes son la actividad antioxidante, el efecto protector capilar y el efecto inhibidor en diversas etapas de tumores (Kuntz et al., 1999; Czeczot, 2000). Los compuestos fenólicos son capaces de reaccionar con las especies reactivas del oxígeno, debido a sus propiedades de donadores de electrones. En muchos estudios *in vitro*, estos compuestos han demostrado una mayor actividad antioxidante que las vitaminas y los carotenoides (Vinson et al., 1995; Re et al., 1999).

Como se puede observar en la Tabla 4.14, existe una gran correlación entre el contenido en fenoles totales y el valor de actividad antioxidante para las brassicas estudiadas ($r \approx 0,9$ $p<0,01$). Esto es debido a que los fenoles son los compuestos funcionales más abundantes en las brassicas y por tanto tienen una gran contribución a la capacidad antioxidante total (Podsedek, 2007).

Tabla 4.14. Correlaciones entre los diferentes parámetros estudiados y la actividad antioxidante total (AAT), mediante el test de Pearson, para las dos brassicas.

	MUESTRAS	
	Brócoli	**Col de Milán**
	Correlación de Pearson	
Parámetros	**AAT**	
Vitamina C	0,978(**)	0,941(**)
Ác. Ascórbico	0,996(**)	0,964(**)
Ác. Dehidroascórbico	0,590(*)	0,548(*)
Carotenos Totales	0,996(**)	0,837(**)
β-caroteno	0,992(**)	0,826(**)
Luteína	0,997(**)	0,846(**)
Clorofila Total	0,947(**)	0,813(**)
Clorofila A	0,948(**)	0,846**)
Clorofila B	0,944(**)	0,799(**)
Contenido Fenólico Total	0,991(**)	0,931(**)
Ác. Fenólicos Totales	0,997(**)	0,951(**)
Ác. Gálico	0,990(**)	0,952(**)
Ác. Clorogénico	0,997(**)	0,834(**)
Ác. Sinápico	0,789(**)	0,966(**)
Flavonoles Totales	0,998(**)	0,994(**)
Quercetina	0,996(**)	0,956(**)
Kaempferol	0,998(**)	0,934(**)

(*) La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral).
(**) La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

Los compuestos fenólicos se dividen en ácidos fenólicos y flavonoles, ambos grupos tienen una alta correlación con la AAT ($r \approx 0,9$ $p<0,01$). Dentro de los ácidos fenólicos, para el ácido clorogénico, minoritario en col de Milán, y para el ácido sinápico (minoritario en brócoli) se obtuvieron correlaciones de $r \approx 0,8$ $p<0,01$ (Tabla 4.14).

Hay que destacar el elevado contenido en compuestos flavonoides (quercetina y kaempferol fundamentalmente) en las dos brassicas estudiadas. Dichos compuestos fenólicos, según autores como Podsedek (2007), poseen una gran capacidad antioxidante, y por tanto la correlación encontrada entre ellos y la actividad antioxidante fue elevada para ambas brassicas, $r \approx 0,9$ $p<0,01$ (Tabla 4.14), como ya había sido puesto de manifiesto por otros autores (Ou et al., 2002; Wu et al., 2004; Podsedek, 2007; Fernández-León et al., 2011a).

Glucosinolatos

Finalmente en la Tabla 4.15 se muestran los datos de las correlaciones de Pearson entre el valor de actividad antioxidante y el contenido de glucosinolatos (GS) para las dos brassicas estudiadas. Se observó una elevada correlación ($r \approx 0,9$ $p<0,01$), como cabía esperar, ya que una característica importante de los glucosinolatos es su capacidad antioxidante (Moreno et al., 2006; Verkerk et al., 2009).

Hay que señalar que, de los tres grupos en los que se han clasificado los glucosinolatos, los alifáticos totales fueron los que presentaron menor correlación con la AAT ($r \approx 0,8$ $p<0,01$), sin embargo los GS alifáticos individuales presentaron correlaciones de $r \approx 0,9$ $p<0,01$, para ambas brassicas.

En las dos brassicas el glucosinolato mayoritario fue el GS indólico glucobrasicina, que presentó una alta correlación con la AA ($r \approx 0,9$ $p<0,01$).

Por último el GS gluconasturtina, que fue el único glucosinolato aromático detectado en brócoli y col de Milán, tuvo una también una alta correlación con la AAT ($r \approx 0,9$ $p<0,01$).

Tabla 4.15. Correlaciones entre los diferentes glucosinolatos intactos estudiados y la actividad antioxidante total (AAT) mediante el test de Pearson, para las dos brassicas.

		MUESTRAS	
		Brócoli	**Col de Milán**
		Correlación de Pearson	
Parámetros		**AAT**	
Glucosinolatos Totales		0,989(**)	0,947(**)
Alifáticos Totales		0,843(**)	0,862(**)
Alquílicos	Glucorafanina	0,961(**)	0,957(**)
	Glucoiberina	0,988(**)	0,941(**)
	Glucoalisina	0,989(**)	0,945(**)
Alquenílicos	Sinigrina	0,982(**)	0,943(**)
	Gluconapina	0,980(**)	0,947(**)
	Glucobrasicanapina	0,998(**)	0,991(**)
Hidroxialquenílicos	Progoitrina	0,994(**)	0,948(**)
Indólicos Totales		0,992(**)	0,949(**)
	Glucobrasicina	0,989(**)	0,950(**)
	4-Metilglucobrasicina	0,992(**)	0,944(**)
	Neoglucobrasicina	0,989(**)	0,949(**)
Arómaticos Totales		0,982(**)	0,947(**)
	Gluconasturtina	0,982(**)	0,947(**)

(**) La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

4.2.1.8. Cuadros resumen de la composición funcional de las brassicas estudiadas

En las Tablas 4.16 y 4.17 se muestra de forma resumida la comparación entre las dos brassicas estudiadas, teniendo en cuenta su contenido en compuestos funcionales y su valor de actividad antioxidante total.

Tabla 4.16. Tabla de comparación de los parámetros funcionales estudiados.

	MUESTRAS	
Parámetros	**Brócoli**	**Col de Milán**
Vitamina C	+	
Ác. Ascórbico	+	
Ác. Dehidroascórbico	=	=
Carotenos Totales	+	
β-caroteno	+	
Luteína	+	
Clorofila Total	+	
Clorofila A	+	
Clorofila B	+	
Contenido Fenólico Total	+	
Ác. Fenólicos Totales	+	
Ác. Gálico	+	
Ác. Clorogénico	+	
Ác. Sinápico		+
Flavonoles Totales	+	
Quercetina	+	
Kaempferol	+	
AAT	+	

(+) Mayor contenido
(=) Igual contenido

Tabla 4.17. Tabla de comparación de los glucosinolatos estudiados.

		MUESTRAS	
Parámetros		**Brócoli**	**Col de Milán**
Glucosinolatos Totales		+	
Alifáticos Totales			+
Alquílicos	Glucorafanina	+	
	Glucoiberina		+
	Glucoalisina		+
Alquenílicos	Sinigrina		+
	Gluconapina	+	
	Glucobrasicanapina	+	
Hidroxialquenílicos	Progoitrina		+
Indólicos Totales		+	
	Glucobrasicina	+	
	4-Metilglucobrasicina		+
	Neoglucobrasicina		+
Arómaticos			
	Gluconasturtina	+	

(+) Mayor contenido

Como puede observarse en dichas tablas, el brócoli presenta un mayor contenido en compuestos funcionales que la col de Milán, y, por tanto, mayor actividad antioxidante. Como consecuencia de ello, la capacidad funcional del brócoli es mayor que la de la col de Milán, así como su valor añadido.

4.2.2. Biodisponibilidad y bioactividad tras la digestión in vitro

La actividad biológica *in vitro* de cualquier compuesto funcional o bioactivo siempre vendrá condicionada inequívocamente por su estabilidad digestiva, la extensión de su absorción y el metabolismo sufrido. Por lo tanto, los estudios de biodisponibilidad y metabolismo resultan fundamentales para el conocimiento de las concentraciones a las que dichos compuestos son biodisponibles y ejercen su actividad biológica (Kroon et al., 2004).

Así, se hizo un estudio de digestión *in vitro* de los dos tipos de brassicas, como se detalló en Materiales y Métodos, para conocer el efecto que produce sobre los compuestos bioactivos estudiados.

4.2.2.1. Contenido biodisponible de vitamina C. Porcentaje de biodisponibilidad

En la Tabla 4.18 se muestran los valores del contenido de ác. ascórbico, ác. dehidroascórbico y vitamina C en la fracción biodisponible de las dos brassicas en estudio, brócoli 'Parthenon' y col de Milán 'Dama', después de la digestión *in vitro*.

Tabla 4.18. Media y desviación estándar del contenido del ác. ascórbico, ác. dehidroascórbico y vitamina C en la fracción biodisponible de brócoli 'Parthenon' y col de Milán 'Dama'.

	MUESTRAS		
	Brócoli	**Col de Milán**	**Significación**
[1]Ác. Ascórbico	17,06±1,01	11,16±0,61	**
[2]Ác. Dehidroascórbico	3,60±0,11	3,94±0,18	**
[1]Vitamina C	20,66±0,94	15,10±0,69	**

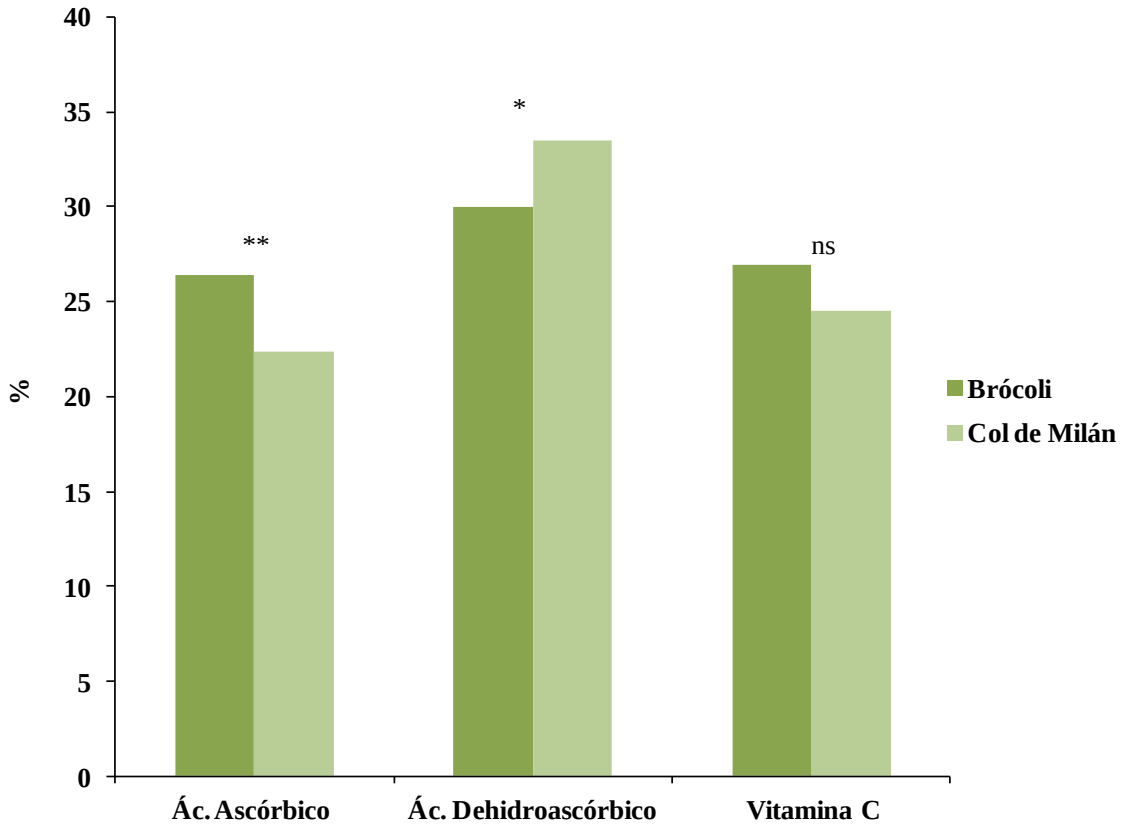
[1] Expresado como mg ác. ascórbico/100 g peso fresco.
[2] Expresado como mg ác. dehidroascórbico/100 g peso fresco.
Media±Desviación estándar, n=6.
(**) existen diferencias significativas entre los valores ($p<0,01$).

En brócoli, el contenido de ác. ascórbico y vitamina C (suma del contenido de ác. ascórbico y ác. dehidroascórbico) en la fracción biodisponible fue de 17,06 y 20,66

mg ác. ascórbico/100 g peso fresco (pf) respectivamente, concentraciones superiores a las obtenidas para col de Milán (11,16 y 15,10 mg ác. ascórbico/100 g pf, respectivamente) y siendo estos valores significativamente diferentes entre ellos.

Por el contrario el contenido biodisponible de ác. dehidroascórbico fue significativamente mayor en col de Milán.

En la Figura 4.4 se presentan los porcentajes de biodisponibilidad, es decir tras el proceso de digestión, del ác. ascórbico, ác. dehidroascórbico y vitamina C en brócoli y col de Milán. Los porcentajes de ác. ascórbico y ác. dehidroascórbico fueron significativamente diferentes entre las dos brassicas en estudio, mientras que para el porcentaje de vitamina C no se encontraron diferencias significativas.



(ns) no existen diferencias significativas entre muestras.
(*) existen diferencias significativas entre los valores ($p<0,05$).
(**) existen diferencias significativas entre los valores ($p<0,01$).

Figura 4.4. Porcentaje de biodisponibilidad del ác. ascórbico, ác. dehidroascórbico y vitamina C en brócoli 'Parthenon' y col de Milán 'Dama'.

Se observó una reducción en torno al 70-80% de estos compuestos después de la digestión gastrointestinal *in vitro*, respecto al producto intacto, resultados muy similares a los encontrados por otros autores (Pérez-Vicente et al., 2002; Vallejo et al., 2004).

Esta pérdida se puede deber a las diferencias de pH de los diferentes medios utilizados para simular la digestión y a la presencia de oxígeno. En soluciones acuosas el ác. ascórbico tiene una alta afinidad por el oxígeno, oxidándose fácilmente para dar ác. dehidroascórbico, una reacción que es catalizada por iones metálicos. El ác. dehidroascórbico se puede transformar otra vez en ác. ascórbico, pero en presencia de oxígeno es irreversible la reacción, siendo degradado a ác. 2,3- dicetogulónico (Huelin et al., 1971).

La forma oxidada del ác. ascórbico, ác. dehidroascórbico, se absorbe mejor, ya que a pH fisiológico no se encuentra ionizado, es menos hidrófilo y, por tanto, es capaz de atravesar mejor las membranas celulares. Esta es la razón por la que el porcentaje de biodisponiblidad del ác. dehidroascórbico es superior al del ác. ascórbico para ambas brassicas estudiadas (Figura 4.4).

Con los resultados obtenidos para el contenido de vitamina C biodisponible, se puede decir que la absorción es baja, con lo que el aporte real estaría por debajo de la dosis diaria recomendada, que para hombre es de 90 mg y para mujer de 75 mg por día (Dietary Reference Intake, 2000), debiéndose compensar con la ingesta de otros alimentos ricos también en vitamina C.

Además, los resultados obtenidos por Yung et al. (1982) indicaron que la absorción del ác. ascórbico es incompleta después de la ingestión oral y que hay una considerable variación interindividual en el grado de absorción. La edad y los hábitos de los consumidores son otras causas que influyen en el factor de absorción (Brubacher et al., 2000). Así, en niños y embarazadas se recomiendan cantidades mayores de 75-90 mg vitamina C/día y para los fumadores unos 35 mg adicionales (Dietary Reference Intake, 2000).

4.2.2.2. Contenido biodisponible de carotenoides. Porcentaje de biodisponibilidad

Los valores de los diferentes carotenoides, así como del contenido total, presentes en la fracción biodisponible de las dos brassicas estudiadas se muestran en la Tabla 4.19, expresados como mg /100 g peso fresco (pf).

Los compuestos carotenoides, β-caroteno y luteína, presentaron valores de biodisponibilidad significativamente superiores en brócoli que en col de Milán, al igual que el contenido total de carotenoides.

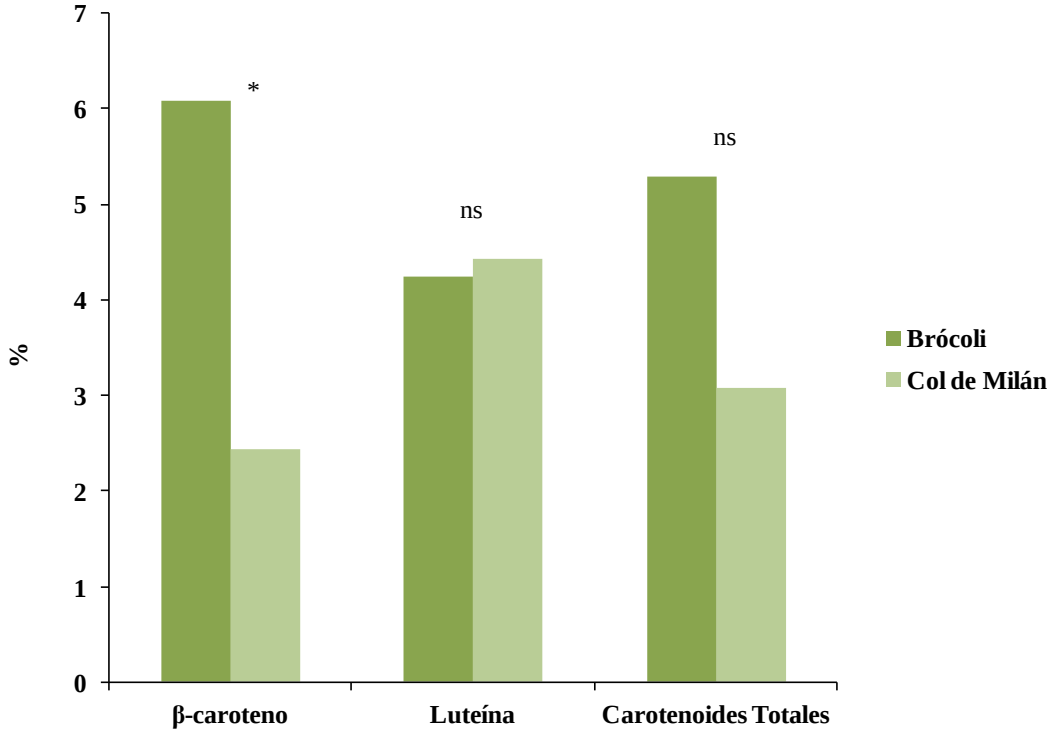
De los dos carotenoides identificados, fue el β-caroteno el que mayor contenido biodisponible presentó después de la digestión *in vitro* para brócoli (0,05 mg β-caroteno/100 g pf). Para col de Milán se obtuvieron contenidos biodisponibles similares para ambos carotenoides (0,01 mg/100 g pf).

Tabla 4.19. Media y desviación estándar del contenido de β-caroteno, luteína y carotenoides totales en la fracción biodisponible de brócoli 'Parthenon' y col de Milán 'Dama'.

	MUESTRAS		
	Brócoli	**Col de Milán**	**Significación**
[1]β-caroteno	0,05±0,03	0,01±0,004	*
[2]Luteína	0,03±0,01	0,01±0,003	*
[1]Carotenoides Totales	0,08±0,04	0,02±0,01	*

[1] Expresado como mg β-caroteno/100 g peso fresco.
[2] Expresado como mg luteína/100 g peso fresco.
Media±Desviación estándar, n=6.
(*) existen diferencias significativas entre los valores ($p<0,05$).

En la Figura 4.5 se representan los porcentajes de biodisponibilidad del β-caroteno, luteína y carotenoides totales de brócoli y col de Milán. Como se observa no existen diferencias significativas, entre las dos brassicas, en el porcentaje de biodisponibilidad de luteína y carotenoides totales. Aunque se parta de un mayor contenido inicial en brócoli, el porcentaje de biodisponibilidad es estadísticamente semejante para ambas matrices.



(*) existen diferencias significativas entre los valores (p<0,05).
(ns) no existen diferencias significativas entre muestras.

Figura 4.5. Porcentaje de biodisponibilidad del β-caroteno, luteína y carotenoides totales en brócoli 'Parthenon' y col de Milán 'Dama'.

El porcentaje de biodisponibilidad del β-caroteno fue mayor en brócoli que en col de Milán, siendo significativamente diferentes y presentando valores similares a los encontrados por otros autores para diferentes matrices (O'Connell et al., 2007; O'Sullivan et al., 2010).

Como se observa en la Figura 4.5 el porcentaje de biodisponibilidad de los compuestos carotenoides estudiados es baja, no supera el 6%. Esto puede ser debido a que, aunque la mayoría de estos pigmentos son estables al calor y a pH extremos en los tejidos intactos de los vegetales, cuando se extraen en forma aislada se oxidan rápidamente debido a la adición del oxígeno sobre los dobles enlaces (Rodríguez-Amaya, 1999; Meléndez-Martínez et al., 2004). Así se podría explicar la importante pérdida de estos compuestos durante la digestión *in vitro* realizada.

Estudios realizados por otros autores muestran la gran variabilidad en la absorción de los diferentes carotenoides y la gran diferencia en la biodisponibilidad de estos entre frutas y verduras. En general, el porcentaje de biodisponibilidad es mayor en fruta, es decir, los carotenoides de las frutas son potencialmente más disponibles para la absorción por las células gastrointestinales (O'Connell et al., 2007). Entre los principales factores que afectan a la biodisponibilidad de los carotenoides se encuentran la matriz alimentaria, la grasa, la fibra, la polaridad y las interacciones entre ellos (Yeum y Russel, 2002; Faulks y Southon, 2005; Maiani et al., 2009; Ornelas-Paz et al., 2012).

La matriz juega un papel fundamental en la biodisponibilidad de los carotenoides. Así, disueltos en aceite son más absorbibles que los incorporados en la matriz alimentaria tal como se presentan en frutas y hortalizas. Uno de los factores que más afecta la biodisponibilidad de los carotenoides es su liberación de la matriz física (alimento) en la cual son ingeridos y su disolución en la fase lipídica (Parker, 1996). Además, en el caso de las hortalizas verdes (como las brassicas objeto de este estudio) los carotenoides están asociados a proteínas, y en hortalizas como el tomate o las zanahorias se encuentran formando cristales. En ambos casos, las interacciones moleculares reducen la biodisponibilidad. En relación con el efecto matriz, es importante tener en cuenta que el procesado mecánico y térmico puede favorecer la liberación de los carotenoides del alimento y por tanto su posterior absorción (Stinco et al., 2012).

La grasa que se consume junto a los carotenoides es muy importante en el proceso de absorción de los mismos, al favorecer su incorporación en micelas para la absorción intestinal. Existen estudios que indican que para mejorar la absorción de los carotenoides es importante tener en cuenta tanto la cantidad como la naturaleza de la grasa ingerida (Ornelas-Paz et al., 2012).

La fibra dietética parece tener un papel negativo en la absorción de carotenoides, lo que puede deberse a su capacidad para secuestrar las sales biliares necesarias para la micelarización de carotenoides y de aumentar la viscosidad del medio gastrointestinal,

dificultando el paso de las micelas hacia las células intestinales (Ornelas-Paz et al., 2012).

Generalmente se acepta que las xantofilas son más biodisponibles que los carotenos, lo que indica que la polaridad es importante en relación con la absorción. De hecho, probablemente, la micelarización de algunas xantofilas es más eficiente que la de los carotenos (Ornelas-Paz et al., 2012). Esto se puede observar en los resultados obtenidos para la col de Milán, donde aún partiendo de mayor cantidad de β-caroteno (caroteno) que de luteína (xantofila), se obtiene un porcentaje de biodisponibilidad superior para luteína que para β-caroteno.

Además, en alimentos en los que están presentes varios carotenoides, como es el caso de las brassicas, pueden producirse interacciones entre ellos que afecten a su biodisponibilidad.

Aún así, en la actualidad no hay suficientes investigaciones en este ámbito, por lo que las cantidades diarias recomendadas para carotenoides no están todavía bien establecidas. Según Dietary Reference Intake (2000) mediante el consumo de alimentos naturales, el aporte estimado en países industrializados por consumo de frutas y vegetales es de 2-3 mg/día de carotenoides, siendo el β-caroteno el principal componente. Se estima que en Europa el aporte medio sea de 2,5 mg/día por persona, aportes que incluso pueden superarse con el consumo de 5 porciones de frutas y hortalizas llegando a 3-6 mg β-caroteno/día.

4.2.2.3. Contenido biodisponible de clorofilas. Porcentaje de biodisponibilidad

Los valores del contenido en clorofilas en la fracción biodisponible de brócoli y col de Milán se muestran en la Tabla 4.20.

El contenido biodisponible de clorofila A, así como el total, fue significativamente superior en brócoli. Para la clorofila B no se observaron diferencias significativas entre ambas brassicas en la fracción biodisponible.

Tabla 4.20. Media y desviación estándar del contenido de clorofila A, clorofila B y clorofila total en la fracción biodisponible de brócoli 'Parthenon' y col de Milán 'Dama'.

	MUESTRAS		
	Brócoli	**Col de Milán**	**Significación**
[1]Clorofila A	0,16±0,05	0,06±0,01	**
[2]Clorofila B	0,08±0,05	0,04±0,01	ns
[1]Clorofila Total	0,24±0,09	0,10±0,01	*

[1] Expresado como mg clorofila A/100 g peso fresco.
[2] Expresado como mg clorofila B/100 g peso fresco.
Media±Desviación estándar, n=6.
(ns) no existen diferencias significativas entre muestras.
(*) existen diferencias significativas entre los valores ($p<0,05$).
(**) existen diferencias significativas entre los valores ($p<0,01$).

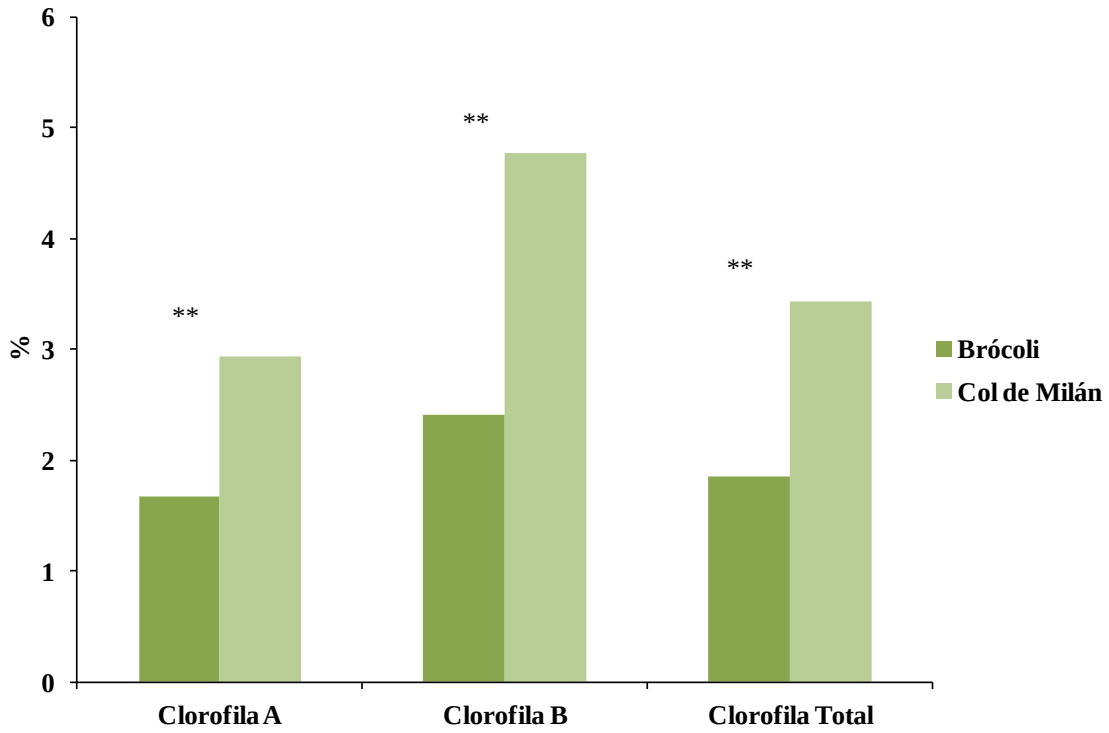
En la Figura 4.6 se presentan los porcentajes de biodisponibilidad de la clorofila A, clorofila B y clorofila total para brócoli y col de Milán. Los valores son estadísticamente superiores en col de Milán, siendo la clorofila B la que presentó un mayor porcentaje de biodisponibilidad (5% aproximadamente).

Este bajo porcentaje de biodisponibilidad puede estar ligado a las alteraciones que sufre la clorofila a pH ácidos, como ocurre en el caso de los procesos de digestión. La principal alteración que experimenta en estas condiciones es la pérdida del átomo de magnesio, formando la llamada feofitina, de un color verde oliva con tonos marrones, en lugar del verde brillante de la clorofila. Esta pérdida del magnesio se produce por sustitución por dos iones H^+, y consecuentemente se ve favorecida por el medio ácido (Deschene et al., 1991; Zhuang et al., 1995).

Hay que tener en cuenta que los vegetales son siempre ácidos, y que en el tratamiento térmico se liberan generalmente ácidos presentes en vacuolas en las células, y que hacen descender el pH del medio, por lo que la temperatura también afecta a esta alteración (Deschene et al., 1991; Zhuang et al., 1995). Además se sabe que la clorofila B es algo más estable que la clorofila A a pH ácidos, como queda constancia en los

resultados obtenidos de mayor biodisponibilidad y por tanto, menor pérdida de la clorofila B tras la disgestión *in vitro* realizada (Figura 4.6).

Aunque el contenido en clorofilas fue mayor en brócoli, tanto en fresco (no digerido) como en la fracción biodisponible, la diferencia entre los valores en fresco y después de la digestión gastrointestinal fue mayor, por lo que se puede afirmar que se produjo mayor pérdida y menor absorción de estos compuestos en brócoli que para la col de Milán.



(**) existen diferencias significativas entre los valores (p<0,01).

Figura 4.6. Porcentaje de biodisponibilidad de la clorofila A, clorofila B y clorofila total en brócoli 'Parthenon' y col de Milán 'Dama'.

Los resultados obtenidos en este trabajo no se han podido comparar con otros estudios, puesto que no se ha encontrado bibliografía referente a la biodisponibilidad de las clorofilas. Lo que sí se sabe es que la absorción de la clorofila natural se da prácticamente solo a nivel del intestino delgado debido al carácter lipofílico (Pérez-Gálvez y Mínguez-Mosquera, 2007).

4.2.2.4. Contenido fenólico biodisponible. Porcentaje de biodisponibilidad

El contenido fenólico total, así como el de ác. fenólicos totales y flavonoles totales en la fracción biodisponible de brócoli y col de Milán, después de la digestión gastrointestinal *in vitro*, se muestran en la Tabla 4.21.

Como se puede observar, el contenido fenólico total sigue siendo mayor, casi el doble, en brócoli que en col de Milán después de la digestión *in vitro* (69,57 y 36,11 mg ác. clorogénico equivalente/100 g peso fresco (pf), respectivamente). Los valores obtenidos fueron significativamente diferentes.

Tabla 4.21. Media y desviación estándar del contenido fenólico, ác fenólicos y flavonoles en la fracción biodisponible de brócoli 'Parthenon' y col de Milán 'Dama'.

	MUESTRAS		
	Brócoli	**Col de Milán**	**Significación**
[1]Contenido Fenólico Total	69,57±6,27	36,11±2,99	**
[2]Ác. Fenólicos Totales	0,85±0,04	0,41±0,02	**
[2]Flavonoles Totales	3,89±0,08	0,79±0,03	**

[1] Expresado como mg ác. clorogénico equivalente/100 g peso fresco.
[2] Expresado como mg/100 g peso fresco.
Media±Desviación estándar, n=6.
(**) existen diferencias significativas entre los valores ($p<0,01$).

El contenido total de ác. fenólicos en la fracción biodisponible fue mayor en brócoli que en col de Milán (0,85 y 0,41 mg/100 g pf, respectivamente), al igual que el contenido total de flavonoles (3,89 y 0,79 mg/100 g pf, respectivamente). Lo mismo que sucedía en las muestras sin digerir, se observó después de la digestión *in vitro*; es decir, que el contenido de los flavonoles totales fue mayor que el contenido ác. fenólicos totales. Aunque el comportamiento en el contenido de estos compuestos fue similar al observado en el producto sin digerir, después de la digestión gastrointestinal *in vitro* la tendencia general fue una disminución del nivel de ác. fenólicos totales y de flavonoides totales, al igual que observaron otros autores para otros productos alimenticios (Gil-Izquierdo et al., 2002; Pérez-Vicente et al., 2002; Vallejo et al., 2004). En el caso de los

flavonoides hay autores (Vallejo et al., 2004) que indican que la pérdida que se produce en el contenido puede deberse a que durante la digestión pancreática se liberan compuestos (macromoléculas como proteínas y fibra) capaces de asociarse con los flavonoides impidiendo así su absorción.

De forma general, los compuestos fenólicos son relativamente estables, pero pueden degradarse debido a oxidaciones químicas, microbiológicas y sobre todo enzimáticas por la acción de la enzima polifenol oxidasa (PPO), que al deteriorarse las membranas entra en contacto con los compuestos fenólicos y los oxida (Dixon, 2001). Pero esta enzima se desactiva a pH inferior a 2 y por tanto la reacción de oxidación de los compuestos fenólicos va más lenta. Este puede ser el motivo por el que la pérdida de estos compuestos bioactivos, tras la digestión *in vitro*, no sea tan acusada como en el caso de los pigmentos carotenoides y clorofilas, ya que el pH de 1,5 con el que se comienza la digestión, favorecería que en este paso no se produjera la degradación de los compuestos fenólicos.

En la Tabla 4.22 se muestran los valores de los contenidos de los diferentes ác. fenólicos y flavonoles individuales en la fracción biodisponible después de la digestión gastrointestinal *in vitro* de las brassicas estudiadas.

El ác. fenólico individual que mayor contenido biodisponible presentó en brócoli fue el ác. clorogénico (0,35 mg ác. clorogénico/100 g pf), seguido del ác. sinápico y en último lugar el ác. gálico. En col de Milán no sucedió lo mismo, siendo el ác. sinápico el que mayor concentración presentó (0,18 mg/100 g pf) después de la digestión gastrointestinal *in vitro*.

Comparando las dos brassicas estudiadas, fue el brócoli ‘Parthenon’ el que presentó mayor contenido de todos los ác. fenólicos individuales en la fracción biodisponible.

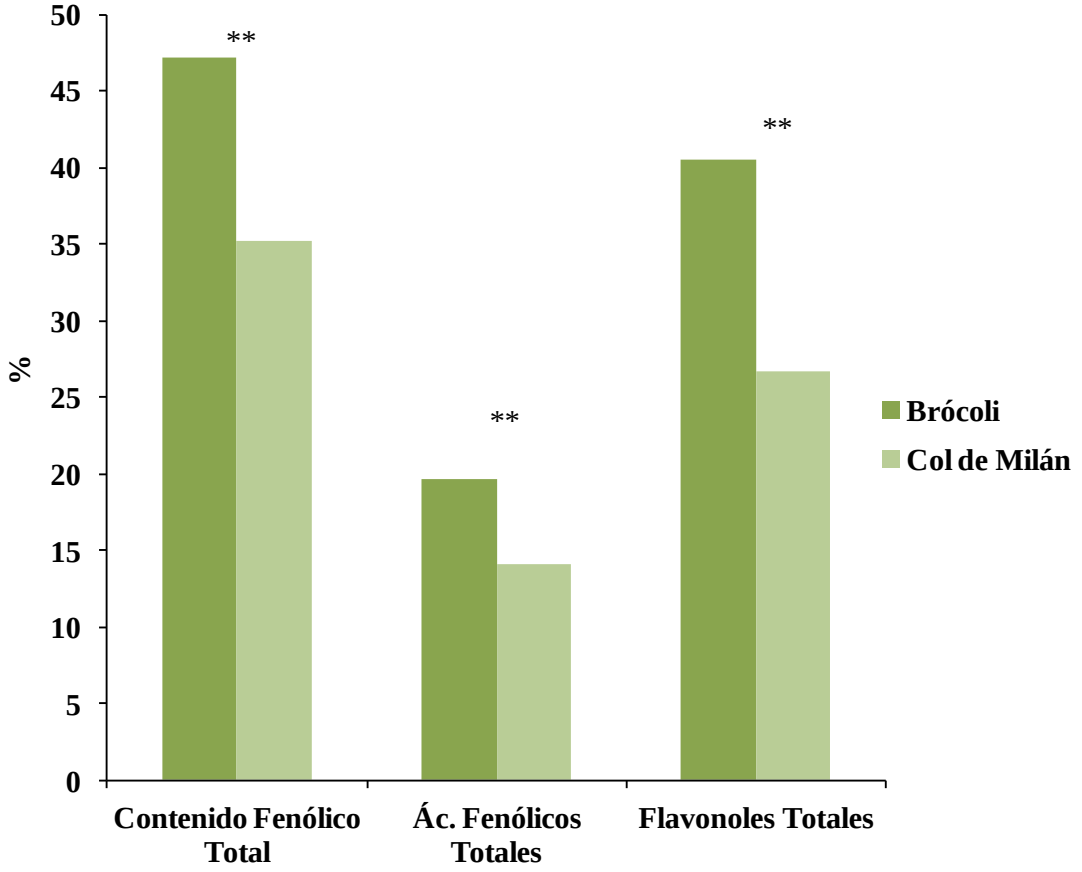
Respecto a la quercetina y el kaempferol, el contenido biodisponible fue también mayor en brócoli, al igual que ocurría en la muestra sin digerir. El flavonoide individual más abundante en brócoli fue quercetina (2,64 mg quercetina/100 g pf), mientras que en col de Milán fue kaempferol (0,46 mg kaempferol/100 g pf).

Tabla 4.22. Media y desviación estándar del contenido de los ác. fenólicos individuales y flavonoles individuales en la fracción biodisponible de brócoli 'Parthenon' y col de Milán 'Dama'.

		MUESTRAS		
		Brócoli	**Col de Milán**	**Significación**
Ácidos Fenólicos	**[1]Ác. Gálico**	0,24±0,01	0,10±0,01	**
	[2]Ác. Clorogénico	0,35±0,010	0,14±0,01	**
	[3]Ác. Sinápico	0,26±0,03	0,18±0,004	**
Flavonoles	**[4]Quercetina**	2,64±0,07	0,33±0,01	**
	[5]Kaempferol	1,25±0,03	0,46±0,01	**

[1] Expresado como mg ác. gálico/100 g peso fresco.
[2] Expresado como mg ác. clorogénico/100 g peso fresco.
[3] Expresado como mg ác. sinápico/100 g peso fresco.
[4] Expresado como mg quercetina/100 g peso fresco.
[5] Expresado como mg kaempferol/100 g peso fresco.
Media±Desviación estándar, n=6.
(**) existen diferencias significativas entre los valores ($p<0,01$).

En la Figura 4.7 se muestran los porcentajes de biodisponibilidad del contenido fenólico total, ác. fenólicos totales y flavonoles totales. Como se puede observar, el porcentaje de biodisponibilidad del contenido fenólico total no fue bajo, estando en torno al 53-66%, valores similares a los obtenidos en otros estudios de biodisponiblidad (Pérez-Vicente et al., 2002; Garbetta et al., 2014; López-Nicolás et al., 2014). Sin embargo, los ác. fenólicos totales fueron los que menor porcentaje de biodisponibilidad presentaron, siendo, por tanto, los que mayores pérdidas tuvieron después de la digestión gastrointestinal *in vitro*, obteniéndose menos del 20% de biodisponibilidad, datos que concuerdan con los obtenidos por Vallejo et al. (2004) para ácidos fenólicos.



(**) existen diferencias significativas entre los valores (p<0,01).

Figura 4.7. Porcentaje de biodisponibilidad del contenido fenólico total, ác. fenólicos totales y flavonoles totales en brócoli 'Parthenon' y col de Milán 'Dama'.

El porcentaje de biodisponibilidad de los flavonoles totales fue muy superior al obtenido para los ác. fenólicos totales. Esto no concuerda con lo propuesto por otros autores como Vallejo et al. (2004), Saura-Calixto et al. (2007) y Crozier et al. (2010), quienes encuentran, en general, que la biodisponibilidad de los ácidos fenólicos es mayor que la de los flavonoides, debido a que estos últimos son compuestos con estructuras químicas más complejas, con mayor índice de polimerización y glicosilación, por lo que su absorción en el intestino delgado es más dificultosa, pasando por lo tanto al intestino grueso donde se produce la mayor parte de la absorción, debido fundamentalmente a la fermentación producida por las bacterias de la flora colónica.

El hecho de que en nuestro trabajo hayamos obtenido mayor porcentaje de biodisponibilidad en flavonoles que en ác. fenólicos puede ser debido a que solo realizamos digestión gastrointestinal, y no se realizó diálisis ni fermentación colónica *in vitro,* como proponen algunos autores (Gil-Izquierdo et al., 2002;Vallejo et al., 2004; Saura-Calixto et al., 2007). Por lo tanto, al hacer menos pasos, se produjeron menos pérdidas en la digestión *in vitro,* con el consiguiente aumento del porcentaje de biodisponiblidad para los flavonoles totales.

Comparando las dos brassicas estudiadas, fue el brócoli 'Parthenon' el que presentó mayor porcentaje de biodisponibilidad tanto en el contenido fenólico total, ác. fenólicos totales y flavonoles, siendo significativamente diferentes sus valores respecto a col de Milán (Figura 4.7).

Los porcentajes de biodisponibilidad de los compuestos fenólicos individuales determinados para las dos brassicas se muestran en la Tabla 4.23.

Tabla 4.23. Media y desviación estándar del porcentaje de biodisponibilidad de ác. fenólicos individuales y flavonoles individuales en brócoli 'Parthenon' y col de Milán 'Dama'.

		MUESTRAS		
		Brócoli	**Col de Milán**	**Significación**
Ácidos Fenólicos	**Ác. Gálico**	19,20±0,82	14,15±0,64	**
	Ác. Clorogénico	18,93±0,76	14,71±1,08	**
	Ác. Sinápico	21,13±1,65	13,77±0,39	**
Flavonoles	**Quercetina**	41,12±1,26	27,60±0,96	**
	Kaempferol	39,17±0,74	26,10±1,00	**

Media±Desviación estándar, n=6.
(**) existen diferencias significativas entre los valores ($p<0,01$).

De forma general, se observó que tanto los porcentajes de biodisponibilidad de los ác. fenólicos individuales como de los flavonoles individuales son significativamente mayores en brócoli que en col de Milán.

El ác. sinápico fue el ác. fenólico individual que mayor porcentaje de biodisponibilidad presentó en brócoli y el ác. clorogénico en col de Milán, en torno al 21 y 14% respectivamente, valores similares a los obtenidos por Vallejo et al., (2004) para el cultivar de brócoli 'Marathon'.

Hay que destacar que aunque para brócoli el ác. clorogénico fue el ác. fenólico individual mayoritario en la facción biodisponible (Tabla 4.22), fue el presentó el menor porcentaje de biodisponibilidad de los tres ác. fenólicos individuales identificados en este trabajo (Tabla 4.23). Para la col de Milán fue el ác. sinápico el mayoritario en la facción biodisponible (Tabla 4.22), pero su porcentaje de biodisponibilidad fue el menor de los tres ác. fenólicos individuales. Por ello se puede decir que, tanto para el ác. clorogénico en brócoli como para el ác. sinápico en col de Milán, se produjeron las mayores pérdidas tras la digestión gastrointestinal *in vitro*, y por lo tanto los menores porcentajes de biodisponibilidad.

Con respecto al porcentaje de biodisponiblidad de los flavonoles identificados de forma individual, fue la quercetina el que presentó mayor valor en ambas brassicas (41% para brócoli y 27% para col de Milán). El hecho de que en col de Milán el kaempferol fuese el más abundante en la fracción biodisponible (Tabla 4.22) y, sin embargo, el que menor porcentaje de biodisponibilidad presentó (Tabla 4.23), indica que para este flavonol se produjeron pérdidas mayores tras la digestión gastrointestinal *in vitro*.

Los resultados obtenidos en este trabajo para los compuestos fenólicos estudiados de forma individual (ya sean ácidos o flavonoles) son difícilmente comparables con otros, ya que los datos sobre biodisponibilidad aportados por otros estudios son escasos y controvertidos. Así, los estudios llevados a cabo sobre biodisponibilidad y metabolismo de estos compuestos indican que los flavonoles son escasamente absorbidos en el intestino delgado a diferencia de los ácidos fenólicos. En la mayoría de los casos, los flavonoles se encuentran presentes en los alimentos en

forma de combinaciones más complejas con azúcares y ácidos orgánicos alifáticos y aromáticos, lo que hace que se disminuya sustancialmente su absorción en el intestino delgado, produciéndose el tránsito hacia el intestino grueso, donde la flora del colon metaboliza los flavonoles presentes naturalmente en el alimento para dar lugar a compuestos más sencillos, fundamentalmente derivados del ácido fenil-acético y fenil-propiónico (Selma et al., 2009), que son los que serán absorbidos y metabolizados por el organismo. Sin embargo, este comportamiento también se ha observado en algunos ácidos fenólicos con o sin estructura compleja, e incluso se ha observado lo contrario para flavonoles como la quercetina, para la cual se ha visto mejor absorción cuando está como glucósido que como aglicona (Manach et al., 2005).

4.2.2.5. Contenido biodisponible de glucosinolatos intactos. Porcentaje de biodisponibilidad

En la Tabla 4.24 se presentan los contenidos de los glucosinolatos (GS) intactos identificados en la fracción biodisponible para brócoli y col de Milán.

El valor del contenido de los glucosinolatos totales en la fracción biodisponible después de la digestión gastrointestinal *in vitro* fue significativamente superior en brócoli que en col de Milán, 27,50 y 22,21 mg sinigrina equivalente/100 g pf, respectivamente.

Como se ha comentado anteriormente, los glucosinolatos se clasificaron en tres familias: alifáticos, indólicos y aromáticos; estos últimos no fueron detectados en col de Milán, mientras que en brócoli su contenido en la fracción biodisponible fue de 0,07 mg sinigrina equivalente/100 g pf.

Los glucosinolatos indólicos fueron los que mayor contenido presentaron en la fracción biodisponible para las dos brassicas de estudio, siendo mayor en brócoli que en col de Milán (17,34 y 13,54 mg sinigrina equivalente/100 g pf, respectivamente).

En la familia de los GS indólicos, fue la glucobrasicina el glucosinolato que mayor contenido biodisponible presentó en las dos brassicas en estudio, siendo su valor superior en brócoli que en col de Milán (16,56 y 11,02 mg sinigrina equivalente/100 g pf, respectivamente).

Tabla 4.24. Media y desviación estándar del contenido de glucosinolatos (GS) intactos en la fracción biodisponible de brócoli 'Parthenon' y col de Milán 'Dama'.

		MUESTRAS		
		Brócoli	**Col de Milán**	**Significación**
[1]GS Totales		**27,51±0,61**	**22,21±0,60**	**
[1]Alifáticos				
Alquílicos	Glucorafanina	0,47±0,05	0,04±0,001	**
	Glucoiberina	0,04±0,002	0,09±0,01	**
	Glucoalisina	0,03±0,001	0,024±0,002	**
Alquenílicos	Sinigrina	0,07±0,003	0,23±0,01	**
	Gluconapina	1,34±0,06	0,49±0,02	**
	Glucobrasicanapina	8,07±0,21	6,22±0,15	**
Hidroxialquenílicos	Progoitrina	0,08±0,004	1,59±0,11	**
Totales		**10,10±0,23**	**8,67±0,22**	**
[1]Indólicos				
	Glucobrasicina	16,56±0,44	11,02±0,34	**
	4-Metoxiglucobrasicina	0,74±0,04	1,10±0,04	**
	Neoglucobrasicina	0,04±0,003	1,41±0,11	**
Totales		**17,34±0,48**	**13,54±0,44**	**
[1]Aromáticos				
	Gluconasturtina	0,07±0,003	nd	**

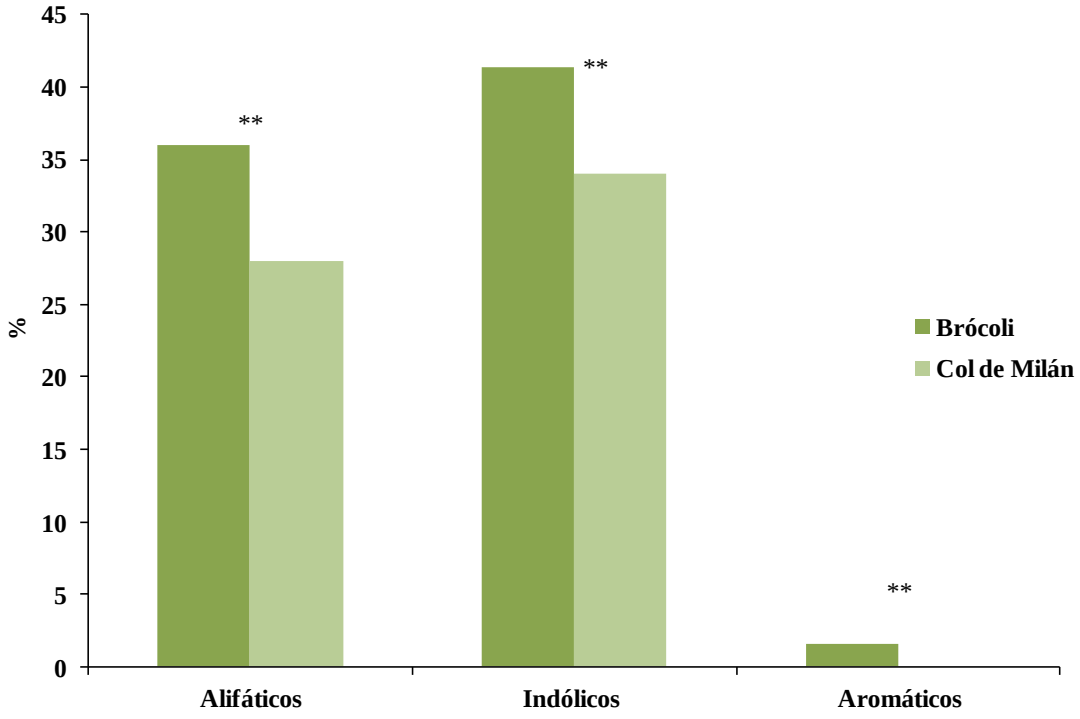
[1] Expresado como mg sinigrina equivalente/100 g peso fresco.
Media±Desviación estándar, n=6.
(nd) no detectado.
(**) existen diferencias significativas entre los valores ($p<0,01$).

La segunda familia más abundante en la fracción biodisponible fue la de los glucosinolatos alifáticos, siendo mayor su contenido en brócoli (10,10 mg sinigrina equivalente/100 g pf) que en col de Milán (8,67 mg sinigrina equivalente/100 g pf), al contrario de lo que sucedió en fresco, donde fue la col de Milán la que presentó mayor contenido en esta familia de glucosinolatos intactos.

Dentro de la familia de los alifáticos, fue el glucosinolato glucobrasicanapina (GS alquenílico) el que mayor valor presentó en ambas brassicas, siendo su contenido biodisponible mayor en brócoli que en col de Milán (8,07 y 6,22 mg sinigrina equivalente/100 g pf, respectivamente) y diferenciándose entre ellos significativamente.

La Figura 4.8 muestra los porcentajes de biodisponibilidad de las tres familias en las que se han dividido los glucosinolatos. Como se puede observar, es el grupo de los indólicos el que mayor porcentaje de biodisponibilidad presentó después de la digestión gastrointestinal *in vitro* (41,36% para brócoli y 34,06% para col de Milán), seguido del grupo de GS alifáticos (35,96% y 27,99 para brócoli y col de Milán, respectivamente) y por último los aromáticos (1,55% para brócoli). Fue en el brócoli donde se obtuvieron mayores valores en el porcentaje de biodisponibilidad de los diferentes grupos o familias de glucosinolatos intactos (Tabla 4.25).

El hecho de obtener mayor porcentaje de biodisponibilidad y, por tanto, menores pérdidas tras la digestión *in vitro* en GS indólicos que en GS alifáticos, está en desacuerdo con lo observado por Vallejo et al. (2004), quienes afirman que los GS alifáticos son más estables que los indólicos, por lo que las pérdidas que detectaron después de la digestión *in vitro* fueron mayores en GS indólicos (73%) que en GS alifáticos (27%). Esta diferencia con los resultados de nuestro trabajo puede ser debida a la manera de realizar la digestión *in vitro*, ya que Vallejo et al. (2004) realizan además una diálisis después de la digestión pancreática (Gil-Izquierdo et al., 2002). De todas formas, los datos bibliográficos sobre biodisponibilidad de glucosinolatos, al igual que del resto de biocompuestos, suelen ser a veces contradictorios.



(**) existen diferencias significativas entre los valores (p<0,01).

Figura 4.8. Porcentaje de biodisponibilidad de los tres grupos de glucosinolatos estudiados en brócoli 'Parthenon' y col de Milán 'Dama'.

En la Tabla 4.25 se presentan los datos de los porcentajes de biodisponibilidad obtenidos en las dos brassicas objeto de estudio para cada uno de los glucosinolatos intactos individuales, después de la digestión gastrointestinal *in vitro*.

El porcentaje de biodisponibilidad para los glucosinolatos totales fue significativamente mayor en brócoli que en col de Milán (37,05 y 31,39%, respectivamente). Produciéndose unas pérdidas de 63-69%, es decir, de producto no absorbido (diferencia con el % de biodisponibilidad). Estos datos concuerdan con los propuestos por Vallejo et al. (2004) que obtienen porcentajes de biodisponibilidad para GS intactos de entre un 10 y 35% y, por tanto, pérdidas de hasta un 69% para el contenido total de glucosinolatos en brócoli tras la digestión *in vitro*.

De los glucosinolatos alifáticos (Tabla 4.25), fue la glucobrasicanapina la que mayor porcentaje de biodisponiblidad presentó, 40,56% en brócoli y 38,41% en col de Milán, siendo los valores significativamente diferentes. Mientras que en los indólicos, fue la glucobrasicina la que mayor porcentaje presentó en ambas brassicas de estudio

(42%); además este GS fue el que presentó mayor porcentaje de biodisponibilidad de todos los GS intactos identificados. Para la 4-metoxiglucobrasicina se obtuvo un porcentaje de biodisponibilidad de 22-27%, frente al 12% encontrado por Vallejo et al. (2004).

La gluconasturtina (detectada solo en brócoli) fue el GS aromático que menos porcentaje de biodisponibilidad tuvo (1,55%), siendo, por tanto, el que mayores pérdidas presentó (98% aproximadamente) tras la digestión gastrointestinal *in vitro*.

Una posible explicación para la pérdida de los glucosinolatos durante la digestión podría ser la degradación de estos compuestos a nitrilos a pH gástrico (pH=2-3). Además, su baja estabilidad a pH intestinal (pH=6-7) puede conducir a una descomposición en sus productos secundarios de reacción (isotiocianatos). Esto ocurre cuando los tejidos de la planta se rompen y los glucosinolatos son hidrolizados por la mirosinasa dando lugar a los siguientes compuestos: isotiocianatos, nitrilos, azufre, tiocianatos, epitionitrilos o compuestos indólicos; formándose unos u otros dependiendo del pH al que se lleve a cabo la hidrólisis (Fenwick et al., 1983; Vallejo et al., 2004).

Los glucosinolatos, de manera general, son compuestos térmicamente estables, pero se ha visto que existe un efecto de la temperatura dependiendo de la estrutura química que presenten. Así, se han observado pérdidas significativas del glucosinolato alifático glucorafanina cuando la temperatura es de 20 °C o superperior (Cartea et al, 2008a; Verkerk et al., 2009; Cuomo et al., 2015). Por lo que esto también podría ser otra causa de pérdida de ciertos glucosinolatos durante el proceso de digestión *in vitro* realizado.

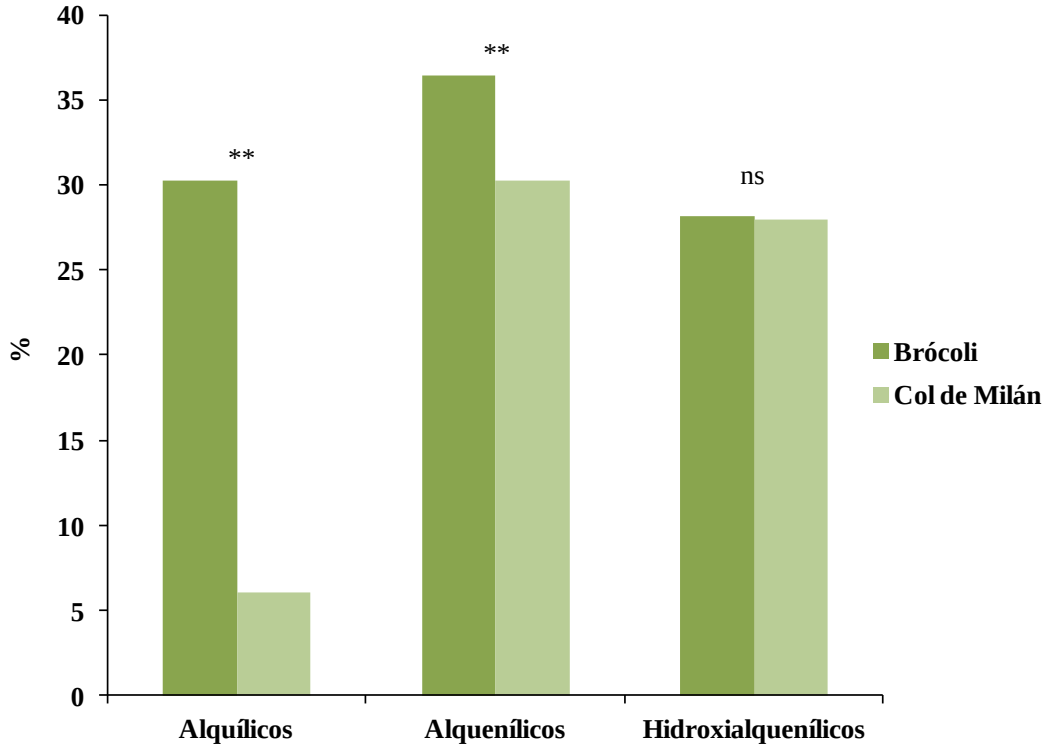
Hay que tener en cuenta que una cantidad considerable de glucosinolatos intactos que provienen de los alimentos no es absorbida en el intestino delgado, siendo degradados o hidrolizados por la microflora colónica. Sin embargo el papel exacto de la mirosinasa microbiana no se conoce todavía. Lo que sí se sabe es que las diferencias en las estructuras químicas de los diferentes glucosinolatos hacen que su absorción y metabolismo sean diferentes (Stahl et al., 2002; Holst and Williamson, 2004).

Tabla 4.25. Media y desviación estándar del porcentaje de biodisponibilidad de los glucosinolatos (GS) intactos en brócoli 'Parthenon' y col de Milán 'Dama'.

		MUESTRAS		
		Brócoli	**Col de Milán**	**Significación**
GS Totales		**37,05±1,15**	**31,39±1,16**	**
Alifáticos				
Alquílicos	Glucorafanina	38,12±1,07	18,76±0,84	**
	Glucoiberina	14,27±0,89	5,81±0,44	**
	Glucoalisina	11,54±0,21	3,33±0,22	**
Alquenílicos	Sinigrina	26,02±0,82	7,46±0,13	**
	Gluconapina	22,90±1,23	13,39±0,56	**
	Glucobrasicanapina	40,56±1,26	38,41±1,12	*
Hidroxialquenílicos	Progoitrina	28,13±1,25	27,98±2,06	ns
Totales		**35,96±1,11**	**27,93±0,91**	**
Indólicos				
	Glucobrasicina	42,46±1,47	42,59±1,91	ns
	4-Metoxiglucobrasicina	27,09±2,85	22,03±0,74	**
	Neoglucobrasicina	21,96±1,83	15,96±1,31	**
Totales		**41,37±1,57**	**34,06±1,44**	**
Aromáticos				
	Gluconasturtina	1,55±0,08	---	**

Media±Desviación estándar, n=6.
(ns) no existen diferencias significativas entre muestras.
(*) existen diferencia significativas entre los valores ($p<0,05$).
(**) existen diferencias significativas entre los valores ($p<0,01$).

Dentro de los glucosinolatos alifáticos (Figura 4.9) se observó un comportamiento diferente entre los glucosinolatos alquílicos, alquenílicos e hidroxialquenílicos. El grupo que mayor porcentaje de biodisponibilidad presentó fue el de los glucosinolatos alquenílicos, seguido de los GS alquílicos y en último lugar los GS hidroxialquenílicos, siendo los dos primeros superiores en brócoli que en col de Milán, y además sus valores fueron significativamente diferentes entre ellos, mientras que los glucosinolatos hidroxialquenílicos no presentaron diferencias significativas entre las dos brassicas estudiadas.



(ns) no existen diferencias significativas entre muestras.
(**) existen diferencias significativas entre los valores (p<0,01).

Figura 4.9. Porcentaje de biodisponibilidad de los tres grupos de glucosinolatos alifáticos estudiados en brócoli 'Parthenon' y col de Milán 'Dama'.

Debido a que no hay en la actualidad estudios concluyentes sobre biodisponibilidad y metabolismo de clorofilas, compuestos fenólicos y glucosinolatos, no se han podido establecer aún las ingestas diarias recomendadas. De ahí la necesidad

de profundizar más en estos estudios. Lo que sí se sabe es que llevando una dieta equilibrada y tomando al día 5 piezas de frutas y hortalizas se alcanzarían unos niveles de estos biocompuestos en el organismo suficientes para ejercer funciones protectoras de la salud, tales como la capacidad antioxidante (Dietary Reference Intake, 2000).

4.2.2.6. Actividad antioxidante total (AAT) en la fracción biodisponible. Porcentaje de bioactividad

En la Tabla 4.26 se muestran los valores de la actividad antioxidante total en las brassicas objeto de estudio después de la digestión *in vitro*.

En brócoli el valor de AAT fue casi cinco veces superior que en col de Milán (216,07 y 40,59 mg Trolox/100 g pf, respectivamente). Esto es lógico, puesto que, en general, el contenido en compuestos antioxidantes, tanto en fresco (sin digerir) como tras la digestión *in vitro*, fue también mayor en brócoli.

Tabla 4.26. Media y desviación estándar del valor de actividad antioxidante total (AAT) en la fracción biodisponible de brócoli 'Parthenon' y col de Milán 'Dama'.

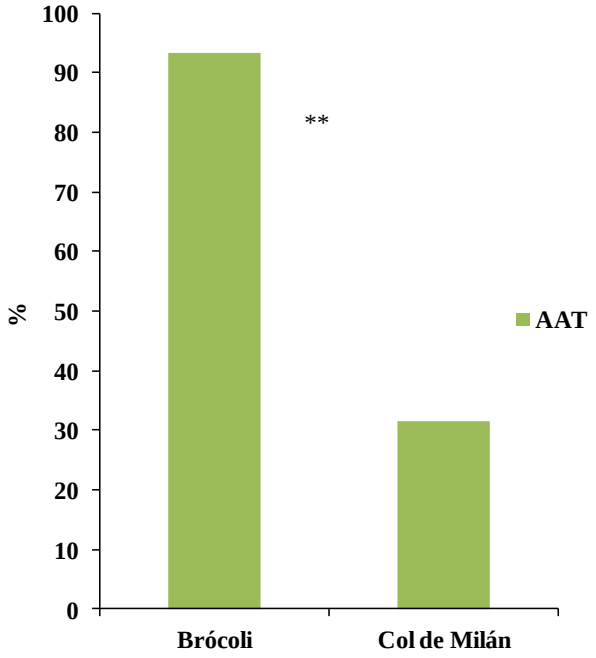
	MUESTRAS		
	Brócoli	**Col de Milán**	**Significación**
[1]AAT	216,07±1,40	40,59±3,29	**

[1] Expresado como mg Trolox/100 g peso fresco.
Media±Desviación estándar, n=6.
(**) existen diferencias significativas entre los valores ($p<0,01$).

La Figura 4.10 presenta los porcentajes de bioactividad de los compuestos funcionales de brócoli 'Parthenon' y col de Milán 'Dama', que como se puede observar fue casi tres veces superior en brócoli, siendo del 93% para brócoli y para col de Milán en torno al 31%.

Que el porcentaje de bioactividad sea mayor que el de biodisponibilidad está de acuerdo con lo descrito por otros autores como Stahl et al. (2002), quienes indican que los compuestos bioactivos o funcionales tienen baja absorción y por tanto baja biodisponibilidad en el tracto gastrointestinal, ya que se trata de compuestos inestables que se descomponen en el proceso de digestión, generando otros metabolitos que tienen,

si cabe, mayor actividad biológica que los de partida. Esto ocurre con los glucosinolatos, que se hidrolizan dando isotiocianatos, que son los que realmente poseen la actividad antioxidante (Vallejo et al., 2004).



(**) existen diferencias significativas entre los valores (p<0,01).

Figura 4.10. Porcentaje de bioactividad (actividad antioxidante total, AAT) de los compuestos funcionales del brócoli 'Parthenon' y col de Milán 'Dama'.

4.2.2.7. Correlación entre los diferentes parámetros estudiados y la actividad antioxidantes total (AAT)

En las Tablas 4.27 y 4.28 se muestran las correlaciones, mediante el test de Pearson, entre los diferentes compuestos funcionales y la actividad antioxidante total (AAT) en la fracción biodisponible, para las dos brassicas estudiadas.

Vitamina C

La vitamina C puede absorberse como ácido ascórbico y como ácido dehidroascórbico. Tanto la vitamina C como uno de sus compuestos, el ác. ascórbico, presentaron una alta correlación con la AAT para las dos brassicas (r≈0,9 p<0,01), pero en el caso del ác. dehidroascórbico la correlación fue algo menor (r≈0,8 p<0,01) (Tabla

4.27), indicando esto que el ácido dehidroascórbico es menos biactivo (Podsedek, 2007).

Esta alta correlación de la vitamina C con la AAT es lógica debido a sus propiedades antioxidantes, eliminando los radicales libres que genera el propio organismo, así como los que proceden del exterior. La vitamina C solo permanece en sangre 5 horas, por lo que hay que tomar alimentos ricos en esta vitamina en cada comida, sin abusar, debido a que si se produce una ingesta excesiva de la misma puede producirse toxicidad, provocando diarreas, piedras en el riñon, dolores de cabeza, etc (Padayatty et al., 2003).

Si la vitamina C es ingerida a través de alimentos de origen vegetal, es difícil que que se produzca toxicidad; sin embargo, el exceso de suplementos de vitamina C, en dosis de más de 2.000 mg diarios, resulta perjudicial (Padayatty et al., 2003).

Carotenoides

En la actualidad se han descrito más de 700 carotenoides, de los cuales solo 100 forman parte de la dieta humana y de estos, sólo unos 10 se encuentran en concentraciones apreciables en plasma y tejidos, siendo, por tanto, los que puedan realizar su función antioxidante (Britton et al., 2008).

La correlación entre los carotenoides totales y la AAT en las brassicas sometidas a digesitión gastrointestinal *in vitro* no fue alta ($r \approx 0,5\text{-}0,7$ $p<0,05$) (Tabla 4.27). Esto puede ser debido a que la cantidad de estos pigmentos carotenoides fue significativamente inferior después de la digestión realizada, presentando una biodisponibilidad no superior al 6%, por lo que su contribución a la actividad antioxidante total también será menor, como queda constancia en los valores de correlación encontrados.

Los carotenoides pueden proteger contra especies reactivas de oxígeno, como el oxígeno singlete, disipando la energía de excitación de éste de forma física. En el proceso de estabilización física el carotenoide no se consume y puede seguir ejerciendo su función protectora (Britton et al., 2008). Además de este efecto antioxidante, a los carotenoides se les atribuyen otras funciones beneficiosas para el organismo como

acción provitamínica (β-caroteno), señalización celular, protección contra el cáncer, papel protector en ciertos trastornos oculares (luteína), efecto protector sobre la piel y efecto sobre el sistema inmune (Britton et al., 2008; Yahia y Ornelas, 2010).

Clorofilas

Tanto para las clorofilas individuales como para la clorofila total se encontraron mayores correlaciones con la AAT para col de Milán que para brócoli (Tabla 4.27). Esto es debido a que, después de la digestión *in vitro*, la pérdida de estos pigmentos clorofílicos fue significativamente mayor en brócoli que en col de Milán, con lo que contribuyen en menor medida a la actividad antioxidante total.

Destacar la baja correlación encontrada entre la clorofila B y la AAT para brócoli ($r \approx 0,5$ $p < 0,05$), debido posiblemente a la menor bioactividad de este pigmento clorofílico. Diferentes autores indicaron que la clorofila A (clorofila mayoritaria) es más eficaz contra los radicales libres que la clorofila B (Lai et al., 1980; Ferruzzi et al., 2002).

Es conocida la importancia que la clorofila tiene en botánica, ya que se sabe que es la sustancia que permite absorber la luz solar y convertirla en energía utilizable, pero aún no es muy conocida su importancia en el mundo de la nutrición.

Hay evidencias científicas que han demostrado que la clorofila posee potente actividad antioxidante y quimio-protectora, y que puede usarse como agente anti-inflamatorio para afecciones como pancreatitis (Egner et al., 2003; Tajmir-Riahi et al., 2004).

Compuestos fenólicos

Como se muestra en la Tabla 4.27, existe una gran correlación entre los compuestos fenólicos y la AAT para las dos brassicas digeridas ($r \approx 0,9$ $p < 0,01$). Esto es debido a que, de forma general, han sido los compuestos funcionales más estables en la digestión, es decir, los que menos pérdidas en su contenido han sufrido y por tanto, los que mayores porcentajes de biodisponiblidad han presentado en este trabajo. Contribuyendo así en mayor medida a la actividad antioxidante total, tal como se refleja en los datos de correlación de Pearson.

Tabla 4.27. Correlaciones entre los diferentes parámetros estudiados y la actividad antioxidante total (AAT) mediante el test de Pearson, para las dos brassicas.

	MUESTRAS	
	Brócoli	**Col de Milán**
	Correlación de Pearson	
Parámetros	**AAT**	
Vitamina C	0,990(**)	0,945(**)
Ác. Ascórbico	0,984(**)	0,940(**)
Ác. Dehidroascórbico	0,790(**)	0,785(**)
Carotenos Totales	0,513(*)	0,701(*)
β-caroteno	0,482(*)	0,614(**)
Luteína	0,564(*)	0,666(*)
Clorofila Total	0,678(*)	0,898(**)
Clorofila A	0,754(**)	0,927(**)
Clorofila B	0,523(*)	0,833(**)
Contenido Fenólico Total	0,967(**)	0,918(**)
Ác. Fenólicos Totales	0,993(**)	0,944(**)
Ác. Gálico	0,995(**)	0,956(**)
Ác. Clorogénico	0,995(**)	0,943(**)
Ác. Sinápico	0,965(**)	0,967(**)
Flavonoles Totales	0,997(**)	0,963(**)
Quercetina	0,997(**)	0,965(**)
Kaempferol	0,998(**)	0,962(**)

(*) La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral).
(**) La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

Destacar que los flavonoles son de los compuestos antioxidantes más importantes de la dieta. La quercetina destaca por presentar un amplio abanico de actividades farmacológicas: protege frente a la osteoporosis, ciertas formas de cáncer, enfermedades pulmonares y cardiovasculares, y también frente al envejecimiento, siendo la más significativa la actividad dosis-dependiente reductora de la tensión arterial mediante la reducción del estrés oxidativo. Sin embargo, la evidencia sobre efectos antioxidantes o neutralizadores de radicales libres *in vivo* es muy escasa, y probablemente se debe a la baja biodisponibilidad de estos metabolitos (Manach et al., 2005). Los ácidos hidroxicinámicos (como el ác. clorogénico y el ác. sinápico) presentan propiedades antioxidantes y antiinflamatorias tanto *in vivo* como *in vitro*, contribuyendo a la protección del ADN y ayudando a la prevención del Alzheimer (Luceri et al., 2007). Se requieren nuevas investigaciones que determinen claramente las propiedades bioactivas de estos ácidos fenólicos y de sus derivados *in vivo*.

Glucosinolatos

En la Tabla 4.28 se presentan los valores de correlación entre los glucosinolatos intactos en la fracción biodisponible y la actividad antioxidante total (AAT) para brócoli y col de Milán.

Como se puede observar existe una alta correlación entre los glucosinolatos y la AAT ($r \approx 0,9$ $p<0,01$) para ambas brassicas. Sin embargo, para la col de Milán la correlación entre la glucoalisina (GS alifático aliquílico) y la actividad antioxiante total fue menor ($r=0,777$ $p<0,05$). Esto puede ser debido a que, según los datos obtenidos en este trabajo, fue el glucosinolato más inestable después de la digestión *in vitro* de la col de Milán, presentando pérdidas de hasta el 97% y por tanto, contribuyendo menos a la AAT en esta brassica.

Aunque los efectos beneficiosos asociados al consumo de crucíferas se atribuyen a los glucosinolatos, éstos como tales no son bioactivos, sino que son sus productos de hidrólisis, principalmente los isotiocianatos, los responsables de los efectos biológicos. Entre estos efectos destacan la protección frente al cáncer de próstata, pulmón, estómago, colon, pecho y vejiga, mediante la protección frente a agentes externos, aumentando la capacidad antioxidante de las células e inhibiendo el crecimiento del

tumor. Además, también poseen propiedades antiinflamatorias, antibacterianas frente a *Helicobacter pylori* y cardioprotectora (Verkerk et al., 2009).

Tabla 4.28. Correlaciones entre los diferentes glucosinolatos intactos estudiados y la actividad antioxidante total (AAT) mediante el test de Pearson, para las dos brassicas.

		MUESTRAS	
		Brócoli	**Col de Milán**
		Correlación de Pearson	
Parámetros		**AAT**	
Glucosinolatos Totales		0,997(**)	0,972(**)
Alifáticos Totales		0,974(**)	0,931(**)
Alquílicos	Glucorafanina	0,959(**)	0,911(**)
	Glucoiberina	0,998(**)	0,948(**)
	Glucoalisina	0,942(**)	0,777(*)
Alquenílicos	Sinigrina	0,987(**)	0,968(**)
	Gluconapina	0,990(**)	0,961(**)
	Glucobrasicanapina	0,997(**)	0,975(**)
Hidroxialquenílicos	Progoitrina	0,989(**)	0,939(**)
Indólicos Totales		0,976(**)	0,960(**)
Glucobrasicina		0,996(**)	0,972(**)
4-Metilglucobrasicina		0,985(**)	0,974(**)
Neoglucobrasicina		0,963(**)	0,950(**)
Arómaticos		0,979(**)	---
Gluconasturtina		0,979(**)	---

(*) La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral).
(**) La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

4.2.2.8. Resumen de resultados de la biodisponibilidad y bioactividad de los compuestos funcionales de brócoli 'Parthenon' y col de Milán 'Dama'

En este punto se resumen los datos del contenido de compuestos funcionales, así como de la actividad antioxidante total (AAT), obtenidos antes y después de someter a las dos brassicas a la digestión gastrointestinal *in vitro*. Datos que son necesarios para el cáculo del porcentaje de biodisponibilidad y bioactividad, y que serán discutidos para cada brassica a modo de resumen.

Brócoli 'Parthenon'

En las Tablas 4.29 y 4.30 se muestra el contenido en compuestos funcionales y el valor de AAT para brócoli 'Parthenon' antes y después de ser sometido a la digestión gastrointestinal *in vitro*. Y en las Figuras 4.11 y 4.12 se muestran los resultados de biodidponibilidad y no biodisponibilidad de todos los compuestos funcionales determinados para brócoli 'Parthenon'.

Como se puede observar, los compuestos fenólicos, entre ellos los flavonoles, fueron los que presentaron mayor porcentaje de biodisponiblidad (de hasta un 40% aproximadamente) al contrario de lo que sucedió con los pigmentos carotenoides y clorofílicos, para los cuales se obtuvieron porcentajes de biodisponibilidad de hasta aproximadamente un 6 y 2,6%, respectivamente. Los porcentajes de biodisponibilidad encontrados para la vitamina C, así como para sus constituyentes (ác. ascórbico y ác. dehidroascórbico), estuvieron próximos al 30% (Figura 4.11).

Con respecto a los glucosinolatos (GS), datos presentados en la Figura 4.12, fueron los GS indólicos totales, y dentro de ellos la glucobrasicina (precursor del indol-3-carbinol), los que presentaron mayor porcentaje de biodisponibilidad, 42% aproximadamente, porcentaje similar (40%) también encontrado para la glucobrasicanapina (GS alifático alquenílico). Para la gluconasturtina, único GS aromático detectado, se obtuvo el menor porcetaje de biodisponibilidad (1,5%).

Por tanto, para brócoli 'Parthenon' los porcentajes de biodisponibilidad obtenidos, estuvieron entre el 47% para el contenido fenólico total y el 1,5% para el GS gluconasturtina.

Tabla 4.29. Contenido de los compuestos funcionales y valor de la actividad antioxidante total (AAT) en brócoli 'Parthenon' fresco y digerido.

	BRÓCOLI		
	Sin digerir	**Digerido**	**Significación**
[1]Vitamina C	76,72±2,28	20,66±0,94	**
[1]Ác. Ascórbico	64,69±2,34	17,06±1,01	**
[2]Ác. Dehidroascórbico	12,03±0,65	3,60±0,11	**
[3]Carotenos Totales	1,33±0,03	0,08±0,04	**
[3]β-caroteno	0,77±0,05	0,05±0,03	**
[4]Luteína	0,56±0,06	0,03±0,01	**
[5]Clorofila Total	11,81±1,6	0,24±0,09	**
[5]Clorofila A	8,79±1,90	0,16±0,05	**
[6]Clorofila B	3,02±0,50	0,08±0,05	**
[7]Contenido Fenólico Total	140,22±6,92	69,57±6,27	**
[8]Ác. Fenólicos Totales	4,32±0,07	0,85±0,04	**
[9]Ác. Gálico	1,26±0,06	0,24±0,01	**
[10]Ác. Clorogénico	1,83±0,04	0,35±0,01	**
[11]Ác. Sinápico	1,23±0,04	0,26±0,03	**
[12]Flavonoles Totales	9,61±0,26	3,89±0,08	**
[13]Quercetina	6,42±0,25	2,64±0,07	**
[14]Kaempferol	3,19±0,08	1,25±0,03	**
[15]AAT	231,70±2,92	216,07±1,40	**

[1] Expresado como mg ác. ascórbico/100 g peso fresco.
[2] Expresado como mg ác. dehidroascórbico/100 g peso fresco.
[3] Expresado como mg β-caroteno/100 g peso fresco.
[4] Expresado como mg luteína/100 g peso fresco.
[5] Expresado como mg clorofila A/100 g peso fresco.
[6] Expresado como mg clorofila B/100 g peso fresco.
[7] Expresado como mg ác. clorogénico equivalente/100 g peso fresco.
[8] Expresado como mg /100 g peso fresco.
[9] Expresado como mg ác. gálico/100 g peso fresco.
[10] Expresado como mg ác. clorogénico/100 g peso fresco.
[11] Expresado como mg ác. sinápico/100 g peso fresco.
[12] Expresado como mg /100 g peso fresco.
[13] Expresado como mg quercetina/100 g peso fresco.
[14] Expresado como mg kaempferol/100 g peso fresco.
[15] Expresado como mg Trolox/100 g peso fresco.
Media±Desviación estándar, n=6.
(**) existen diferencias significativas entre los valores ($p<0,01$).

Tabla 4.30. Contenido de glucosinolatos intactos en brócoli 'Parthenon' fresco y digerido.

		BRÓCOLI		
		Sin digerir	**Digerido**	**Significación**
[1]Glucosinolatos Totales		74,24±0,13	27,50±0,61	**
[1]Alifáticos Totales		28,09±0,25	10,10±0,23	**
Alquílicos	Glucorafanina	1,24±0,13	0,47±0,05	**
	Glucoiberina	0,26±0,01	0,04±0,002	**
	Glucoalisina	0,30±0,01	0,03±0,001	**
Alquenílicos	Sinigrina	0,26±0,01	0,07±0,003	**
	Gluconapina	5,86±0,09	1,34±0,06	**
	Glucobrasicanapina	19,89±0,16	8,07±0,21	**
Hidroxialquenílicos	Progoitrina	0,28±0,01	0,08±0,004	**
[1]Indólicos Totales		41,93±0,60	17,34±0,48	**
Glucobrasicina		39,01±0,48	16,56±0,44	**
4-Metilglucobrasicina		2,73±0,15	0,74±0,04	**
Neoglucobrasicina		0,19±0,01	0,04±0,003	**
[1]Arómaticos				**
Gluconasturtina		4,23±0,07	0,07±0,003	**

[1] Expresado como mg sinigrina equivalente/100 g peso fresco.
Media±Desviación estándar, n=6.
(nd) no detectado.
(**) existen diferencias significativas entre los valores ($p<0,01$).

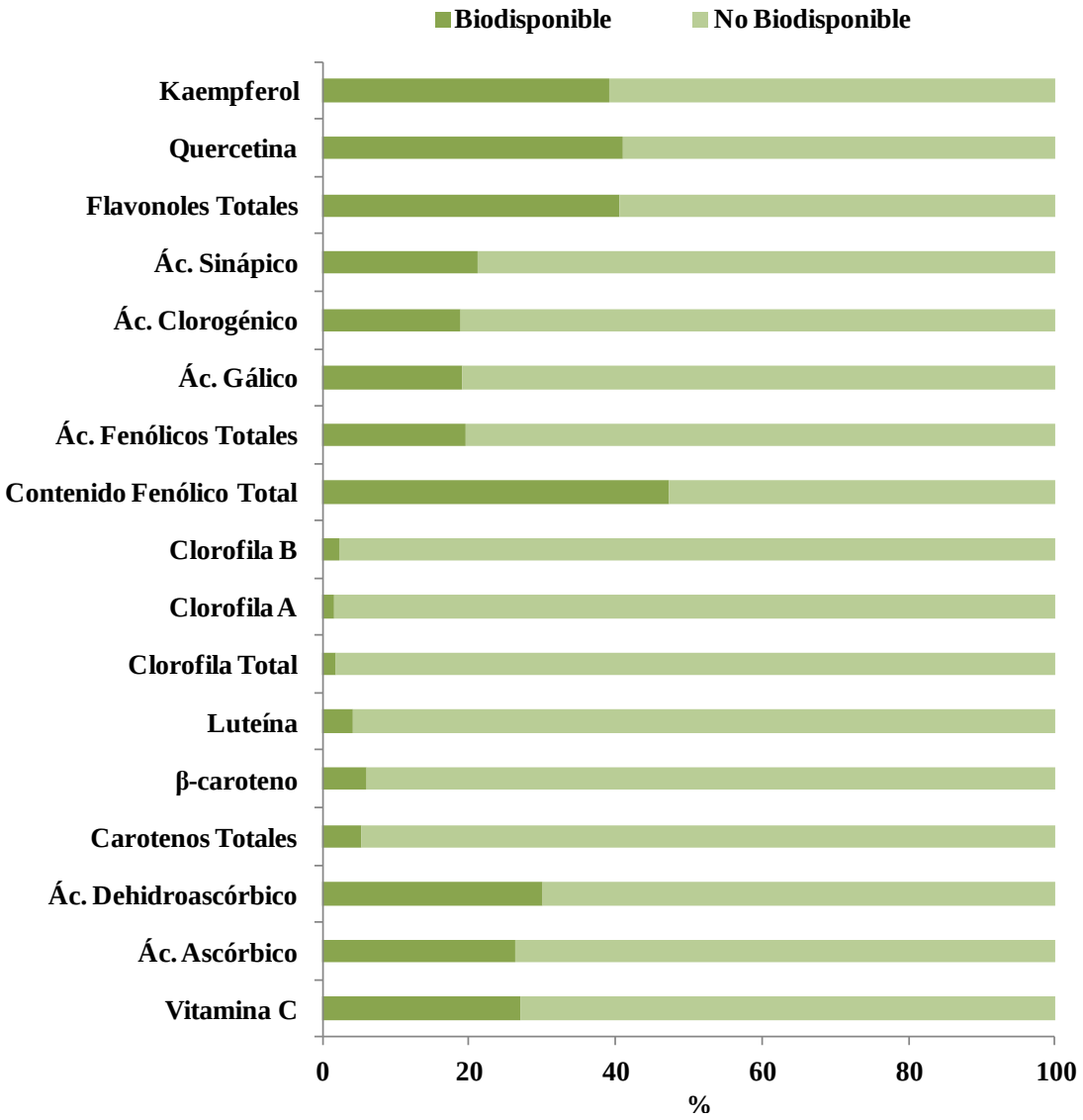


Figura 4.11. Porcentaje de biodisponibilidad y no biodisponibilidad de los compuestos funcionales del brócoli 'Parthenon'.

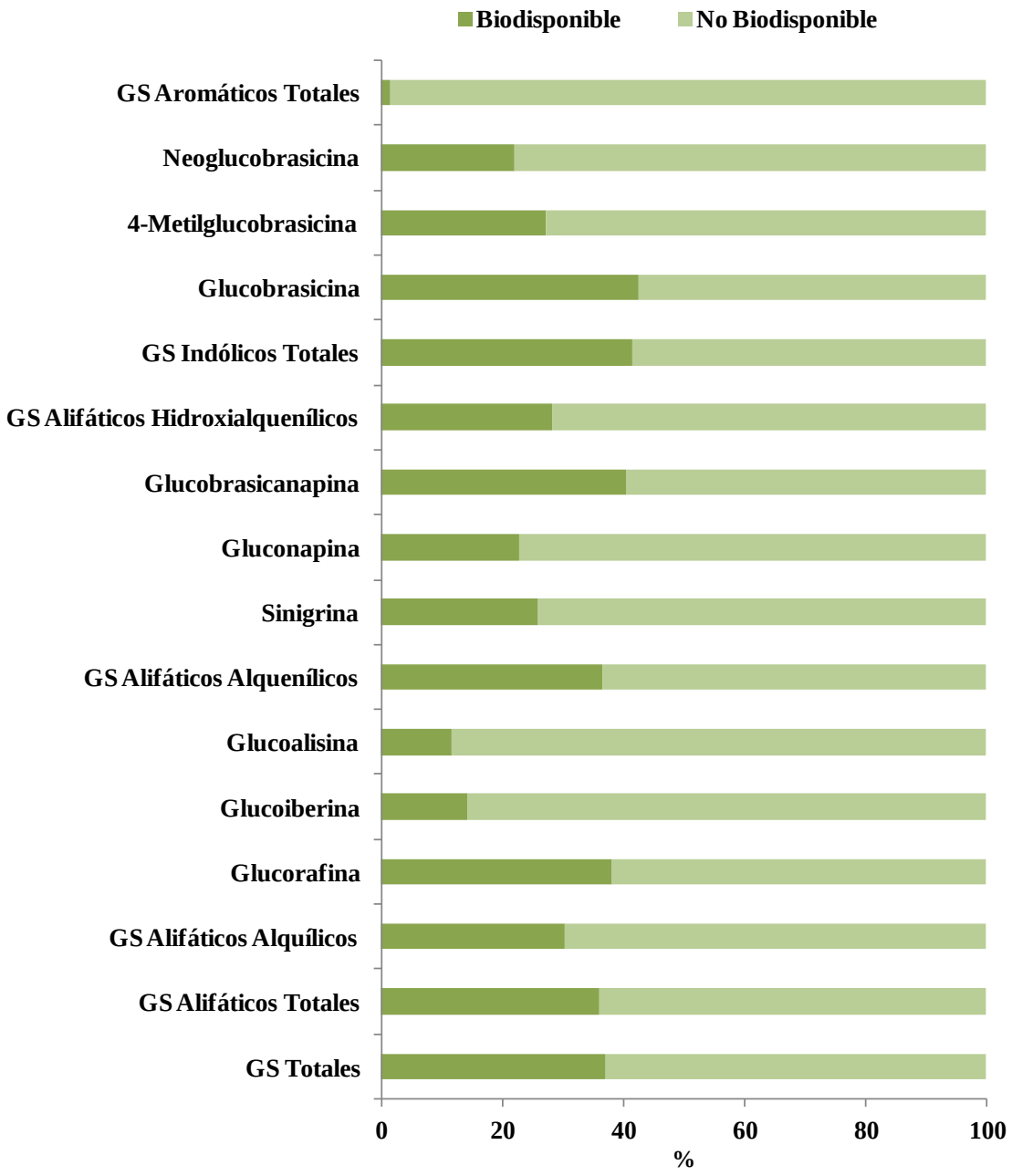


Figura 4.12. Porcentaje de biodisponibilidad y no biodisponibilidad de los glucosinolatos intactos estudiados del brócoli 'Parthenon'.

Col de Milán 'Dama'

En las Tablas 4.31 y 4.32 se muestra el contenido en compuestos funcionales y el valor de AAT para col de Milán 'Dama' antes y después de ser sometida a la digestión gastrointestinal *in vitro*. Y en las Figuras 4.13 y 4.14 se representan los resultados de biodidponibilidad y no biodisponibilidad de todos los compuestos funcionales determinados para esta brassica.

Al igual que sucedía en brócoli, son los compuestos fenólicos, en concreto los flavonoles, los que mayor porcentaje biodisponible presentaron en col de Milán (un 27% aproximadamente), y además, en esta brassica el ác. dehidroascórbico también presentó un importante porcentaje de biodisponilidad (33%) (Figura 4.13).

Con respecto a las clorofilas y pigmentos carotenoides, al igual que para brócoli, se encontraron porcentajes de biodisponibilidad bajos, de 5-6% (Figura 4.13).

En la Figura 4.14 se presentan los porcentajes de biodisponibilidad de los diferentes glucosinolatos (GS) en col de Milán 'Dama', como se puede observar fue el grupo de los GS indólicos totales el que mayor porcentaje de biodiponibilidad presentó (34%), y dentro de ellos destacó el valor obtenido para la glucobrasicina (42,6%). La glucobrasicanapina fue el siguiente GS con el porcentaje de biodisponibilidad mayor (38% aproximadamente), este orden también fue observado en el brócoli 'Parthenon'.

Los GS que presentaron menor porcentaje de biodisponibilidad fueron la glucoiberina (6%) y la glucoalisina (3%), dos glucosinolatos alifáticos alquílicos. Esto sin tener en cuenta al GS aromático gluconasturtina (precursor del fenil isoticianato), que no fue detectado, es decir su pérdida después de la digestión gastrointestinal *in vitro* fue completa, suponiendo un 0% de porcentaje de biodisponiblidad.

Por tanto, para col de Milán 'Dama' los porcentajes de biodisponibilidad obtenidos, estuvieron entre el 43% para el GS indólico glucobrasicina y el 2,4% para el β-caroteno (sin tener en cuenta el GS aromático gluconasturtina que no fue detectado).

Tabla 4.31. Contenido de los compuestos funcionales y valor de la actividad antioxidante total (AAT) en col de Milán 'Dama' fresca y digerida.

	COL DE MILÁN		
	Sin digerir	**Digerida**	**Significación**
[1]Vitamina C	61,86±3,54	15,10±0,69	**
[1]Ác. Ascórbico	50,05±2,85	11,16±0,61	**
[2]Ác. Dehidroascórbico	11,81±0,76	3,94±0,18	**
[3]Carotenos Totales	0,51±0,06	0,02±0,01	**
[3]β-caroteno	0,34±0,07	0,01±0,004	**
[4]Luteína	0,17±0,04	0,01±0,003	**
[5]Clorofila Total	2,99±0,37	0,10±0,01	**
[5]Clorofila A	2,17±0,29	0,06±0,01	**
[6]Clorofila B	0,82±0,08	0,04±0,01	**
[7]Contenido Fenólico Total	98,61±7,45	36,11±2,99	**
[8]Ác. Fenólicos Totales	2,91±0,07	0,41±0,02	**
[9]Ác. Gálico	0,69±0,06	0,10±0,01	**
[10]Ác. Clorogénico	0,94±0,06	0,14±0,01	**
[11]Ác. Sinápico	1,28±0,04	0,18±0,004	**
[12]Flavonoles Totales	2,95±0,10	0,79±0,03	**
[13]Quercetina	1,19±0,05	0,33±0,01	**
[14]Kaempferol	1,75±0,06	0,46±0,01	**
[15]AAT	130,59±15,06	40,59±3,29	**

[1] Expresado como mg ác. ascórbico/100 g peso fresco.
[2] Expresado como mg ác. dehidroascórbico/100 g peso fresco.
[3] Expresado como mg β-caroteno/100 g peso fresco.
[4] Expresado como mg luteína/100 g peso fresco.
[5] Expresado como mg clorofila A/100 g peso fresco.
[6] Expresado como mg clorofila B/100 g peso fresco.
[7] Expresado como mg ác. clorogénico equivalente/100 g peso fresco.
[8] Expresado como mg /100 g peso fresco.
[9] Expresado como mg ác. gálico/100 g peso fresco.
[10] Expresado como mg ác. clorogénico/100 g peso fresco.
[11] Expresado como mg ác. sinápico/100 g peso fresco.
[12] Expresado como mg /100 g peso fresco.
[13] Expresado como mg quercetina/100 g peso fresco.
[14] Expresado como mg kaempferol/100 g peso fresco.
[15] Expresado como mg Trolox/100 g peso fresco.
Media±Desviación estándar, n=6.
(**) existen diferencias significativas entre los valores ($p<0,01$).

Tabla 4.32. Contenido de glucosinolatos intactos en col de Milán 'Dama' fresca y digerida.

		COL DE MILÁN		
		Sin digerir	**Digerida**	**Significación**
[1]Glucosinolatos Totales		70,77±0,91	22,21±0,60	**
[1]Alifáticos Totales		30,98±0,59	8,67±0,22	**
Alquílicos	Glucorafanina	0,19±0,01	0,04±0,001	**
	Glucoiberina	1,49±0,03	0,087±0,01	**
	Glucoalisina	0,73±0,01	0,02±0,002	**
Alquenílicos	Sinigrina	3,06±0,06	0,23±0,01	**
	Gluconapina	3,64±0,02	0,49±0,02	**
	Glucobrasicanapina	16,19±0,47	6,22±0,15	**
Hidroxialquenílicos	Progoitrina	5,67±0,05	1,59±0,11	**
[1]Indólicos Totales		39,77±0,48	13,54±0,44	**
Glucobrasicina		25,90±0,42	11,02±0,34	**
4-Metilglucobrasicina		5,01±0,05	1,10±0,04	**
Neoglucobrasicina		8,86±0,08	1,414±0,11	**
[1]Arómaticos				
Gluconasturtina		0,02±0,01	nd	**

[1] Expresado como mg sinigrina equivalente/100 g peso fresco.
Media±Desviación estándar, n=6.
(nd) no detectado.
(**) existen diferencias significativas entre los valores ($p<0,01$).

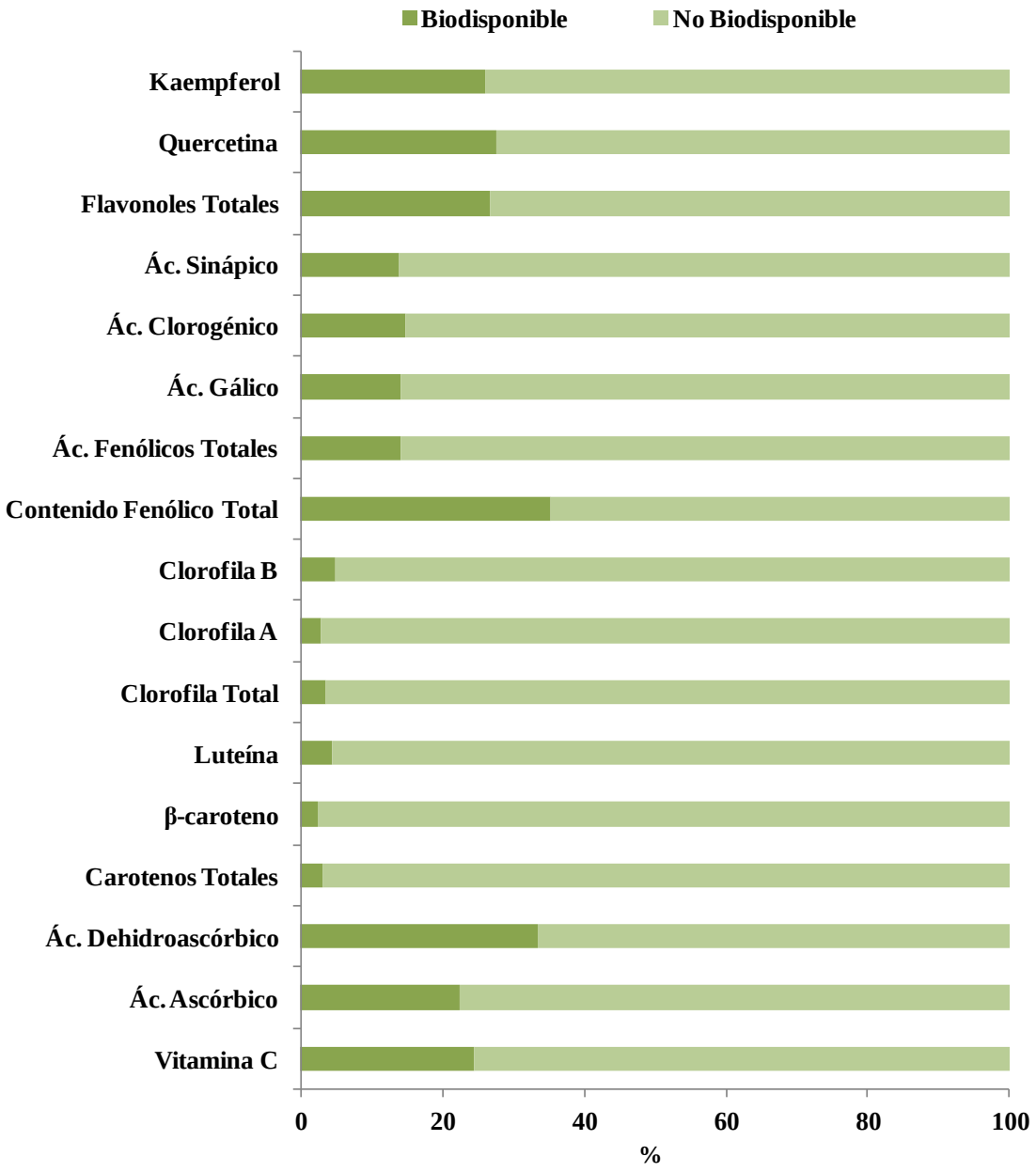


Figura 4.13. Porcentaje de biodisponibilidad y no biodisponibilidad de los compuestos funcionales de la col de Milán 'Dama'.

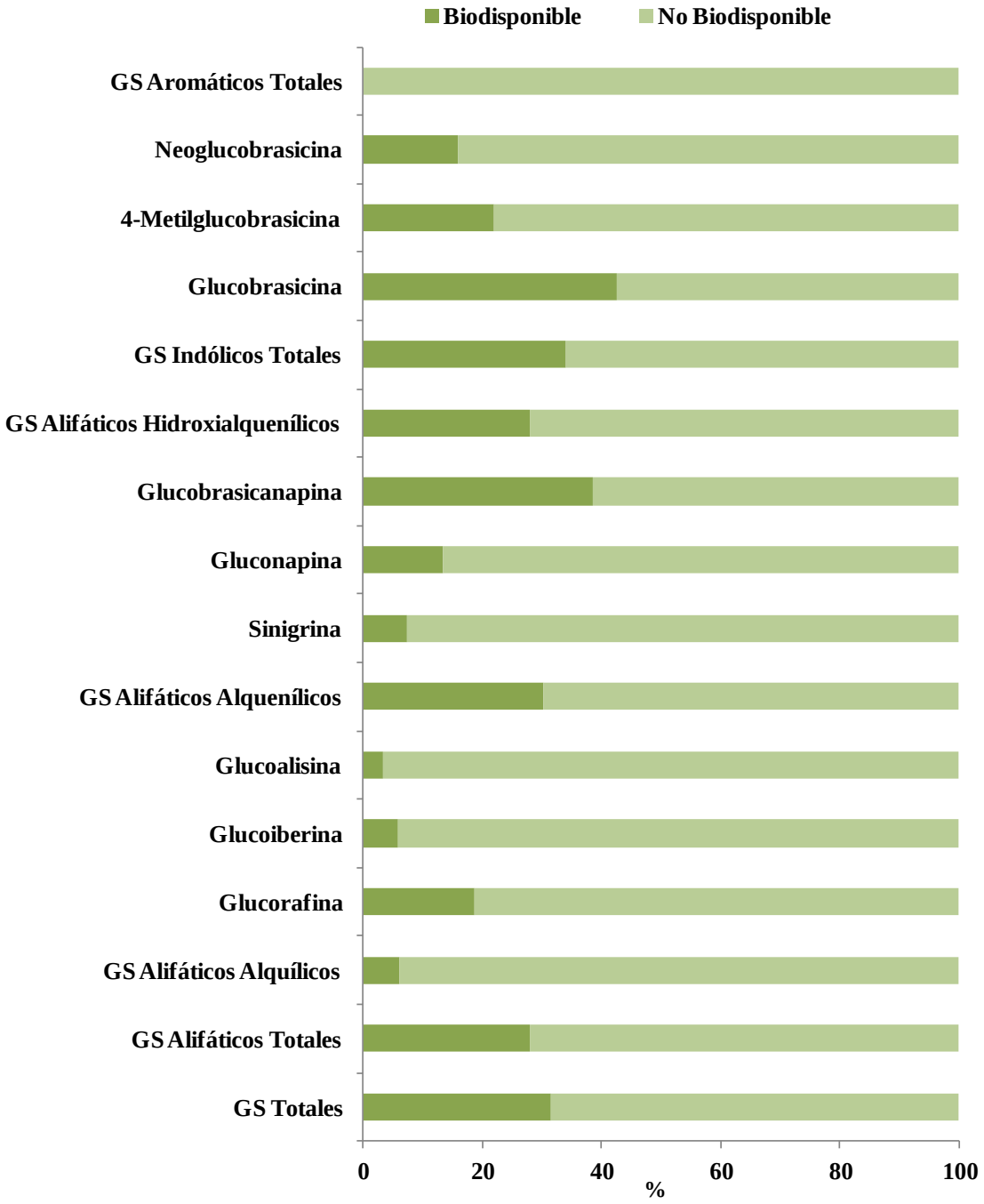


Figura 4.14. Porcentaje de biodisponibilidad y no biodisponibilidad de los glucosinolatos intactos estudiados de la col de Milán 'Dama'.

Por último, en la Figura 4.15 se presentan los porcentajes globales de bioactividad y no biactividad de los compuestos funcionales de las dos brassicas objeto de estudio. Como se puede observar el porcentaje de bioactividad fue casi tres veces superior en brócoli 'Parthenon' (93%) que en col de Milán 'Dama' (31%). Esto es lógico, puesto que, en general, el contenido en compuestos antioxidantes, tanto en fresco (sin digerir) como tras la digestión *in vitro*, fue también mayor en brócoli.

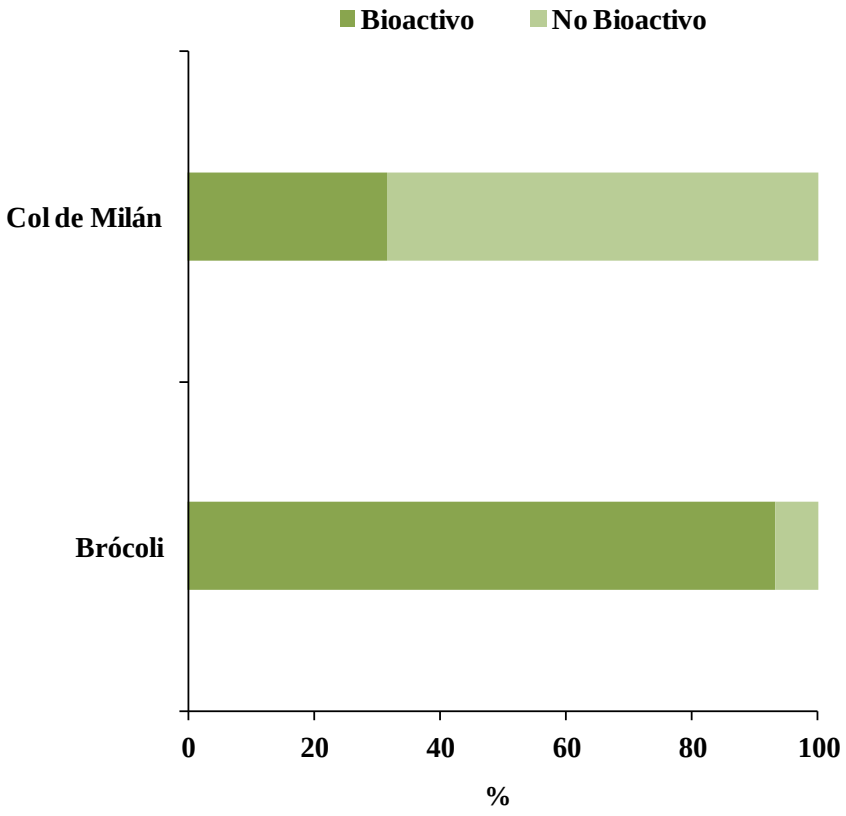


Figura 4.15.Porcentaje de bioactivadad y no bioactividad del brócoli 'Parthenon' y de la col de Milán 'Dama'.

Como se ha podido observar con los resultados obtenidos en este trabajo, la biodisponibilidad y bioactividad de los compuestos funcionales depende de la matriz alimenticia es la que se encuentren. De forma general, si un alimento tiene mayor contenido en compuestos funcionales tendrá mayores porcentajes de biodisponibilidad y bioactivad, como es el caso del brócoli 'Parthenon' frente a la col de Milán 'Dama'. Pero esto no siempre es así, puesto que dependerá también de la estructura química y de

las propiedades fisicoquímicas de dicho compuesto funcional (Campos-Vega et al., 2015). Esto se ha podido observar en nuestro trabajo con las clorofilas y con el ácido dehidroascórbico, que presentaron mayor biodisponibilidad en col de Milán aún partiendo de menor contenido que en brócoli.

Entre otros factores que influyen en la biodisponibilidad y bioactivad de los compuestos funcionales, hay que destacar el método de digestión utilizado en el ensayo *in vitro*. Así en los últimos años se han propuesto métodos en los que se introducen la digestión bucal, utilizando saliva sintética o artificial (Garbetta et al., 2014; Cuomo et al., 2015) y la fermentación colónica (Campos-Vega et al., 2015; Mosele et al., 2015), e incluso la utilización de N_2 para retirar el O_2 del medio, simulando así de forma más fiel las condiciones anaeróbicas que se dan en el estómago y en el intestino delgado (Correa-Betanzo et al., 2014).

Pero al igual que en nuestro trabajo de investigación, independientemente del método de digestión *in vitro* utilizado, se observan pérdidas en los contenidos de compuestos funcionales superiores al 50% para distintas matrices alimenticias: arándanos (Correo-Betanzo et al., 2014); alcachofas (Garbetta et al., 2014); zumo de frutas (López-Nicolás et al., 2014); granadas (Mosele et al., 2015); leguminosas (Soriano Sancho et al., 2015); café (Campos-Vega et al., 2015) y queso (Rashidinejad et al., 2015).

Aún así, todavía existen muchos datos contradictorios, dificultando esto el cálculo de las cantidades diarias recomendadas (CDR) para los compuestos funcionales o biactivos.

Las CDR sí están establecidas bien para la vitamina C (90 mg/día-persona) y para el β-caroteno, provitamina A, (2,5 mg/día-persona) pero en la actualidad no existen estudios concluyentes sobre biodisponibilidad y metabolismo de clorofilas, compuestos fenólicos y glucosinolatos, y no se han podido establecer aún las ingestas diarias recomendadas de estos biocompuestos. De ahí la necesidad de profundizar más en estos estudios. Lo que sí se sabe es que llevando una dieta equilibrada y tomando al día 5 piezas de frutas y hortalizas se alcanzarían unos niveles de estos compuestos bioactivos

en el organismo suficientes para ejercer funciones protectoras de la salud, tales como la capacidad antioxidante (Dietary Reference Intake, 2000).

Con los datos de biodisponibilidad obtenidos en este trabajo podemos hacer un cálculo aproximado de la cantidad de vitamina C y β-caroteno que aportaría el consumo de brócoli y la col de Milán en la dieta. Así, según nuestros resultados, 100 g de brócoli fresco (o sin digerir) aportarían 76,72 mg de vitamina C (85% CDR) y 0,77 mg de β-caroteno (31% CDR), mientras que si se tiene en cuenta la biodisponibilidad de estos compuestos funcionales, aportarían 20,66 mg de vitamina C (23% CDR) y 0,05 mg de β-caroteno (2% CDR). Para 100 g de col de Milán sin digerir el aporte sería de 61,86 mg de vitamina C (69% CDR) y de 0,34 mg de β-caroteno (14% CDR) y, teniendo en cuenta la biodisponibilidad, el aporte sería mucho menor, igual que sucede con el brócoli, siendo de 15,10 mg de vitamina C (17% CDR) y de 0,01 mg de β-caroteno (0,4% CDR). Estas cantidades se aportarían con el consumo de estas brassicas en ensaladas (en crudo); si se consumen cocinadas hay que tener en encuenta que las catidades de compuestos funcionales aportadas serían menores, debido a la pérdida de estos biocompuestos durante el proceso culinario o de cocinado utilizado (Vallejo et al., 2003d; Cuomo et al., 2015).

5. CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

1. En la caracterización funcional de los cultivares de brócoli, se observó que el cultivar 'Parthenon' era el más rico en compuestos fenólicos, carotenoides, ácidos fenólicos, flavonoides y glucosinolatos, presentando también valores más altos de vitamina C y de actividad antioxidante *in vitro*. El cultivar 'Parthenon' presentó mayor contenido de gluconasturtina, glucosinolato muy importante precursor del compuesto anticancerígeno fenetil isotiocianato.

2. En cuanto a la caracterización de los cultivares de col de Milán, 'Dama' fue el que presentó mayor contenido en la mayoría de los compuestos funcionales estudiados, siendo además el que mostró mayor valor de actividad antioxidante *in vitro*. Además este cultivar presentó una alta concentración de glucobrasicina, precursor del compuesto anticancerígeno indol-3-carbinol y el contenido en glucorafanina (precursor de sulforafano) fue un 50% más alto que en 'Leticia'.

3. Comparando el brócoli'Parthenon' y la col de Milán 'Dama', se observó que el contenido en la mayoría de los compuestos funcionales fue mayor en brócoli, a excepción de los glucosinolatos alifáticos totales. La actividad antioxidante total fue también mayor en brócoli y la mayoría de los compuestos presentaron una alta correlación con la actividad antioxidante.

4. Después de la digestión *in vitro* se observó que, al igual que en el producto fresco (o no digerido), el contenido de los compuestos funcionales fue también mayor en el brócoli 'Parthenon', existiendo una buena correlación con la actividad antioxidante.

5. Respecto al porcentaje de biodisponibilidad, fue superior en el brócoli 'Parthenon' para el ác. ascórbico, el β-caroteno, los compuestos fenólicos, los glusosinolatos alifáticos, indólicos y aromáticos, mientras que para la clorofila A, la clorofila B y la suma de ambas (clorofilas totales), así como para el ác. dehidroascórbico, fue superior en la col de Milán'Dama'.

6. El valor de actividad antioxidante total fue mayor en brócoli que en col de Milán, también para las muestras digeridas.

7. De forma general, y según los datos obtenidos en este trabajo de investigación, se puede decir que tanto la biodisponibilidad como la bioactivad de los compuestos funcionales de brócoli ‘Parthenon’ fueron superiores a las de col de Milán ‘Dama’ (excepto para los pigmentos clorofílicos), teniendo por tanto el brócoli mayor valor funcional.

6. REFERENCIAS

6. REFERENCIAS

Agerbirk, N. and Olsen, C.E. (2012). Glucosinolate structures in evolution, *Phytochemistry*, 77, 16-45.

Aggett, P.J. (2010). Population reference intakes and micronutrient bioavailability: a European perspective. *American Journal of Clinical Nutrition*, 91, 1433S-1437S.

Bahorun, T., Luximon-Ramma, A., Crozier, A. and Aruoma, O.I. (2004). Total phenol, flavonoid, proanthocyanidin and vitamin C levels and antioxidant activities of Mauritian vegetables. *Journal of the Sciencie of Food and Agriculture*, 84, 1553-1561.

Baracaldo, C.M. y Castro de Navarro, L. (1998). Biodisponibilidad de carotenoides. *Biomédica*, 18, 285-290.

Bernalte, M.J., Lozano, M., Ayuso, M.C., Vidal, M.C., García, M.I., Hernández, M.T., García, R.M. and García, J.J. (2007). Compuestos fitoquímicos antioxidantes en diferentes cultivares de bróculi (*Brassica oleracea* L. var. *italica*) de Extremadura. *Actas de Horticultura*, 48, 654-657.

Block, G., Jensen, C., Dietrich, M., Norkus, E. P., Hudes, M. and Packer, L. (2004). Plasma C-reactive protein concentrations in active and passive smokers: Influence of antioxidant supplementation. *Journal of the American College of Nutrition*, 23, 141-147.

Boisen, S. and Eggum, B.O. (1991). Critical evaluation of in vitro methods for estimating digestibility in simple-stomach animals. *Nutrition Research Reviews*, 4, 141-162.

Bone, R.A., Landrum, J.T., Rosenfeld, P.J., Moore, L.L., Sprague, K.E. and Gomez, C. (1997). One-year study of macular pigment enhancement by lutein supplement. *Investigate Opthamology and Visual Science*, 338, S90.

Bones, A.M. and Rossiter, J.T. (1996). The myrosinase-glucosinolate sys-tem, its organisation and biochemistry. *Physiologia Plantarum*, 97, 194-208.

Borowski, J., Szajdek, A., Borowska, E.J., Ciska, E. and Zielinski, H. (2008). Content of select bioactive components and antioxidant properties of broccoli (Brassica oleracea L.). *European Food Research and Technology*, 226, 459-465.

Britton, G., Liaaen-Jensen, S. and Pfander, H. (2008). Carotenoids. Volumen 5. Nutrition and Health, Basel, Boston, Berlin: Birkhäuser Verlag.

Brubacher, D., Moser, U. and Jordan, P. (2000). Vitamin C concentrations in plasma as a function of intake: a meta-analysis. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, 70(5), 226-237.

Burns, J., Fraser, P.D. and Bramley, M. (2003). Identification and quantification of carotenoids, tocopherols and chlorophylls in commonly consumed fruits and vegetables. *Phytochemistry*, 62, 939-947.

Camean Fernández, A.M. y Repetto Jiménez, M. (2012). Toxicología alimentaria. *Ediciones Díaz de Santos*, 703 pp.

Campas-Baypoli, O.N., Bueno-Solano, C, Martínez-Ibarra, D.M., Camacho-Gil, F., Villa-Lerma, A.G., Rodríguez-Núñez, J.R., López-Cervantes, J., y Sánchez-Machado, D.I. (2009). Contenido de sulforafano (1-isotiocianato-4-(metilsulfinil)-butano) en vegetales crucíferos. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 59, 95-100.

Campos-Vega, R., Vázquez-Sánchez, K., López-Barrera, D., Loarca-Piña, G., Mendoza- Díaz, S. and Oomah, B.D. (2015). Simulated gastrointestinal digestión and *in vitro* colonic fermentación of spent coffe (*Coffea arabica* L.); Bioaccessibility and intestinal permeability. *Food Research International*, article in press.

Cano, A., Hernández-Ruiz, J., García-Cánovas, F., Acosta, M. and Arnao, M.B. (1998). An end-point method for estimation of the total antioxidant activity in plant material. *Phytochemical Analysis*, 9, 196-202.

Cantwell, M. and Suslow, T. (2005). Cabbage: Recommendation for maintaining postharvest quality. Page: http://postharvest.ucdavis.edu/pfvegetable/ (consultado diciembre 2014).

Cartea, M.E., Francisco, M., Abilleira, R. y Velasco, P. (2008a). Los glucosinolatos como factor de calidad en las brásicas: degradación desde el campo hasta la mesa. *Horticultura internacional*, 209, 54-61.

Cartea, M.E., Velasco, P., Obregón, S., Padilla, G. and Haro, A. (2008b). Seasonal variation in glucosinolate content in *Brassica oleracea* crops grown in northwestern Spain. *Phytochemistry*, 69, 403-410.

Chen, B.H. and Chen, Y.Y. (1993). *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 41, 1315-1320.

Chena, S. and Andreassonb, E. (2001). Update on glucosinolate metabolism and transport. *Plant Physiology and Biochemistry*, 39, 743-758.

Chu, Y.F., Sun, J., Wu, X. and Liu, R.H. (2002). Antioxidant and antiproliferative activities of common vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 6910-6916.

CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). HarvestPlus, Agrosalud. Página: http://www.agrosalud.org/descargas/poster_biodisponibilidad_julio_08.pdf (consultado en diciembre 2014).

Ciska, E., Martyniak-Przybyszewska, B. and Kozlowska, H. (2000). Content of glucosinolates in cruciferous vegetables grown at the same site for two years under different climatic conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 2862-2867.

Cohen, J.H., Kristal, A. R. and Stanford, J.L. (2000). Fruit and vegetable intakes and prostate cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 92, 61-68.

Coles, L.T., Moughan, P.J. and Darragh, A.J. (2005). In vitro digestion and fermentation methods, including gas production techniques, as applied to

nutritive evolution of foods in the hindgut of humans and other simple-stomached animals. *Animal Food Science and Technology*, 123, 421-444.

Correa-Betanzo, J., Allen-Vercoe, E., McDonald, J., Schroeter, K., Corredig, M. and Paliyath, G. (2014). Stability and biological activity of wild blueberry (*Vaccinium angustifolium*) polyphenols during simulated *in vitro* gastrointestinal digestion. Food Chemistry, 165, 522-531.

Crozier, A., Del Rio, D. and Clifford, M.N. (2010). Bioavailability of dietary flavonoids and phenolic compounds. *Molecular Aspects of Medicine*, 31, 446-467.

Cuomo, V., Luciano, F.B., Meca, G., Ritieni, A. and Mañes, J. (2015). Bioaccessibility of glucoraphanin from broccoli using an *in vitro* gastrointestinal digestion model. *CyTA-Journl of Food*, 13, 361-365.

Czeczot, H. (2000). Biological activities of flavonoids: A review. Polish *Journal of Food and Nutrition Sciences*, 950, 3-13.

Davey, M.W., van Montagu, M., Inze, D., Sanmartin, M., Kanellis, A. and Smirnoff, N. (2000). Plant L-ascorbic acid: Chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 825-860.

Deschene, A., Paliyath, G., Lougheed, E.C., Dumbroff, E.B. and Thompson, J.E. (1991). Membrane deterioration during postharvest senescence of broccoli florets: modulation by temperature and controlled atmosphere storage. *Postharvest Biology and Technology*, 1, 19-31.

Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoids. (2000). www.nap.edu/openbook.php?record_id=9810 (consultado abril 2015).

Dixon, R. (2001). Natural products and plant disease resistance. *Nature*, 411, 843-847.

Egner, P.A., Muñoz, A. and Kensle, T.W. (2003). Chemoprevention with chlorophyllin in individuals exposed to dietary aflatoxin. *Mutation Research*, Volumes 523–524, 209-216.

Ettlinger, M.G. and Kaer, A. (1968). Sulfur compounds in plants. *Recent Advances in Phytochemistry*, 1, 59-144.

Fahey, J.W., Zalcmann, A.T. and Talalay, P. (2001). The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry*, 56, 5-51.

Faulks, R.M. and Southon, S. (2005).Challenges to understanding and measuring carotenoid bioavailability. *BBA Molecular Basis of Disease*, 1740 (2): 95-100.

Favell, D.J. (1998). A comparison of the vitamin C content of fresh and frozen vegetables. *Food Chemistry*, 62, 59-64.

FECYT (Fundación Española para la Ciencia y la Tecnología). (2005). Memoria de Actividades. ISBN/NIPO: M-32904-2006.

Fenwick, G.R., Heaney, R.K. and Mullin, W.J. (1983). Glucosinolates and their breakdown products in food and food plants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 18, 123-194.

Fernández-León, M.F., Fernández-León, A.M., Lozano Ruiz, M., Ayuso Yuste, M.C., González García, J.A. and González-Gómez, D. (2011a). Antioxidantes naturales y capacidad antioxidante en Brassicas. *Actas de Horticultura*, 58, 191-194.

Fernández-León, M.F., Fernández-León, A.M., Lozano Ruiz, M., Ayuso Yuste, M.C. and González-Gómez, D. (2012). Identification, quantification and comparison of the principal bioactive compounds and external quality parameters of two broccoli cultivars. *Journal of Functional Foods*, 4, 465-473.

Fernández-León, M.F., Lozano, M., Ayuso, M.C., Fernández-León, A.M. and González-Gómez, D. (2010). Fast and accurate alternative UV-chemometric method for the determination of Chlorophyll A and B in broccoli (*Brassica oleracea Italica*) and cabbage (*Brassica oleracea Sabauda*) plants. *Journal of Food Composition and Analysis*, 23, 809-813.

Fernández-León, M.F., Lozano, M., Ayuso, M.C. and González-Gómez, D. (2011b). Simultaneus Determination of Eleven Intact Glucosinolates in Fresh and Controlled Atmospheres Stored Broccoli Plants by HPLC-MS/MS. *36th International Symposiun on High-Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques*, P1-G, 250.

Fernández-León, A.M., Lozano, M., González, D., Ayuso, M.C. and Fernández-León, M.F. (2014). Bioactive compounds content and total antioxidant activity of two Savoy cabbages. *Czech Journal of Food Sciences*, 32, 549-554.

Ferruzzi, M.G., Böhm, V., Courtney, P.D. and Schwarts, S.J. (2002). Antioxidant and Antimutagenic Activity of Dietary Chlorophyll Derivatives Determined by Radical Scavenging and Bacterial Reverse Mutagenesis Assays. *JFS: Food Chemistry and Toxicology*, 67, 2589-2595.

Franke, A.A., Custer, L.J., Arakaki, C. and Murphy, S.P. (2004). Vitamin C and flavonoid levels of fruits and vegetables consumed in Hawaii. *Journal of Food Composition and Analysis*, 17, 1-35.

Fruton, J.S. (1971). Pepsin. In: B.P.D., The Enzymes (p. 138). *New York: Academic Press, INC*.

Garbetta, A., Capotorto, I., Cardinali, A., D'Antuono, I., Linsalata, V., Pizzi, F. and Minervini, F. (2014). Antioxidant activity induced by main polyphenols present in edible artichoke heads: influence of *in vitro* gastro-intestinal digestion. *Journal of Functional Foods*, 10, 456-464.

García Casal, M.N. (2015). Antioxidantes y enfermedades crónicas. *Revista de Nutrición Práctica*, 52.

García, M.I., González, J.A., Lozano, M., Ayuso, M.C., Bernalte, M.J., Pacheco, M., Calvo, P., Martínez, M.A., Benítez-Donoso, R. and Campillo, C. (2005). Comportamiento agronómico e industrial de cultivares de bróculi en las Vegas del Guadiana. *Actas Portuguesas de horticultura*, 5, 126-133.

García, M.I, Lozano, M., Montero de Espinosa, V., Ayuso, M. C., Bernalte, M.J., Vidal-Aragón, M.C. and Pérez, M.M. (2007). Agronomic characteristics and carotenoid content of five Bola-type paprika red pepper (*Capsicum annuum* L.) cultivars. *Scientia Horticulturae*, 113, 202-207.

Gil, M.I., Ferreres, F. and Tomás-Barberán, F.A. (1999). Effectofpostharvest storage and processing on the antioxidant constituents (flavonoids and vitamin C) of fresh-cut spinach. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 2213-2217.

Gil-Izquierdo, A., Zafrilla, P., Tomás-Barberán, F.A. (2002). An in vitro method to simulate phenolic compounds release from the food matrix in the gastrointestinal tract. *European Food Research and Technology*, 214, 155-159.

Gimeno Creus, E. (2004). Compuestos fenólicos. Un análisis de sus beneficios para la salud. *Farmacia y Salud, Oficina de Farmacia*, 23, 80-84.

Gökmen, V., Kahraman, N., Demir, N. and Acar, J. (2000). Enzymatically validated liquid chromatographic method for the determination of ascorbic and dehydroascorbic acids in fruit and vegetables. *Journal of Chromatography A*, 881, 309-316.

González-Gómez, D., Lozano, M., Fernández-León, A.M., Fernández-León, M.F. and Cañada-Cañada, F. (2012). PLS calibration to resolve overlapping peaks of lutein and zeaxanthin in vegetable samples by LC. *Czech Journal of Food Sciences*, 30, 358-363.

Heaney, R.P. (2001). Factors influencing the measurement of bioavailability, taking calcium as a model. *Journal of Nutrition*, 131, 1344S-1348S.

Holst, B. and Williamson, G. (2004). A critical review of the bioavailability of glucosinolates and related compounds. *Natural Product Reports*, 21, 425-447.

Holst, B. and Williamson, G. (2008). Nutrients and phytochemicals: from bioavailability to bioefficacy beyond antioxidants. *Current Opinion in Biotechnology*, 19, 73-82.

Huelin, F.E., Coggiola, I.M., Sidhu, G.S. and Kennett, H. (1971). The anaerobic decomposition of ascorbic acid in the pH range of foods and in more acid solutions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 22, 540-542.

Hughes, K. and Ong, C.N. (1998). Vitamins, selenium, iron, and coronary heart disease risk in Indians, Malays, and Chinese in Singapore. *Journal of Epidemiology and Community Health*, 52, 181-185.

Hurrell, R. and Egli, I. (2010). Iron bioavailability and dietary reference values. *American Journal of Clinical Nutrition*, 91, 1461S-1467S.

Hur, S.J., Lim, B.O., Decker, E.A. and McClements, D.J. (2011). In vitro human digestion models for food applications. *Food Chemistry*, 125, 1-2.

Jaramillo, J.E. y Díaz, C.A. (2005). El Cultivo de las Cruciferas. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, CORPOICA, Centro de Investigación La Selva, Rionegro, Antioquia, Colombia. Manual Técnico 4.

Jeffery, E. H., Brown, A.F., Kurilich, A.C., Keek, A.S., Matusheski, N. and Klein, B.P. (2003). Variation in content of bioactive components in broccoli. Study review. *Journal of Food Composition and Analysis*, 16, 323-330.

Jia, C.G., Xu, C.J., Wei, J., Yuan, J., Yuan, G.F., Wang, B.L. and Wang, Q.M. (2009). Effect of modified atmosphere packaging on visual quality and glucosinolates of broccoli florets. *Food Chemistry*, 114, 28-37.

Karakaya S. (2004). Bioavailability of phenolic compounds. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44, 453-464.

Keck, A.S. and Finley, J.W. (2004). Cruciferous Vegetables: cancer protective mechanisms of glucosinolates hydrolysis products and selenium. *Integrate Cancer Therapies*, 3, 5-12.

Khachik, F., Beecher, G.R. and Whittaker, N.F. (1986). Separation, identification, and quantification of the major carotenoid and chlorophyll constituents in extracts of several green vegetables by liquid chromatography. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 34, 603-616.

Kiddle, G.A., Bennett, R.N., Botting, N.P., Davidson, N.E., Robertson, A.A.B. and Wallsgrove, R.M. (2001). High performance liquid-chromatography separation of natural and synthetic desulfoglucosinolates and their chemical validation by spectroscopic, NMR, and CI–MS methods. *Phytochemycal Analysis*, 12, 226-242.

Koh, E., Wimalasiri, K.M.S., Chassy, A.W. and Mitchell, A.E. (2009). Content of ascorbic acid, quercetin, kaempferol and total phenolics in commercial broccoli. *Journal of Food Composition and Analysis*, 22, 637-643.

Kroon, P.A., Clifford, M.N., Crozier, A., Day, A.J., Donovan, J.L., Manach, C. and Williamson, G. (2004). How should we assess the effects of exposure to dietary polyphenols in vitro? *The American Journal of Clinical Nutrition*, 80, 15-21.

Kuntz, S., Wenzel, U. and Daniel, H. (1999). Comparative analysis of the effects of flavonoids on proliferation, cytotoxity, and apoptosis in human colon cancer cell lines. *European Journal of Nutrition*, 38, 133-142.

Kurilich, A.C., Tsau, G.J., Brown, A., Howard, L., Klein, B.P., Jeffery, E.H., Kushad, M., Wallig, M.A. and Juvik, J.A. (1999). Carotene, tocopherol, and ascorbate contents in subspecies of *Brassica oleracea*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 1576-1581.

Kushad, M.K., Brown, A.F., Kurilich, A.C., Juvik, J.A., Klein, B.P., Wallig, M.A. and Jeffery, E.H. (1999). Variation of glucosinolates in vegetable crops of *Brassica oleracea*. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 47, 1541-1548.

Lai, J., Butler, M.A. and Matney, T. (1980). Antimutagenic activities of common vegetables and their chlorophyll content. *Mutation Research*, 77, 245-250.

Lampe, J.W. (1999). Health effects of vegetables and fruit: assessing mechanisms of action in human experimental studies. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 70, 475S-490S.

Lee, J.B., Ahn, J., Lee, J. and Kwak, H.S. (2003). The microencapsulated ascorbic acid release in vitro and its effect on iron bioavailability. *Archives of Pharmacal Research*, 26, 874-879.

Lee, S.K. and Kader, A.A. (2000). Preharvest and postharvest factors influencing vitamin C content of horticultural crops. *Postharvest Biology and Technology*, 20, 207-220.

Lee, J., Koo. N. and Min, D.B. (2004). Reactive oxygen species aging, and antioxidative nutraceuticals. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 3, 21-33.

Levine, M., Conry-Cantilena, C., Wang, Y., Welch R.W., Washko, P.W., Dhariwal K.R., Park, J.B., Lazarev, A., Graumlich, J.K. (1996). Vitamin C pharmacokinetics in healthy volunteers: evidence for a Recommended Dietary Allowance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93, 3704-3709.

Lichtenthaler, H.K., Kuhn, G., Prenzel, U., Buschmann, C. and Meier, D. (1982). Adaptation of chloroplast-ultrastructure and chlorophyll-protein levels to high light and low light growth conditions. *Zeitschrift für Naturforschung - Section C: Biosciences*, 37C, 464-475.

Lima, V.L.A.G., Mélo, E.A., Maciel, M.I.S., Prazeres, F.G., Musser, R.S. and Lima, D.E.S. (2005). Total phenolic and carotenoid content in acerola genotypes harvested at three ripening stages. *Food Chemistry*, 90, 565-568.

López-Nicolás, R., González-Bermúdez, C.A., Ros-Berruezo, G. and Frontela-Saseta, C. (2014). Influence of *in vitro* gastrointestinal digestion of fruit juices enriched with pine bark extract on intestinal microflora. Food Chemistry, 157, 14-19.

Lozano, M., Ayuso, M.C., Bernalte, M.J., García, M.I., Hernández, M.T., Vidal-Aragón, M.C., González, J.A., García, J. y García, R.M. (2007). Superficie cultivada y ensayos de variedades más productivas de brócoli, coliflor y romanesco. Las brassicas, del cultivo tradicional hacia los nuevos retos. *Vida Rural*, 44-47.

Luceri, C., Giannini, L., Lodovici, M., Antonucci, E., Abbate, R., Masini, E. and Dolara P. (2007). p- Coumaric acid, a common dietary phenol, inhibits platelet activity in vitro and in vivo. *British Journal of Nutrition*, 97(3), 458-463.

MAGRAMA (2014a). Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. Datos de Producciónes. Página: http://www.magrama.gob.es/es/agricultura/temas/producciones-agricolas/frutas-y-hortalizas/#para0 (consultado en diciembre 2014).

MAGRAMA (2014b). Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. Anuario de Estadística. Página: http://www.magrama.gob.es/estadistica/pags/anuario/2013/AE_2013_Completo.pdf (consultado en diciembre 2014).

MAGRAMA (2014c). Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. Plan de Consumo Página: http://www.magrama.gob.es/es/alimentacion/temas/consumo-y-comercializacion-y-distribucion-alimentaria/PRESENTACION_DATOS_CONSUMO_2013_tcm7-321988.pdf CONSULTADO diciembre 2014 (consultado en diciembre 2014).

Maiani, G., Periago Caston, M.J., Catasta, G., Toti, E., Goñi Cambrodón, I., Bysted, A., Granado-Lorencio, F., Olmedilla-Alonso, B., Knuthsen, P., Valoti, M., Böhm, V., Mayer-Miebach, E., Behsnilian, D. and Schlemmer, U. (2009). Carotenoids: Actual knowledge on food sources, intakes, stability and bioavailability and their protective role in humans. *Molecular Nutrition and Food Research*, 53, S194-S218.

Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C. and Jiménez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*, 79:727-747.

Manach, C., Williamson, G., Morand, C. and Scalbert. A. (2005). Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. Il Rewiew of 97 bioavailability studies. *American Journal of Clinical Nutrition*, 81, 230S-242S.

Maroto, J.V. (1989). Horticultura Herbácea Especial. *Ediciones Mundi-Prensa. Madrid*.

Martínez, S., Olmos, I., Carballo, J. and Franco, I. (2010). Quality parameters of Brassica spp. grown in northwest Spain. *International Journal of Food Science and Technology*, 45, 776-783.

Martínez de Victoria Muñoz, E., Mañas Almendro, M. y Yago Torregrosa, M.D. (2005). Fisiología de la digestión. Editorial *Acción Médica*, Autor Ángel Gil Hernández, ISBN: 9788488336408.

Martínez Silva, E.C. y Bastidas Pacheco, G.A. (2009). Ácido ascórbico. Un alimento funcional. *Endocrinología y Nutrición. Portales médicos.com*.

Matón, A., Hopkins, J., McLaughlin, C.W., Johnson, S., Warner, M.Q., LaHart, D. and Wright, J.D. (1993). Human Biology and Health. *Englewood Cliffs, New Jersey*, USA: Prentice Hall.

Meléndez-Martínez, A.J., Vicario, I.M. y Heredia, F.J. (2004). Estabilidad de los pigmentos carotenoides en los alimentos. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 54.

Mikkelsen, M.D., Petersen, B., Olsen, C. and Halkier, B.A. (2002). Biosynthesis and metabolic engineering of glucosinolates. *Amino Acids*, 22, 279-95.

Mínguez-Mosquera, M.I. and Hornero-Méndez, D. (1993). Separation and quantification of the Carotenoid Pigments in Red Peppers (*Capsicum annuum* L.), Paprika and Oleoresin by Reversed-Phase HPLC. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41, 1616-1620.

Mithen, R. (1992). Leaf glucosinolate profiles and their relationship to pest and disease resistance in oilseed rape. *Euphytica*, 63, 71-83.

Monagas, M., Urpi-Sarda, M., Sanchez-Patan, F., Llorach, R., Garrido, I., Gomez-Cordoves, C., Andres-Lacueva, C., and Bartolome, B. (2010). Insights into the metabolism and microbial biotransformation of dietary flavan-3-ols and the bioactivity of their metabolites. *Food and Function*, 1(3), 233-253.

Moreno, D.A., Carvajal, M., López-Berenguer, C. and García-Viguera, C. (2006). Chemical and biological characterisation of nutraceutical compounds of broccoli. *Journal of Pharmaceutical Biomedical Analysis*, 41, 1508-1522.

Mosele, J.I., Marciá, A., Romero, M.P., Motilva, M.J. and Rubió, L. (2015). Application of *in vitro* gastrointestinal digestión and colonic fermentation models to pomerage products (juice, pulp and peel estract) to study the stability and catabolism of phenolic compounds. *Journal of Functional Foods*, 14, 529-540.

Murkovic, M., Gams, K., Draxl, S. and Pfannhauser, W. (2000). Development of an Austrian carotenoid database. *Journal of Food Composition and Analysis*, 13, 435-440.

Nelson, E.W., Lane, H., Fabri, P.J. and Scott, B. (1978). Demonstration of saturation kinetics in the intestinal absorption of vitamin C in man and the guinea pig. *Journal of Clinical Pharmacology*, 18, 325-335.

Noichinda S., Bodhipadma K., Mahamontri C., Narongruk, T. and Ketsab, S. (2007). Light during storage prevents loss of ascorbic acid, and increases glucose and fructose levels in Chinese kale (*Brassica oleracea* var. *alboglabra*). *Postharvest Biology and Technology*, 44, 312-315.

Nuez, F., Gómez Campo, C., Fernández de Córdova, P., Soler, S. y Valcárcel, J.V. (1999). Colección de semillas de coliflor y bróculi. *Ed. Instituto de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria. Madrid.*

O'Connell, O. F., Ryan, L. and O'Brien, N.M. (2007). Xanthophyll carotenoids are more bioaccessible from fruits than dark green vegetables. *Nutrition research (New York, N.Y.)*, 27, 258-264.

O'Sullivan, L., Jiwan M., Daly T.and O'Brien, N.M. (2010). Bioaccessibility, uptake, and transport of carotenoids from peppers (*Capsicum* spp.) using the coupled *in vitro* digestion and human intestinal Caco-2 cell model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 5374-5379.

Olivieri, A.C., Goicoechea, H.C. and Iñón, F.A. (2004). MVC1: an integrated MatLab toolbox for first-order multivariate calibration. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems,* 7, 189-197.

Olmedilla Alonso, B., Granado Lorencio, F. y Blanco Navarro, I. (2001). Carotenoides y salud humana. *Ed. Fundación española de nutrición* (FEN).

Ornelas-Paz, J.J., Yahia, E.M., Gardea-Béjar, A.A., Pérez-Martínez, J.D., Ibarra-Junquera, V., Escalante-Minakata, M.P., Ruiz-Cruz, S. y Ochoa-Reyes, E. (2012). Biodisponibilidad y actividad biológica de carotenoides y vitamina A. En: Emilio Alvarez Párrilla, Laura A. de la Rosa, Gustavo A. González Aguilar y J. Fernando Ayala Zavala (Eds*). Antioxidantes en alimentos y salud*. México D.F. p. 293-327.

Ou, B., Huang, D., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J.A. and Deemer, E.K. (2002). Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: A comparative study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* 50, 3122-3128.

Padayatty, S.J., Katz, A., Wang, Y., Eck, P., Kwon, O., Lee, J.H., Chen, S., Corpe, C., Dutta, A., Dutta, S.K. and Levine, M. (2003). Vitamin C as an antioxidant: evaluation of its role in disease prevention. *The Journal of the American College of Nutrition*, 22(1), 18-35.

Parada, J. and Aguilera, J.M. (2007). Food microstructure affects the bioavailability of several nutrients. *Journal of Food Science*, 72(2), 21-32.

Parker, R.S. (1996). Absorption, metabolism, and transport of carotenoids. *FASEB Journal*, 10, 542-551.

Passamonti, S., Vrhovsek, U. and Mattivi, F. (2002). The interaction of anthocyanins with bilitranslocase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 296, 631-636

Peláez, N., Álvarez, J. y De la Peña, V. (2006). Soporte nutricional en paciente con fístulas del tubo digestivo. Intestino corto. *En: BellidD, De Luis D, eds. Madrid. Díaz de Santos*, 349-362.

Pérez-Gálvez, A. y Mínguez-Mosquera, M.I. (2007). Clorofilas y carotenoides: des screening a la bioactividad tisular. Taller científico sobre alimentos e ingredientes funcionales. *Ed. Instituto de la grasa* (CSIC).

Pérez-Vicente, A., Gil-Izquierdo, A. and García-Viguera, C. (2002). In vitro gastrointestinal digestion study of pomegranate juice phenolic compounds, anthocyanins, and vitamin C. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 2308-2312.

Pharmacopeia. (2000). National formulatory (USP 24NF 19) MD, Us: Rockville.a.

Pineda Alonso, D., Salucci, M., Lázaro, R. Maiani, J. y Ferro-Lucci, A. (1999). Capacidad antioxidante y potencial de sinergismo entre los principales constituyentes antioxidantes de algunos alimentos. *Revista Cubana de Alimentación y Nutrición*, 13, 104-111.

Podsedek, A. (2007). Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: A review. *LWT-Food Science and Technology*, 40, 1-11.

Podsedek, A., Sosnowska, D., Redzynia, M. and Anders, B. (2006). Antioxidant capacity and content of *Brassica oleracea* dietary antioxidants. International *Journal of Food Science and Technology*, 41, 49-58.

Prior, R.L. (2003). Fruits and vegetables in the prevention of cellular oxidative damage. *American Journal of Clinical Nutrition*, 78, 570S-578S.

Queipo-Ortuño, M.I., Boto-Ordóñez, M., Murri, M., Gomez-Zumaquero, J. M., Clemente-Postigo, M., Estruch, R., Cardona-Díaz, F., Andrés-Lacueva, C. and Tinahones, F.J. (2012). Influence of red wine polyphenols and ethanol on the gut microbiota ecology and biochemical biomarkers. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 95, 1323-1334, doi: 10.3945/ajcn.111.027847.

Rashidinejad, A., Birch, E., Sun-Waterhouse, D. and Everett, D.W. (2015). Total phenolic content and antioxidant properties of hard low-fat cheese fortified with catechin as affected by *in vitro* gastrointestinal digestion. *LWT-Food Science and Technology*, 62, 393-399.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. and Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26, 1231-1237.

Reglamento (CE) Nº 1924/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 20 de diciembre de 2006, relativo a las declaraciones nutricionales y de propiedades saludables en los alimentos.

Reglamento (UE) Nº 1169/2011 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 25 de octubre de 2011 , sobre la información alimentaria facilitada al consumidor y por el que se modifican los Reglamentos (CE) nº 1924/2006 y (CE) nº 1925/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo, y por el que se derogan la Directiva 87/250/CEE de la Comisión, la Directiva 90/496/CEE del Consejo, la Directiva 1999/10/CE de la Comisión, la Directiva 2000/13/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, las Directivas 2002/67/CE, y 2008/5/CE de la Comisión, y el Reglamento (CE) nº 608/2004 de la Comisión Texto pertinente a efectos del EEE.

Rice-Evans, C.A., Sampson, J., Bramley, P.M. and Holloway, D.E. (1997). Why do we expect carotenoides to be antioxidants in vivo?. *Free Radical Research*, 26, 381-398.

Roberfroid, M.B. (2002). Global view on functional foods: European. *British Journal of Nutrition*. 2002 Nov; 88 Suppl 2:S133-8.

Rodríguez-Amaya D (1999). Changes in carotenoids during processing and storage of foods. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 49: 38-47.

Saura-Calixto, F., Serrano, J. and Goñi, I. (2007). Intake and bioaccessibility of total polyphenols in a whole diet. *Food Chemistry*, 101, 492-501.

Selma, M.V., Espín, J.C. and Tomás-Barberán, F.A. (2009). Interaction between phenolics and gut microbiota: role in human health. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 12, 6485-6501.

Scalbert, A. and Williamson, G. (2000). Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *Journal of Nutrition*, 130, 2073S-2085S.

Singh, J., Upadhyay, A.K., Bhadur, A., Singh, B. Singh, K.P. and Mathura, R. (2006). Antioxidant phytochemicals in cabbage (*Brasscia oleracea* L. var. *capitata*). *Scientia Horticulturae*, 108, 233-237.

Singh, J., Upadhyay, A.K., Prasad, K., Bahadur, A. and Rai, M. (2007). Variability of carotenes, vitamin C, E and phenolics in Brassica vegetables. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20, 106-112.

Singleton, V.L. and Rossi, J.A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144-158.

Sonderby, I.E., Geu-Flores, F. and Halkier, B.A. (2010). Biosynthesis of glucosinolates-gene discovery and beyond. *Trends in Plant Science*, 15, 283-290.

Soriano Sancho, R.A., Pavan, V. and Pastore, G.M. (2015). Effect of *in vitro* digestion on bioactive compounds and antioxidant activity of common bean seed coats. *Food Research International*, 76, 74-78.

Sousa, C., Taveira, M., Valentao, P., Fernades, F., Pereira, J.A., Estevinho, L., Bento, A., Ferreres, F., Seabra, R.M. and Andrade, P.B. (2008). Inflorescences of Brassicacea species as source of bioactive compounds: A comparative study. *Food Chemistry*, 110, 953-961.

Stahl, W., van den Berg, H., Arthur, J., Bast, A., Dainty, J., Faulks, R.M., Gärtner, C., Haenen, G., Hollman, P., Holst, B., Kelly, F.J., Polidori, M.C., Rice-Evans, C., Southon, S., van Vliet, T., Viña-Ribes, J., Williamson, G. and Astley, S.B. (2002). Bioavailability and metabolism. *Molecular Aspects of Medicine*, 23(1-3), 39-100.

Steinmetz, K.A. and Potter, J.D. (1996). Vegetables, fruit, and cancer prevention: A review *Journal of the American Dietetic Association*, 96, 1027-1039.

Stinco, C.M., Fernández-Vázquez, R., Escudero-Gilete, M.L., Heredia, F.J., Meléndez-Martínez, A.J. and Vicario, I.M. (2012). Effect of orange juice's processing on the color, particle size, and bioaccessibility of carotenoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60 (6), 1447-1455.

Tajmir-Riahi, H.A., Neault, J.F. and Diamantoglou, S. (2004). DNA adducts with chlorophyllin as antimutagenic agents: synthesis, stability, and structural features. *Methods in Molecular Biology*, 274, 159-171.

Tian, Q., Rosselot, R.A. and Schwartz, S.J. (2005). Quantitative determination of intact glucosinolates in broccoli, broccoli sprouts, Brussels sprouts and cauliflower by high-performance liquid chromatography-.electrospray ionization-tadem mass spectrometry. *Analytical Biochemistry*, 343, 93-99.

USDA/ARS. (2006). U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service. National Nutrient Database for Standard Reference, Release 19. Retrieved January 11, 2007 from the Nutrient Data Laboratory Home Page: http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/cgi-bin/list_nut_edit.pl.

USDA/ARS. (2007). U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service. Database for the Flavonoid Content of Selected Foods, Release 2.1. Retrieved March 20, 2007 from the Nutrient Data Laboratory Home Page: http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/data/flav/flav02-1.pdf.

Vallejo, F., Tomás-Barberán, F.A. and García-Viguera, C. (2002). Potential bioactive compounds in health promotion from broccoli cultivars grown in Spain. *Journal of the Science and Food and Agriculture*, 82, 1293-1297.

Vallejo, F., García-Viguera, C. and Tomás-Barberán, F.A. (2003a). Changes in broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*) health-promoting compounds with inflorescence development. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 3776-3782.

Vallejo, F., Tomás-Barberán, F.A. and García-Viguera, C. (2003c). Health-promoting compounds in broccoli as influenced by refrigered transport and retail sale period. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 3029-3034.

Vallejo, F., Tomás-Barberán, F.A. and García-Viguera, C. (2003d). Phenolic compound contents in edible parts of broccoli inflorescences after domestic cooking. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83, 1511-1516.

Vallejo, F., Tomás-Barberán, F.A., González, A. and García-Viguera, C. (2003b). Total and individual glucosinolate contents in inflorescences of eight broccoli cultivars grown under various climatic and fertilisation conditions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83, 307-313.

Vallejo, F., Gil-Izquierdo, A., Peréz-Vicente, A. and García-Viguera, C. (2004). In Vitro Gastrointestinal Digestion Study of Broccoli Inflorescence Phenolic Compounds, Glucosinolates, and Vitamin C. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 135-138.

Vanderslice, J.T., Higgs, D.J., Hayes, J.M. and Block, G. (1990). Ascorbic acid and dehydroascorbic acid content of foods-aseaten. *Journal of Food Composition and Analysis*, 3, 105-118.

Verkerk, R., Schreiner, M., Krumbein, A., Ciska, E., Holst, B., Rowland, I., De Schrijver, R., Hansen, M., Gerhäuser, C., Mithen, R. and Dekker, M. (2009). Review Glucosinolates in Brassica vegetables: The influence of the food supply chain on intake, bioavailability and human health. *Molecular Nutrition and Food Research*, 53, S219-S265.

Vidal Carou, M.C. (2008). Alimentos funcionales. Algunas reflexiones en torno a su necesidad, seguridad y eficacia y a cómo declarar sus efectos sobre la salud. *HUMANITAS. Humanidades médicas*, 24, 1-27.

Vinson, J.A., Dabbagh, Y.A., Serry, M.M. and Jang, J. (1995). Plant flavonoids, especially tea flavonols, are powerful antioxidants using an in vitro oxidation model for heart disease. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 43, 2800-2802.

Wilson, J.X. (2005). Regulation of vitamin C transport. *Annual Review of Nutrition*, 25, 105-125.

Wittstock, U. and Halkier, B.A. (2002). Glucosinolate research in the *Arabidopsis era*. *Trends in Plant Science*, 7, 263-270.

Wollowski, K., R cemmer, G., Pool-Zobel, B.L. (2001). Protective rol of probiotics and prebiotics in colon cancer. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73, 451S-455S.

Wong, G.Y.C., Bradlow, L., Sepkovic, D., Mehl, S., Mailman, J. and Osborne, M.P. (1998). Dose ranging study of indole-3-carbinol for breast cancer prevention. *Jounal of Cellular Biochemistry*, 28-29, 111-116.

Wu, X., Beecher, G.R., Holden, J.M., Haytowitz, D.B., Gebhardt, S.E. and Prior, R.L. (2004). Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 52, 4026-4037.

www.nutricion.pro/alimentacion/el-aparato-digestivo-funcionamiento/

www.uco.es/master_nutricion/nb/Gil%20Hernandez/digestion.pdf (Fisiología de la Digestión)

Yahia, E.M. and Ornelas-Paz, J.J. (2010). Chemistry, stability and biological actions of carotenoids. En: L.A. de la Rosa, E. Alvarez-Parrilla y G.A. González- Aguilar (Eds). Fruit and vegetable phytochemicals: Chemistry, nutritional value and stability. USA: Blackwell Publishing. P 177-222.

Yeum, K.J. and Russell, R.M. (2002). Carotenoid bioavailability and bioconversion. *Annual Review of Nutrition*, 22, 483-504.

Yung, S., Mayersohn, M. and Robinson, B. (1982). Ascorbic acid absorption in humans: a comparison among several dosage forms. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 71 (3), 282-285.

Zapata, S. and Dufour, J.F. (1992). Ascorbic, deydroascorbic and isoascorbic acid simultaneous determinations by reverse phase ion interaction HPLC. *Journal of Food Science*, 57, 506-511.

Zhuang, H., Hildebrand, D.F. and Barth, M.M. (1995). Senescence of broccoli buds is related to changes in lipid peroxidation. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 43, 2585-2591.