



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO**

**DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA  
INSTITUTO DE HORTICULTURA**

**EFFECTO DEL EXTRACTO DE JUGO DE BRÓCOLI EN LA  
INHIBICIÓN DE *Alternaria alternata* (Fries) EN ARÚGULA  
(*Eruca sativa* Mill.) MÍNIMAMENTE PROCESADA**

**TESIS**

**QUE COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**DOCTOR EN CIENCIAS EN HORTICULTURA**

**PRESENTA:**

**MARÍA ANTONIA FLORES CÓRDOVA**

**CHAPINGO, ESTADO DE MÉXICO. DICIEMBRE 2013**



**DIRECCION GENERAL ACADEMICA  
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES  
ORIGINA DE EXAMENES PROFESIONALES**



**Instituto de Horticultura**

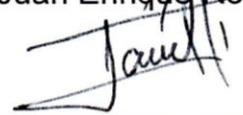
EFFECTO DEL EXTRACTO DE JUGO DE BRÓCOLI EN LA INHIBICIÓN  
DE *Alternaria alternata* (Fries) EN ARÚGULA (*Eruca sativa* Mill.)  
MÍNIMAMENTE PROCESADA

Tesis realizada por Maria Antonia Flores Córdova, bajo la dirección del  
Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como  
requisito parcial para obtener el grado de:

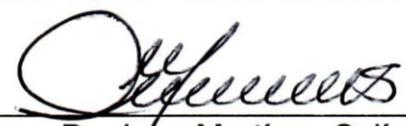
DOCTOR EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

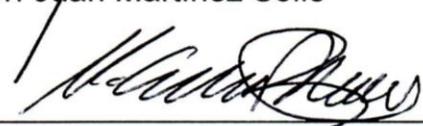
DIRECTOR:   
Dra. Maria Teresa Martínez Damián

ASESOR:   
Dr. Juan Enrique Rodríguez Pérez

ASEROR:   
Dr. Daniel Nieto Ángel

ASESOR:   
Dra. Maria Teresa Colinas León

ASESOR:   
Dr. Juan Martínez Solís

LECTOR EXTERNO:   
Dra. Gisela Peña Ortega

Chapingo, México, Diciembre de 2013.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi Dios padre: Por darme la fortaleza para afrontar los problemas con una sonrisa. Por permitirme vivir al día de hoy y aprender que la paciencia es una espera constante, del que nada desea porque todo lo tiene.

A mis maestros y consejeros y a la Dra. Maria Teresa Martínez, porque cada uno aportó sus conocimientos y experiencias para que pudiera llevarse a cabo este trabajo, sin su ayuda jamás hubiese sido posible.

A todos los compañeros que compartieron conmigo grandes momentos, de luchas y esfuerzos y de gran amistad que encontré con ellos.

A David quien me brindó el apoyo más grande, su amor, paciencia y dedicación en todo momento.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por otorgarme el apoyo económico para la conclusión de mis estudios de doctorado.

## **DATOS BIOGRÁFICOS**

La autora de la presente Tesis, Lic. María Antonia Flores Córdova, nació en la Ciudad de Chihuahua, Chih. Realizó sus estudios de Licenciatura en la Universidad Autónoma de Chihuahua, donde cursó la carrera de Licenciado en Administración Agrotecnológica del 2002 al 2006. Realizó sus estudios de Maestría en la Universidad Autónoma Chihuahua, durante el periodo 2007 a 2009. En el 2010 ingreso al Doctorado en Ciencias en Horticultura, en el Instituto de Horticultura del Departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo.

## DEDICATORIA

Para mi adorada y bellísima familia, porque compartir con ustedes este logro es lo mejor que me ha pasado en la vida.

Por darme la fuerza que necesité para seguir adelante y motivarme.  
Por el apoyo en todo momento, por sus palabras y presencia que llena mi vida entera.

Con todo mi amor y la más grande admiración para Ustedes.

# EFFECTO DEL EXTRACTO DE JUGO DE BRÓCOLI EN LA INHIBICIÓN DE *Alternaria alternata* (Fries) EN ARÚGULA (*Eruca sativa* Mill.) MÍNIMAMENTE PROCESADA

## EFFECT OF BROCCOLI EXTRACT JUICE IN THE INHIBITION of *Alternaria alternata* (Fries) IN ARÚGULA (*Eruca sativa* Mill.) MINIMALLY PROCESSED

María Antonia Flores Cordova<sup>1</sup> y María Teresa Martínez Damián<sup>2</sup>

### RESUMEN GENERAL

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto del jugo de brócoli (glucosinolatos) en la inhibición de *Alternaria in vitro* y en vivo. *In vitro* las esporas del hongo fueron colocadas en PDA, con diferentes concentraciones de jugo de brócoli: 0.15, 0.11, 0.07, 0.04, 0.01 y 0 µg/µl. Como resultado se obtuvo que la concentración 0.07 µg/µl inhibió en un 100 % la germinación de esporas de *Alternaria alternata* a las 6 horas de evaluación. En vivo la calidad postcosecha de Arúgula almacenada a 0, 4 °C y temperatura ambiente por 15 días, fue estimada mediante inoculación de esporas de *Alternaria* con concentraciones de: 2.98 µg/ml + inóculo; 1.49 µg/ml + inóculo; con solución de esporas de *Alternaria* (1x10<sup>6</sup>) y testigo. La severidad e incidencia del daño se evaluó cada tercer día mediante ángulo hue, croma, luminosidad, clorofilas, CO<sub>2</sub>, etileno, ácido ascórbico, capacidad antioxidante, fenoles, vitamina C, etanol, y acetaldehído, fueron las variables a medir en la Arúgula. La concentración de 2.98 µg/ml y la temperatura de 0 °C permitieron que se conservaran los parámetros de calidad en excelentes condiciones al final del almacenamiento y con 0 % de daño por hongos.

Palabras clave: Antifúngico, Arúgula, Sólidos solubles, calidad

<sup>1</sup>Tesista <sup>2</sup>Director

### GENERAL ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the effect of broccoli juice (glucosinolates) in the inhibition of *Alternaria in vitro* and in vivo. *In vitro* fungal spores were placed on PDA, with different concentrations of broccoli juice: 0.15, 0.11, 0.07, 0.04, 0.01 y 0 µg/µl. The concentration 0.07 µg/µl inhibited in 100% inhibited spore germination of *Alternaria alternata* at 6 hours of evaluation. In vivo evaluation was performed postharvest evaluating quality of arugula stored at 0, 4 °C and room temperature for 15 days. Inoculation was estimated by inoculating of *Alternaria* spores were done using concentrations of 2.98 µg/ml + inoculum, 1.49 µg/ml + inoculum *Alternaria* spore solution (1x10<sup>6</sup>) and control. The severity and incidence of fungus damage was assessed every third day by angle hue, chrome, brightness, chlorophyll, CO<sub>2</sub>, ethylene, ascorbic acid, antioxidant capacity, phenols, vitamin C, ethanol and acetaldehyde. The concentration of 2.98 µg/ml and temperature of 0 °C kept post-harvest were the quality parameters kept in excellent conditions at the end of storage and produced 0 % of fungus damage.

Key words: Antifungal, Arugula, soluble solids, quality

<b>CONTENIDO</b>	<b>PAG</b>
AGRADECIMIENTOS.....	iii
DATOS BIOGRÁFICOS.....	iv
DEDICATORIA.....	v
RESUMEN GENERAL Y ABSTRACT.....	vi
INDICE DE CONTENIDO.....	vii
INDICE DE CUADROS.....	x
INDICE DE FIGURAS.....	xiii
INDICE DE ANEXO.....	xiv
1. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
2. EFECTO DEL JUGO DE BRÓCOLI SOBRE LA GERMINACIÓN DE ESPORAS DE <i>Alternaria alternata</i> IN VITRO AISLADA DE A RÚGULA...	5
2.1 RESUMEN.....	6
2.2 ABSTRACT.....	6
2.3 INTRODUCCIÓN.....	7
2.4 MATERIALES Y MÉTODOS.....	10
2.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	18
2.6 CONCLUSIONES.....	24
2.7 LITERATURA CITADA.....	25

3. EFECTO DEL JUGO DE BRÓCOLI EN LA INHIBICIÓN DE <i>Alternaria alternata</i> EN ARÚGULA MÍNIMAMENTE PROCESADA. I CALIDAD POSTCOSECHA.....	30
3.1 RESUMEN.....	31
3.2 ABSTRACT.....	31
3.3 INTRODUCCIÓN.....	32
3.4 MATERIALES Y MÉTODOS.....	34
3.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	39
3.6 CONCLUSIONES.....	54
3.7 LITERATURA CITADA.....	54
4. EFECTO DEL JUGO DE BRÓCOLI EN LA INHIBICIÓN DE <i>Alternaria alternata</i> EN ARÚGULA MÍNIMAMENTE PROCESADA. II FISIOLOGÍA POSTCOSECHA.....	60
4.1 RESUMEN.....	61
4.2 ABSTRACT.....	61
4.3 INTRODUCCIÓN.....	62
4.4 MATERIALES Y MÉTODOS.....	64
4.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	71
4.6 CONCLUSIONES.....	91

4.7 LITERATURA CITADA.....	92
5. CONCLUSIONES GENERALES.....	97
6. LITERATURA CITADA GENERAL.....	97
7. ANEXOS.....	100

## ÍNDICE DE CUADROS

PAG

### 1. EFECTO DEL JUGO DE BRÓCOLI SOBRE LA GERMINACIÓN DE ESPORAS DE *Alternaria alternata* IN VITRO AISLADA DE ARÚGULA

Cuadro 1	Concentración del extracto de jugo de brócoli, para determinar el efecto de inhibición sobre la germinación de esporas de <i>Alternaria</i> .....	17
Cuadro 2	Porcentaje de inhibición y germinación de esporas de <i>Alternaria</i> en diferentes concentraciones del jugo de brócoli (Glucosinolatos).....	20

### 2. EFECTO DEL JUGO DE BRÓCOLI EN LA INHIBICIÓN DE *Alternaria alternata* EN ARÚGULA MÍNIMAMENTE PROCESADA. I CALIDAD POSTCOSECHA.

Cuadro 1	Efecto de las diferentes concentraciones de GLs y temperaturas de almacenamiento en la severidad de daño de <i>A. alternata</i> en hojas de Arúgula.....	43
Cuadro 2	Efecto de las diferentes concentraciones de GLs y temperaturas de almacenamiento en la incidencia de <i>A. alternata</i> en hojas de Arúgula.....	45
Cuadro 3	Efecto de las diferentes concentraciones de GLs y temperaturas de almacenamiento en ángulo hue de hojas de Arúgula.....	47
Cuadro 4	Efecto de las diferentes concentraciones de GLs y temperaturas de almacenamiento en el croma de hojas de Arúgula.....	48
Cuadro 5	Efecto de las diferentes concentraciones de GLs y temperaturas de almacenamiento en la luminosidad de hojas de Arúgula.....	49
Cuadro 6	Efecto de las diferentes concentraciones de GLs y	

	temperaturas de almacenamiento en el contenido total de clorofila en hojas de Arúgula.....	51
Cuadro 7	Efecto de las diferentes concentraciones de GLs y temperaturas de almacenamiento en % CO <sub>2</sub> , en hojas de Arúgula.....	52
Cuadro 8	Efecto de las diferentes concentraciones de GLs y temperaturas de almacenamiento en la producción de etileno, en hojas de Arúgula.....	53
3. EFECTO DEL JUGO DE BRÓCOLI EN LA INHIBICIÓN DE <i>Alternaria alternata</i> EN ARÚGULA MÍNIMAMENTE PROCESADA. II FISIOLOGIA POSTCOSECHA.		
Cuadro 1	Efecto de las diferentes concentraciones de GLs y temperaturas de almacenamiento en la severidad de daño de <i>A. alternata</i> en hojas de Arúgula.....	75
Cuadro 2	Efecto de las diferentes concentraciones de GLs y temperaturas de almacenamiento en la incidencia de <i>A. alternata</i> en hojas de Arúgula.....	77
Cuadro 3	Efecto de las diferentes concentraciones de GLs y temperaturas de almacenamiento en la acidez titulable de hojas de Arúgula.....	78
Cuadro 4	Efecto de las diferentes concentraciones de GLs y temperaturas de almacenamiento en sólidos solubles en hojas de Arúgula.....	80
Cuadro 5	Efecto de las diferentes concentraciones de GLs y temperaturas de almacenamiento en capacidad antioxidante en hojas de Arúgula.....	81
Cuadro 6	Efecto de las diferentes concentraciones de GLs y temperaturas de almacenamiento del contenido de vitamina C en hojas de Arúgula.....	82

Cuadro 7	Efecto de las diferentes concentraciones de GLs y temperaturas de almacenamiento en el contenido de fenoles en hojas de Arúgula.....	84
Cuadro 8	Efecto de las diferentes concentraciones de GLs y temperaturas de almacenamiento en el contenido de acetaldehído en hojas de Arúgula.....	85
Cuadro 9	Efecto de las diferentes concentraciones de GLs y temperaturas de almacenamiento en el contenido de etanol en hojas de Arúgula.....	86
Cuadro 10	Efecto de las diferentes concentraciones de GLs y temperaturas de almacenamiento en la pérdida de peso en hojas de Arúgula.....	87
Cuadro 11	Efecto de las diferentes concentraciones de GLs y temperaturas de almacenamiento en la calidad de Arúgula medido a través de promedios de rangos de Kruskal-Wallis.....	88
Cuadro 12	Efecto de las diferentes concentraciones de GLs y temperaturas de almacenamiento en el amarillamiento de Arúgula medido a través de promedios de rangos de Kruskal-Wallis.....	89
Cuadro 13	Efecto de las diferentes concentraciones de GLs y temperaturas de almacenamiento en el aroma de Arúgula medido a través de promedios de rangos de Kruskal-Wallis.....	90
Cuadro 14	Efecto de las diferentes concentraciones de GLs y temperaturas de almacenamiento en la pudrición de Arúgula medido a través de promedios de rangos de Kruskal-Wallis.....	91

## ÍNDICE DE FIGURAS

PAG

### 1. EFECTO DEL JUGO DE BRÓCOLI SOBRE LA GERMINACIÓN DE ESPORAS DE *Alternaria alternata* IN VITRO AISLADA DE ARÚGULA

Figura 1 A) hojas de Arúgula inoculadas con *Alternaria*. B) fotomicrografía de conidios, C) cadenas de conidios y conidióforos..... 19

Figura 2 Efecto de glucosinolatos (jugo de brócoli) en la inhibición de *Alternaria alternata* a) esporas de *Alternaria* en PDA a las 6 horas con una concentración de 0.15 µg/µl b) crecimiento del hongo a los 3 días, solo o con diferentes concentraciones de jugo de brócoli. c) esporas de *Alternaria alternata* en PDA a las 6 horas (control)..... 22

### 2. EFECTO DEL JUGO DE BRÓCOLI EN LA INHIBICIÓN DE *Alternaria alternata* EN ARÚGULA MÍNIMAMENTE PROCESADA. I CALIDAD POSTCOSECHA.

Figura 1 a) Efecto de las concentraciones de jugo de brócoli en la inhibición de la germinación de esporas de *Alternaria alternata* en hojas en vivo de Arúgula (*Eruca sativa*). b) efecto de las concentraciones de jugo de brócoli a través del tiempo en el porcentaje de germinación de esporas de *Alternaria alternata* en Arúgula..... 41

### 3. EFECTO DEL JUGO DE BRÓCOLI EN LA INHIBICIÓN DE *Alternaria alternata* EN ARÚGULA MÍNIMAMENTE PROCESADA. II FISIOLOGIA POSTCOSECHA.

Figura 1 a) Efecto de las concentraciones de jugo de brócoli en la inhibición de la germinación de esporas de *Alternaria alternata* en hojas en vivo de Arúgula (*Eruca sativa*). b) efecto de las concentraciones de jugo de brócoli a través del tiempo en el porcentaje de germinación de esporas de *Alternaria alternata* en Arúgula..... 73

## ÍNDICE DE ANEXOS

PAG

Cuadro 1A	Cuadrados medios y significancia estadística de la severidad evaluada en hojas de Arúgula.....	100
Cuadro 2A	Cuadrados medios y significancia estadística de la incidencia evaluada en hojas de Arúgula.....	100
Cuadro 3A	Cuadrados medios y significancia estadística de los parámetros evaluados en hojas de Arúgula mínimamente procesada.....	101
Cuadro 4A	Diferencias entre temperaturas de las variables evaluadas en hojas de arúgula mínimamente procesada.....	103
Cuadro 5A	Diferencias entre concentraciones de las variables evaluadas en hojas de arúgula mínimamente procesada....	104
Cuadro 6A	Comparaciones entre temperatura y concentraciones evaluadas en de hojas de Arúgula en refrigeración a tres temperaturas (0, 4 y 22 °C ) .....	105

## CAPÍTULO I

### 1. INTRODUCCIÓN GENERAL

El consumidor de productos vegetales precortados, también llamados mínimos procesados, espera un alimento cuyas características de apariencia, aroma, sabor y textura sean idénticas o muy próximas a los productos frescos.

Sin embargo con el crecimiento en su demanda también han surgido nuevos problemas de contaminación microbiana. La calidad y seguridad microbiológica de los productos vegetales frescos cortados es un aspecto esencial en su procesamiento y distribución, su contaminación puede ocurrir en cualquier punto entre el cultivo y el consumo de los mismos. Para lograr productos de alta calidad que cumplan con estos requisitos es necesaria la puesta en práctica de métodos de conservación con bajo impacto sobre el alimento y a menudo una combinación inteligente de ellos (González-Aguilar, 2005).

Hoy en día los consumidores demandan productos vegetales como la Arúgula, (*Eruca sativa* Mill.), perteneciente a la familia *Brassicaceae*, originaria de la región Mediterránea, que se distribuye en todo el mundo. En Japón la Arúgula ha demostrado ser una planta útil de potencial económico desde 1990 debido a su sabor ligeramente picante y ciclo biológico corto (40 a 60 días) (Kim *et al.*, 2004). Las hojas y tallos jóvenes se comen en ensaladas y son especialmente apreciados por su sabor único, poco picante (Char *et al.*, 2012) consumida en Italia, como un ingrediente en la pizza. La Arúgula ha aparecido en los mercados estadounidenses de California (Morales y Janick 2002) y se puede

encontrar en los supermercados selectos de México como una especialidad verde. Además se considera que el consumo de plantas aromáticas en la dieta diaria tiene un efecto benéfico para la salud, ya que son una excelente fuente de vitaminas, antioxidantes, minerales y fibra, además de poseer bajo contenido calórico (Herrero y Romero 2006). La Arúgula presentó un cultivo de gran relevancia con importantes cualidades para ser procesada en esta modalidad, comercializada ya sea sola o en mezcla para ensaladas (Nicola *et al.*, 2010). Desafortunadamente esta hierba es susceptible al deterioro, así como al daño causado por *Alternaria*, hongo patógeno que causa la pérdida de calidad del producto, y acorta el tiempo de vida de anaquel. Motivo por el cual se consideró el uso de la refrigeración durante el almacenamiento (Kader, 2003) siendo eficiente en la disminución de las alteraciones mecánicas, microbiológicas y biológicas, de tal modo que actualmente es una alternativa ampliamente utilizada durante el manejo postcosecha (Tonoiven, 2004).

Por otra parte el uso indiscriminado de compuestos que afectan la salud humana y el ambiente tiende a disminuirse en todos los eslabones de la cadena alimentaria y se buscan otras alternativas. Una de ellas es el uso de derivados de origen natural para el control de enfermedades. Las plantas, en su evolución han desarrollado mecanismos de defensa contra insectos, hongos, bacterias y otros organismos nocivos, y los metabolitos secundarios producidos por ellas constituyen una de esas barreras (Chirinos, 2009).

Los glucosinolatos son una serie de compuestos del metabolismo secundario de las plantas principalmente del orden de los *Capparales* como las pertenecientes a la familia *Brassicale*; estos compuestos se se clasifican como

S-glucósidos, ya que son el resultado del enlace de un azúcar reductor y el azufre de una molécula que no tiene carácter de hidrato de carbono (conocida como aglucona). Estos compuestos no son volátiles y carecen de fragancia, se sintetizan y almacenan en las plantas como precursores relativamente estables de los isotiocianatos. Los glucosinolatos son solubles en agua debido a que la molécula de glucosa imparte características hidrofílicas a diferencia de los isotiocianatos que presentan propiedades hidrofóbicas; se hidrolizan cuando el tejido del vegetal se rompe a consecuencia de un daño mecánico, entonces la enzima mirosina se pone en contacto con el sustrato y libera moléculas de glucosa, de bisulfato y de la correspondiente aglucona; posteriormente, ésta última experimenta un acomodo intramolecular que genera isotiocianatos, nitrilos, metil isotiocianatos, metil nitrilos y tiocianatos (todos de bajo peso molecular), los cuales son responsables del aroma y olor típico de estos productos. Los glucosinolatos intactos tienen actividad biológica limitada, pero aumentan su actividad cuando son hidrolizados a isotiocianatos. El brócoli es la principal fuente natural de los mismos, los cuales constituyen más del 80 % de los glucosinolatos totales presentes en este vegetal (Campas-Baypoli, 2009). También han sido identificados como los agentes responsables de la reducción de riesgo de cáncer en personas que consumen dietas ricas en vegetales crucíferos (Falk *et al.*, 2004). Adicionalmente, tienen la propiedad de controlar el crecimiento de microorganismos patógenos tales como *Fusarium* spp., *Alternaria* spp., *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp y *Rhizopus* spp., que han sido reportados como agentes causantes de enfermedades producidas por los alimentos y/o descomposición de los mismos (Viuda-Martos *et al.*, 2007).

La actividad antimicrobiana de estos compuestos se debe a que atacan la pared celular, membrana celular, enzimas metabólicas, la síntesis de proteína y el sistema génico. Cada uno de estos puntos, son esenciales para el desarrollo celular, por lo tanto si uno es atacado o inactivado la velocidad de crecimiento del microorganismo se ve minimizada (Rodríguez-Sauceda, 2011). Es por ello, que se ha considerado de interés el estudio de técnicas combinadas, como la aplicación de refrigeración y el uso de extracto de jugo de brócoli en la conservación y vida de anaquel de Arúgula.

## **CAPITULO II**

### **2. EFECTO DEL JUGO DE BRÓCOLI SOBRE LA GERMINACIÓN DE ESPORAS DE *Alternaria alternata* IN VITRO AISLADAS DE ARÚGULA**

## 2.1 RESUMEN

El hongo *Alternaria alternata*, es considerado uno de los principales patógenos de plantas, ocasiona el síntoma de la mancha de la hoja, en hortalizas de hoja, a nivel mundial. Los glucosinolatos son productos naturales, derivados del brócoli, que contienen nitrógeno y azufre, y se ha comprobado su actividad antifúngica en otras investigaciones. Con base en lo anterior, el presente trabajo tuvo como objetivo evaluar la eficacia del jugo de brócoli *in vitro* en el control de *Alternaria*. Para la realización del experimento se colectaron hojas de Arúgula, con síntomas de la mancha de la hoja de las cuales se aisló e identificó al hongo *Alternaria* sp. Las esporas del hongo fueron colocadas en PDA, con diferentes concentraciones de glucosinolatos (jugo de brócoli) 0.15, 0.11, 0.07, 0.04, 0.01 y 0  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Como resultado se obtuvo que las concentraciones 0.07, 0.11 y 0.15  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  inhibieron en un 100 % la germinación de esporas de *Alternaria alternata* a las 6 horas de evaluación. La concentración letal media  $\text{CL}_{50}$  fue de 0.028  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Como conclusión se puede mencionar que los glucosinolatos (jugo de brócoli) poseen un potencial antifúngico y pueden ser usados como tratamiento en postcosecha con el fin de disminuir los daños causados por *Alternaria* en Arúgula.

**Palabras clave adicionales:** *Eruca sativa*, glucosinolatos, antifúngico, identificación molecular, inhibición

## 2.2 ABSTRACT

The fungus *Alternaria alternata*, is considered one of the major plant pathogens, causing the symptom of leaf spot in leafy vegetables worldwide. The glucosinolates are natural products derived from broccoli, which contain nitrogen and sulfur, and have proven their antifungal activity in previous studies. Therefore, in this study the main objective was to evaluate the effectiveness of broccoli juice in the control of *Alternaria in vitro*. Conditions were collected to carry out the experiment were collected Arugula leaves with symptoms of leaf spot of which was isolate the fungus was identified to be *Alternaria* sp. Fungal spores were placed on PDA medium together with different concentrations of glucosinolates (broccoli juice): 0.15, 0.11, 0.07, 0.04, 0.01 y 0  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . The obtained results were result was that concentrations 0.07, 0.11 and 0.15  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  inhibited 100 % in the germination of spores of *Alternaria alternata* at 6 hours of evaluation. Mean lethal concentration  $\text{LC}_{50}$  was 0.028  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Thus, it can be mentioned that glucosinolates (from broccoli juice) have antifungal activity and therefore they can be used as post-harvest treatment in order to reduce the damage caused by *Alternaria* in Arugula.

**Additional Keywords:** *Eruca sativa*, glucosinolates, antifungal, molecular identification, inhibition

## 2.3 INTRODUCCIÓN

Las pérdidas económicas durante el manejo postcosecha de productos hortícolas, causadas por diversos microorganismos pueden ser de considerable importancia económica (Bautista *et al.*, 2000; Fraire-Cordero *et al.*, 2010;). Algunas de las principales enfermedades en frutas y hortalizas son causadas por la acción de hongos fitopatógenos, entre las que destaca *Alternaria alternata*.

*Alternaria alternata* contiene solo especies cosmopolitas que se encuentran en un amplio rango de hospedantes y subproductos (Andersen *et al.*, 2001; Carrillo, 2003). El micelio es de color oscuro, los conidios son grandes, alargados y oscuros, o bien multicelulares y en forma de pera y presentan septos tanto transversales como longitudinales. Las esporas se introducen por los tejidos susceptibles a través de heridas y en poco tiempo producen nuevos conidios que pueden ser diseminados por el viento (Carrillo, 2003; Agrios, 2005).

*Alternaria alternata*, ataca el área foliar y causa manchas en la hoja de plantas de la familia de las *Brassicaceae* así como en frutos (Nidhi *et al.*, 2007). En casi todos los casos, se comporta como un parásito de heridas. No obstante la penetración estomatal puede ocurrir o puede invadir un hospedero que está fisiológicamente debilitado causando una destrucción relativamente lenta de los tejidos del huésped. A medida que avanza la invasión de las hifas, éstos destruyen las células vegetales de donde obtienen sus nutrientes, y reduciendo con ello el potencial fotosintético. El proceso de infección conduce a la

formación de lesiones necróticas de forma redonda ubicadas sobre el haz foliar y su color se intensifica debido a la esporulación del hongo (Thomma, 2003). La esporulación de *Alternaria* es óptima a 27 °C por lo que es inhibida por debajo de 15 °C o sobre 33 °C, aunque el rango de crecimiento está entre 0 y 35 °C (Rotem, 1994; Carrillo 2003).

El método para controlar las enfermedades fúngicas se basa en la utilización de productos químicos sintéticos. En las últimas décadas, los esfuerzos se han dirigido a obtener una mejor comprensión de los efectos biológicos de compuestos aislados de plantas que tienen un efecto potencial en el control de enfermedades y plagas, debido a la reciente tendencia a utilizar alternativas menos dañinas en el control de hongos y a reducir la dependencia de pesticidas artificiales. Se espera que el uso de compuestos naturales tenga un menor impacto sobre los ecosistemas, ya que a diferencia de los productos químicos sintéticos, éstos son biodegradables y no se acumulan en el medio ambiente (Báez *et al.*, 2008).

Entre las estrategias que más comúnmente se utilizan está el uso de compuestos naturales obtenidos de plantas como los aceites esenciales, compuestos aromáticos (Tripathi y Dubey, 2004) y las moléculas producidas por varios sistemas de defensa de las plantas, éste último grupo de componentes, incluye algunas moléculas como los glucosinolatos (GLs), que en pruebas biológicas específicas han mostrado una fuerte actividad contra un amplio rango de patógenos (Mari *et al.*, 2008). Los glucosinolatos son del grupo tioglucósidos, consisten de una  $\beta$ -tioglucosa, una oxima sulfonada, y una

cadena lateral variable derivada de un aminoácido; se encuentran almacenados en vacuolas y son liberados al sufrir daño celular, luego de que entran en contacto con la enzima mirosinasa y son hidrolizados en diferentes productos (Molina y Bentura, 2009). A menudo, son tres grupos de acuerdo a la naturaleza de su cadena lateral: alifáticos, aromáticos e indólicos. Se han aislado y caracterizado aproximadamente 120 GLs de especies de plantas de la familia *Brassicaceae* y familias relacionadas, como son: el brócoli, la col y coliflor entre otras, las cuales contienen altos niveles de GLs, estos vegetales y algunas plantas comestibles del orden *Caparrales* son la fuente de todos los GLs de la dieta humana (Campas-Baypoli *et al.*, 2009).

El amplio rango de perfiles de GLs restringidos a las familias *Brassicaceae*, *Capparidaceae* y *Resedaceae*; almacenados en diferentes tejidos de la planta involucrados en la defensa contra diferentes enfermedades vegetales, ofrece la posibilidad de seleccionar especies de plantas *Brassicaceae* como el brócoli, con mayor potencial fúngico contra organismos de interés. Autores como Brandi *et al.* (2006) y Sisti *et al.* (2006) probaron el jugo de *Brassica oleracea*, comprobando la actividad antimicrobial y antifúngica del extracto, en la inhibición y crecimiento de *Blastoconidia* y *Candida albicans*.

Por lo anteriormente expuesto el objetivo del presente estudio fue evaluar la eficacia del extracto de jugo de brócoli *in vitro* sobre *Alternaria* para considerarlo en estudios posteriores como una opción antifúngica en postcosecha en Arúgula.

## 2.4 MATERIALES Y MÉTODOS

### **Aislamiento y pruebas de patogenicidad**

El aislamiento de *Alternaria* se obtuvo de hojas de Arúgula con síntomas de la mancha de la hoja procedentes del estado de Morelos. De las lesiones se tomaron cortes de tejido de la parte terminal y fueron desinfectados por inmersión en una solución de hipoclorito de sodio al 2 % durante 2 minutos, posteriormente los tejidos se enjuagaron dos veces con agua destilada y se colocaron sobre toallitas de papel estériles para retirar el exceso de humedad. Cada muestra de tejido se sembró en medio Papa Dextrosa Agar (PDA).

De cada aislamiento de *Alternaria*, se obtuvo un cultivo monospórico al colocar 1000 microlitros de agua destilada con una micropipeta, sobre la colonia de 8 días de edad desarrollada en cajas Petri con PDA. El agua se mezcló con el micelio y conidios con la ayuda de una varilla de vidrio estéril, posteriormente se recuperaron 100 microlitros de la solución de conidios, se colocaron en un tubo eppendorf de 1.5 ml de capacidad y se aforó con agua destilada. El contenido del tubo se vació a una caja Petri con agua agar (AA) se distribuyó en toda la caja y se dejó reposar por 5 segundos, posteriormente se desechó el exceso de agua contenido en la caja sobre dos toallitas de papel estériles, para finalmente incubar cada aislamiento a 27 °C durante 24 horas. Con la ayuda de un microscopio estereoscópico, de cada aislamiento se seleccionó un conidio individual germinado que se transfirió para su incremento a medio PDA

incubado a 27 °C. Se identificó la especie por medio de las claves morfológicas Barnett y Hunter (1998), Ellis (1971) y Rotem (1994).

Para comprobar la patogenicidad del hongo, se inocularon hojas de Arúgula previamente desinfectadas por inmersión en una solución de hipoclorito de sodio al 2 % durante 3 minutos y enjuagadas con agua destilada dos veces. A partir del hongo aislado, se preparó una suspensión a una concentración de  $1 \times 10^6$  conidios/ml, con ayuda de un hematocitómetro.

La inoculación se realizó sobre el haz de la hoja, colocando 20 µl de la solución de conidios con una micropipeta, sobre heridas realizadas con un palillo de madera esterilizado. Al testigo sólo se le adicionó agua destilada sobre las heridas. Las hojas inoculadas se mantuvieron en cámara húmeda a temperatura ambiente ( $24 \pm 2$  °C) durante 10 días. La unidad experimental fue una planta y se realizaron 10 repeticiones.

De acuerdo a los postulados de Koch, al concluir este periodo, se observó la presencia de síntomas (Agrios, 2005), los cuales se compararon con los síntomas iniciales del aislamiento original, así mismo, se reaisló el hongo a partir de las lesiones producidas y se corroboró que fuera el mismo aislamiento que se inoculó. Finalmente el hongo se identificó por medio de claves morfológicas Barnett y Hunter (1998), Ellis (1971) y Rotem (1994). La preservación de los cultivos monospórico se hizo en tubos de ensaye con medio PDA cubiertos con aceite mineral estéril.

## **Identificación de *Alternaria***

Para identificar al hongo aislado, se sembraron cultivos monospóricos en PCA los cuales se mantuvieron por 8 días a temperatura de  $27 \pm 2$  °C con luz blanca fluorescente. La identificación se hizo con base a las características del micelio, color de colonia, forma de conidióforos; y forma, tamaño y color de los conidios. Para observar estas estructuras se hicieron preparaciones permanentes de los hongos en glicerol al 50 % acidificado con cinco gotas de HCl al 12N y se observaron en el microscopio. Con la ayuda de las claves de Barnett y Hunter (1998), Ellis (1971) y Rotem (1994), se identificaron los aislamientos a nivel de especie, y con un microscopio compuesto con el objetivo 40X se tomaron fotografías con una cámara digital instalada en el objetivo del microscopio. Con el uso del programa Motic M.C. Camare se observaron en una computadora para medir el tamaño, ancho y longitud de los conidios y conidióforos. Para estas mediciones se consideraron 100 al azar.

El color de la colonia se determinó observando y examinando la masa conidial y micelial, a partir de cepas de 8 días de incubación a 27 °C en cajas Petri obtenidas de un cultivo monospórico.

## **Extracción de ADN**

Para confirmar la identificación morfológica se llevó a cabo la extracción de ADN (ácido desoxirribonucleico fungal) del cultivo monospórico de *Alternaria*, se realizó la extracción de ADN, con el uso del DNeasy Mini kit (QUIAGEN). Para esto se tomó una muestra del micelio de *Alternaria*, se transfirió a un tubo

ependorf, se maceró con un tubo de cristal, se adicionaron 400 µl de amortiguador AP1 y 4 µl RNasa, se agitó de manera ligera, posteriormente, las muestras fueron incubadas en baño María por 10 min a 65 °C, se agitó por inversión aproximadamente cada 2 min. Luego se adicionó a la muestra 130 µl del amortiguador AP2, y se incubó por 5 min en hielo. La mezcla se colocó en la columna QIASHredder Mini spin lila y se centrifugó por 2 min a 8765 g. Se retiró el sobrenadante para colocarlo en un nuevo tubo ependorf, al que se le adicionó 675 µl del amortiguador AP3/E. La mezcla fue colocada en un tubo DNeasy Mini spin, para centrifugar por 1 min a 2862 g. En seguida la columna fue reemplazada por otra suplementaria, se agregó 500 µl del amortiguador AW en la membrana del Mini spin DNeasy y se centrifugó por 1 min a 2862 g. Nuevamente se cambió la columna con el filtrado, se le adicionó a la membrana 500 µl del amortiguador AW y se centrifugó por 2 min a 8765 g, con el propósito de lavar al ADN, finalmente, se transfirió la columna DNeasy Mini spin a un tubo ependorf, directamente en la membrana se le adicionó 100 µl del amortiguador AE del DNeasy, se incubó por 5 min a temperatura ambiente y se centrifugó por 1 min a 2862 g (QIAGEN, 2012) Las muestras se conservaron en refrigeración a -20 °C hasta su uso posterior.

### **Amplificación del ADN mediante PCR**

Con el fin de confirmar el género y determinar la especie del aislamiento, se realizó una amplificación de las regiones internas ITS1 e ITS2, ubicadas en los genes ribosomales (rDNA) localizadas entre la subunidad pequeña 18S -5.85S y la subunidad larga 5.8S -28S que fueron amplificadas con la combinación de

iniciadores ITS5 (GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG) / ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC). La mezcla de reacción para PCR usada para la amplificación fueron: agua estéril ionizada (12.145  $\mu$ l), solución amortiguadora TBE 1x (4  $\mu$ l),  $MgCl_2$  a 1.5 mM (2.75  $\mu$ l), dNTP's a 0.2 mM (1.375  $\mu$ l), Taq DNA-polimerasa 1.5 unidades (0.33  $\mu$ l), iniciadores ITS4 e ITS5 a 10 pM (2  $\mu$ l) por cada uno y muestra de ADN a una concentración de 20 ng (1  $\mu$ l). La reacción de amplificación se realizó en un termociclador Perkin Elmer con el siguiente programa: desnaturalización inicial a 95 °C durante 2 min por 30 ciclos, con alineamiento y extensión a 95 °C por 1 min, 50 °C por 30 segundos, 72 °C por 2 min y una extensión final a 72 °C por 10 min. Los productos de PCR se purificaron de acuerdo al protocolo del QIAquick PCR Purificación Kit de QIAGEN y se ajustó a una concentración de 50 ng/ $\mu$ l con un volumen de 15  $\mu$ l. Los productos de la amplificación fueron separados en un gel de agarosa al 1.5 % por electroforesis usando un amortiguador 1x TAE (Tris-base ácido acético glacial, EDTA 0.5 M pH 8.0) El gel se tiñó con bromuro de etidio 0.5  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> y se documentó en un transiluminador Dial Intensity UVP de luz UV. Los productos amplificados por PCR se enviaron a secuenciar a MACROGEN (Corea del Sur).

La secuencia obtenida fue comparada con las depositadas en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI).

## **Obtención del extracto de jugo crudo de brócoli**

### **Material vegetal**

El material vegetal se obtuvo del mercado de abastos de la ciudad de Texcoco, México, el cual fue trasladado al Laboratorio de Postcosecha de Frutales de la Universidad Autónoma de Chapingo. Para la extracción se utilizaron floretes y tallos de brócoli, los cuales fueron desinfestados con hipoclorito de sodio y fueron molidos en un extractor de jugo Moulinex, posteriormente se dejaron reposar por espacio de una hora. Después de este periodo la muestra se pasó a una centrifuga a 10000 revoluciones por 10 min, obteniéndose un sobrenadante el cual fue almacenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.

### **Método para determinar glucosinolatos en brócoli mediante espectrofotometría**

Con base en el método de Jezek *et al.* (1999), se tomaron 0.5 mg de extracto liofilizado, a los que se adicionaron 7.5 ml de amortiguador acetato 0.2 M, pH 4.2 y 1.5 ml de acetato de plomo y bario 0.5 M. La mezcla se agitó vigorosamente en vortex. Se adicionaron 0.4 g de polivinilpolipirrolidona (PVPP) y se incubó a temperatura ambiente, con agitación, por 15 minutos. Después se agregaron 1.5 ml de sulfato de sodio 2 M y se centrifugó a 11366 g por 5 minutos a temperatura ambiente; 0.9 ml de extracto tratado con PVPP se mezclaron con 0.9 ml de hidróxido de sodio 2M y se incubaron a temperatura ambiente por 30 min. A la mezcla se le adicionó 0.138 ml de ácido clorhídrico concentrado y se centrifugó a 1073 g por 10 minutos. Para la determinación

espectrofotométrica se tomaron 0.5 ml de sobrenadante y se mezclaron con 0.5 µl de solución de ferricianuro 2mM en amortiguador fosfato 0.2 M a pH 7.0. Finalmente se midió la absorbancia de la solución a 420 nm antes de 15 s usando amortiguador fosfato 0.2 M a pH 7.0 como blanco. Adicionalmente, se realizó la medida de la muestra blanco para lo cual se tomaron 0.5 ml de extracto hidrolizado y 0.5 ml de amortiguador fosfato 0.2 M a pH 7.0. Para la construcción de la curva de calibración se utilizó el patrón sinigrina  $5.60 \times 10^{-3}$  M y se hicieron diluciones de 0 a 90 µl de solución. Las medidas se hicieron sobre cada réplica. Con los datos del espectrofotómetro se ajustó un modelo de regresión, para determinar la concentración de los GLs obtenidos del jugo de brócoli. El modelo utilizado fue:  $Y = -0.0041x + 0.9313$  ( $R^2$  de 0.97,  $P = 0.002$ ) y la concentración de glucosinolatos obtenida fue de 0.0029 mg/ml.

### **Evaluación del efecto del jugo de brócoli sobre la germinación de esporas de *Alternaria***

#### **Bioensayo**

En recipientes translúcidos con una capacidad de 300 µl se colocaron 150 µl de medio de cultivo PDA; una vez que solidificó el medio, se colocaron 50 µl del extracto de brócoli puro, diluido en agua de tal manera que alcanzara las concentraciones utilizadas en los bioensayos (Cuadro 1).

**Cuadro 1.** Concentración del extracto de jugo de brócoli, para determinar el efecto de inhibición sobre la germinación de esporas de *Alternaria*.

Tratamiento	Cantidad de agua µg/µl	Extracto de jugo de brócoli µg/µl (Glucosinolatos)	Concentración final del extracto de brócoli en un volumen de 50 µg/µl
1	0	50	0.15
2	12.5	37.5	0.11
3	25	25	0.07
4	37.5	12.5	0.04
5	45	5	0.01
6	50	0	0

Después se colocaron 20 µl de la solución de esporas de *Alternaria* sobre cada uno de los recipientes que contenían las diferentes concentración del jugo de brócoli. Los mismos se colocaron en una cámara húmeda donde fueron incubados por 2, 4 y 6 horas a 28±3 °C, y luego se cuantificó con la ayuda de un microscopio, el número de esporas germinadas de *Alternaria* a las 2, 4 y 6 horas. Para la evaluación se consideraron 100 esporas al azar y se realizaron tres repeticiones para cada concentración.

### Análisis estadístico

Los datos obtenidos se sometieron a un análisis de varianza y pruebas de comparación de medias de Tukey (p=0.05) Para el cálculo de la efectividad media se determinó la concentración efectiva al 50 % (CL<sub>50</sub>) mediante el procedimiento Probit (SAS Institute, 2003) así mismo se determinó el

porcentaje de inhibición mediante la fórmula:  $IN(\%) = \frac{a - b}{a} 100$

Donde: a= Total de esporas germinadas del testigo

b= Total de esporas germinadas del tratamiento

## 2.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Pruebas de patogenicidad

A los dos días después de la inoculación, las hojas presentaron síntomas iniciales de mancha de la hoja (Figura 1). Las lesiones iniciales fueron pequeñas (< 1 mm de diámetro), circulares de color café oscuro y dispersas en las hojas. A medida que las lesiones se ampliaron se convirtieron en irregulares. Luego al unirse las manchas se observaron áreas necrosadas grandes que llegaron a abarcar la hoja entera. Estos síntomas coinciden con los reportados por Mercado *et al.* (2006).

### Caracterización morfológica de *Alternaria*

Se encontró que *Alternaria* presentó colonias verde oscuro, en medio de cultivo PCA. Al microscopio se observaron conidióforos simples de color café claro tabicados, lineales o a veces geniculados, con una longitud de 16.1-57.9 x 1-2.4  $\mu\text{m}$ , conidios obclavados muriformes, con septa transversal y longitudinal variable, de 1-7 y 0-3, respectivamente, y conidios que fueron de 19.2- 55.9  $\mu\text{m}$  de largo, y de 6.1 a 11.8  $\mu\text{m}$  de ancho con pico corto cilíndrico pálido, estos septos son conocidos como dictioesporas. La catenulación presentó de 5 a 10 conidios; se presentó ramificación secundaria e incluso ramificación terciaria, características que corresponden a la especie de *Alternaria alternata* de acuerdo a las claves y descripciones de Ellis (1971), Barnett y Hunter (1998) y Rotem (1994). Estos resultados corresponden con lo reportado por López y Cabral (1999), Andersen *et al.* (2001) Fraire *et al.* (2010) (Figura 1).

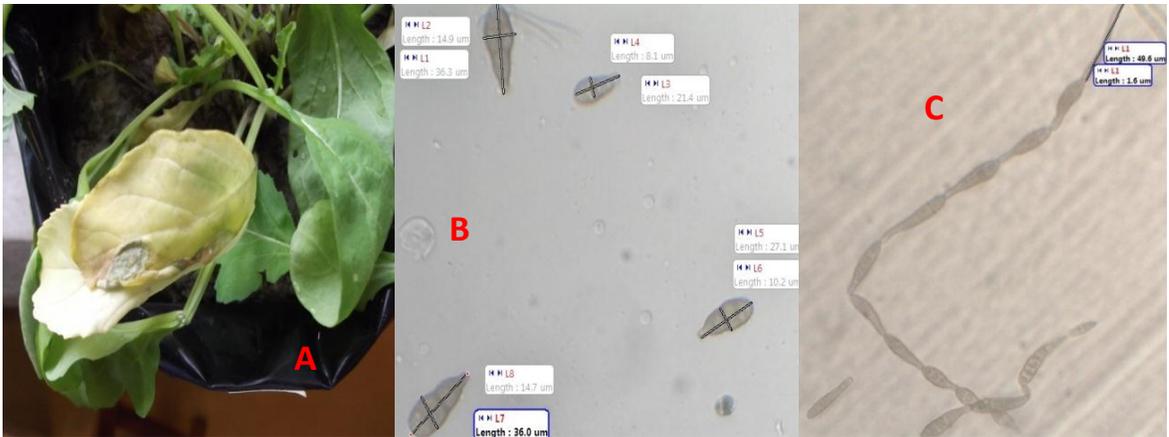


Figura 1. A) hojas de Arúgula inoculadas con *Alternaria*. B) fotomicrografía de conidios, C) cadenas de conidios y conidióforos.

### Identificación Molecular

Para determinar la especie, la secuencia obtenida de Macrogen fue ingresada en el programa BLAST para ser comparada con la información disponible en las bases de datos, presentando un porcentaje de similitud de 99 % con la especie *Alternaria alternata* (Fries), resultado que coincide con el trabajo realizado por Serdani *et al.* (2002) y Mercado *et al.* (2006).

### Efecto del jugo de brócoli sobre *Alternaria*

El análisis de varianza mostró diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de germinación de las esporas en función de las concentraciones del jugo de brócoli (glucosinolatos) como se puede observar en el Cuadro 2.

**Cuadro 2.** Porcentaje de inhibición y germinación de esporas de *Alternaria* en diferentes concentraciones del jugo de brócoli (glucosinolatos)

Concentración (Glucosinolatos) µg/µl	% germinación 2 h	% germinación 4 h	% germinación 6 h	% Inhibición
0	26 a <sup>t</sup>	55 a	96 a	4 d
0.01	22 b	45 b	91 b	9 c
0.04	13 c	31 c	46 c	54 b
0.07	0 d	0 d	0 d	100 a
0.11	0 d	0 d	0 d	100 a
0.15	0 d	0 d	0 d	100 a
DMSH	1.6	2.4	3.2	2.4
Pr<F	0.001**	0.001**	0.001**	0.001**

<sup>t</sup>Medias con la misma letra dentro de las columnas, no son diferentes de acuerdo a la prueba de Tukey con  $p < 0.05$ ; DMSH: Diferencia mínima significativa honesta; \*\*Significativo al 1 %.

El control y el tratamiento con 0.01 µg/µl presentaron el porcentaje de germinación más alto a las 6 horas después de que las esporas se colocaron en el PDA. Lo que contrapone los resultados de Quintana *et al.* (2011) quienes midieron la actividad antifúngica del quitosano en contra de *Alternaria tenuissima* y obtuvieron el 99 % de germinación a las 24 horas, a diferencia de lo encontrado en este estudio, sin embargo Rotem (1994) menciona que en condiciones favorables, la mayoría de las especies de *Alternaria* germinan en aproximadamente 1-3 horas.

En las concentraciones de 0.15, 0.11 y 0.07 µg/µl, se observó un porcentaje de germinación del 0 %, mientras que la concentración a 0.04 y 0.01 µg/µl tuvieron un menor efecto, lo que indica que a mayor concentración menor germinación. Por lo que en comparación con el testigo, todos los tratamientos con jugo de brócoli (GLs) influyeron en el crecimiento del hongo. Algunos autores han demostrado que los glucosinolatos tienen efecto en contra de algunos

patógenos. Por ejemplo Sisti *et al.* (2006), quienes probaron jugo acuoso crudo de *Brassica* en la inhibición de *Candida albicans*, encontraron que después de 4 horas de incubación con una concentración de 10.9 µg/ml, tuvieron 5 % de germinación, resultados similares a los encontrados en este estudio.

En cuanto a la inhibición de esporas de *Alternaria*, Troncoso-Rojas *et al.* (2005) reportan concentraciones de isotiocinatos derivados de los glucosinolatos de 0.025, 0.5, 0.1, 0.2 y 0.4 mg/ml con porcentajes de inhibición de 75, 87 y 100 %, igual a lo encontrado en este trabajo. Sin embargo cabe mencionar que ellos trabajaron con compuestos comerciales y en este estudio se utilizó el jugo de brócoli recién extraído, el cual presentó un proceso de hidrólisis enzimática, mediante la enzima mirosina, dando lugar a diferentes compuesto de isotiocinatos (ITC) derivados de los glucosinolatos. De igual manera Hafidh *et al.* (2011) probaron el efecto antimicrobiano del extracto de col roja en 11 bacterias y 11 hongos utilizando concentraciones de 0 a 600 mg/ml para bacterias y de 0 a 350 mg/ml para los hongos, logrando obtener la concentración mínima para controlar cada tipo de organismo.

Por otra parte, Hang y Flieming (1994) y Mucete (2006) demostraron que los Isotiocinatos derivados de los GLs tienen una eficaz actividad antibacterial en *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Rhizopus nigricans* y bacterias de ácido láctico, con concentraciones de 142 mg/100 g, con efectos positivos a las 24 y 48 horas. Un comportamiento similar fue encontrado por Marí *et al.* (2008) con un 85 % en la

inhibición de esporas de *Monilia* spp. a una concentración de 0.04 hasta 0.27 mg/ L al utilizar diferentes isotiocinatos.

En la Figura 2 se puede apreciar el efecto de las concentraciones de glucosinolatos de jugo de brócoli de preparaciones observadas en el microscopio, así como llevadas a cabo en los bioensayos.

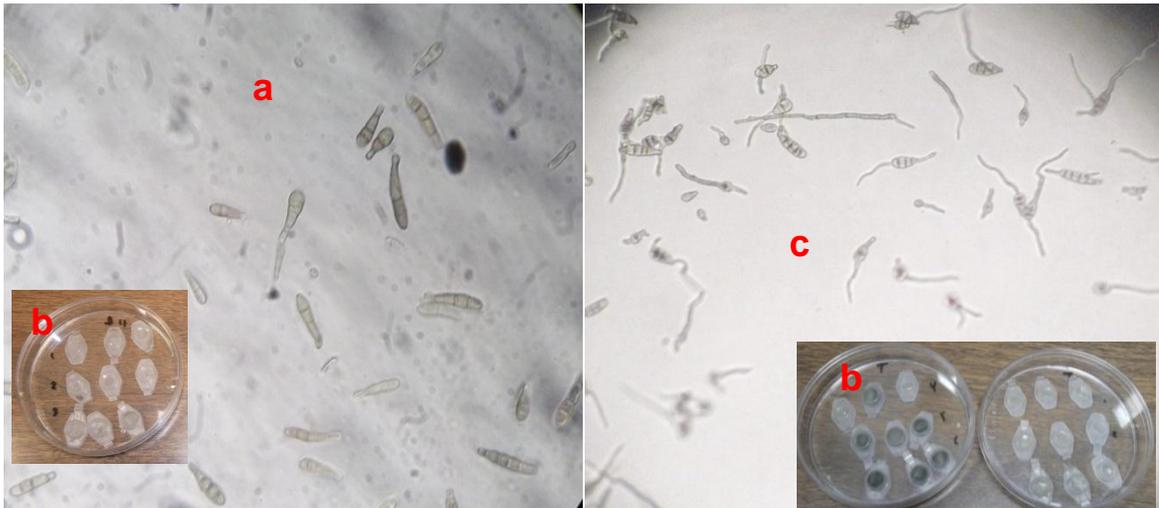


Figura 2. efecto de glucosinolatos (de jugo de brócoli) en la inhibición de *Alternaria alternata* a) esporas de *Alternaria* en PDA a las 6 horas con una concentración de 0.15 µg/µl b) crecimiento del hongo a los 3 días, solo o con diferentes concentraciones de jugo de brócoli. c) esporas de *Alternaria alternata* en PDA a las 6 horas (control).

Los glucosinolatos (de jugo de brócoli) influyeron en la inhibición de *Alternaria alternata*, ya que las esporas no presentaron germinación alguna, como se aprecia en la Figura 2. Así mismo la concentración efectiva 50 % (CL<sub>50</sub>) que presentó la germinación de conidios de *Alternaria* spp. al extracto de brócoli fue de 0.028 µg/µl y la concentración que inhibió por completo la germinación de esporas fue la de 0.07 µg/µl. El efecto inhibitorio de los GLs sobre la germinación de esporas de hongos fitopatógenos, ha sido observado por

autores como Vargas-Arispuro *et al.* (2005) quienes probaron extractos crudos de *Brassica oleracea* y reportan 100 % de inhibición en el crecimiento de *Phymatotrichopsis omnívora* (Duggar) Hennebert a una concentración de 10 mg/ml.

Otro ejemplo del potencial fungicida del género *Brassica spp.* ha sido comprobado en estudios *in vitro*, con extractos acuosos de nabo o colinabo los cuales inhibieron completamente el crecimiento de oosporas de *Aphanomyces euteiches*, así como sustancias volátiles de plantas de *Brassica rapa* inhibieron el crecimiento micelial de *Rhizoctonia solani* al ser expuestos a 20 mg/g (Masahiro *et al.*, 2006).

En otro estudio realizado por Brandi *et al.* (2006) con jugo de *Brassica oleracea* mencionan que la efectividad antimicrobiana se debe a un mecanismo de acción del jugo a través del bloqueo de los grupos sulfhidrilo en bacterias Delaquis y Mazza (1995) aluden que el efecto se debe a una inactivación de enzimas intracelulares, a través de la escisión oxidativa de enlaces de disulfuro. Así mismo Kojima *et al.* (1971), Banks *et al.* (1986) y Troncoso-Rojas *et al.* (2005), comentaron que el mecanismo por el cual los isotiocinatos (ITC) inhiben el crecimiento de hongos no es todavía conocido. Sin embargo, algunas hipótesis sugieren que se debe a una interacción irreversible de ITC con los grupos sulfhidrilo, enlaces de disulfuro y grupos amino de las proteínas y los residuos de aminoácidos. Se piensa que el principal objetivo de los compuestos lipófilos tóxicos en células eucariotas es en la membrana celular; el (ITC) es un compuesto lipófilo, por lo que es posible que éstos pudieran reaccionar con

otras enzimas presentes al nivel del plasma de la membrana causando la falta de crecimiento, inhibición y muerte celular.

Basado en lo anterior, los resultados obtenidos en este estudio y los obtenidos en otras investigaciones muestran un óptimo control tanto de hongos como de bacterias, al inhibir la reproducción de estos microorganismos, Los GLs además de ser biodegradables no producen un desequilibrio al ecosistema y al ser de origen vegetal los microorganismos desarrollan una resistencia de forma más lenta que los insecticidas sintéticos (Chirinos, 2009).

El efecto inhibitorio de los GLS en la germinación de esporas de *Alternaria* fue comprobado a partir de los resultados obtenidos en este estudio, coincidiendo con los encontrados en estudios previos desarrollados por otros investigadores.

## 2.6 CONCLUSIONES

Los glucosinolatos contenidos en el jugo de brócoli poseen un potencial antifúngico por lo que éste podría ser usado como tratamiento en postcosecha, con el fin de disminuir los daños causados por *Alternaria* en hortalizas y frutos.

El jugo de brócoli resultó efectivo a partir de la concentración de 0.07 µg/µl en la inhibición de la germinación de esporas de *Alternaria alternata*, por lo que posee un alto potencial para ser usado en la conservación postcosecha.

## 2.7 LITERATURA CITADA

- AGRIOS, G. N. 2005. Plant Pathology. 5th edition. Elsevier Academic Press. 922 p.
- ANDERSEN, B.; KROGER, E.; ROBERTS, G. 2001. Chemical and morphological segregation of *Alternaria alternata*, *A. gaisen* and *A. longipes*. Mycological Research 105:291-299.
- BÁEZ-FLORES, M. E.; TRONCOSO-ROJAS, R.; TIZNADO HERNÁNDEZ, M.E. 2008. Respuestas genéticas provocadas por el tratamiento con isiocianatos en hongos del género *Alternaria*. Revista Mexicana de Fitopatología 29:61-68.
- BRANDI, G.; AMAGLIANI, G.; SCHIAVANO, G. F.; DE SANTI, M.; SISTI, M. 2006. Activity of *Brassica oleracea* leaf juice on foodborne pathogenic bacteria. Journal of Food Protection 9:2274–2279.
- BARNETT H. L.; HUNTER, B. 1998. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. Cuarta edición. Minnesota. APS Press. 210 p.
- BAUTISTA-BAÑOS, S.; HERNÁNDEZ-LÓPEZ, M.; BARRERA-NECHA, L. 2000. Antifungal screening of plants of the state of Morelos, México against four fungal postharvest pathogens of fruits and vegetables. Revista Mexicana de Fitopatología 18(001):36-41.
- BANKS, J.; BOARD, R.; SPARKS, N. 1986. Natural antimicrobial systems and their potential in food preservation of the future. Biotechnol Appl Biochem 8:103–107.
- 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.; SÁNCHEZ-MACHADO, D. I. 2009. Contenido

de sulforafano (1-isotiocianato-4-(metilsulfinil)-butano) en vegetales crucíferos. Archivos Latinoamericanos de Nutrición 59(1):95-100.

CARRILLO, L. 2003. Los Hongos de los Alimentos y Forrajes. Universidad Nacional de Salta. 4<sup>ta</sup> edición. 130 p.

CHIRINOS, J. 2009. Uso de extractos naturales como una alternativa ecológica para el control de enfermedades en plantas. INIA Divulga 14:40-42.

DELAQUIS, P.J.; MAZZA, G. 1995. Antimicrobial Properties of Isothiocyanates in Food Preservation. Food Technology. Edited by James Giese, Associate Editor. 73-84.

ELLIS, M. B. 1971. Dematiaceous Hyphomycetes. Cambrian Printers, Aberystwyth, Dyfed U.K. 465 p.

FRAIRE-CORDERO, M. L.; NIETO-ÁNGEL, D.; CÁRDENAS-SORIANO, E. 2010. *Alternaria tenuissima*, *A. alternata* y *Fusarium oxysporum* hongos causantes de la pudrición de florete de brócoli. Revista Mexicana de Fitopatología 28(1):25-33.

HANG, K. K.; FLEMING, H. P. 1994. Antibacterial activity of cabbage juice against lactic acid bacteria. Journal of Food Science 59(1):125-129.

HAFIDH, R. R.; ABDULAMIR, A. S.; VERN, L. S.; BAKAR, F. A.; ABAS, F.; JAHASHIRI, F.; SEKAWI, Z. 2011. Inhibition of growth of highly resistant bacterial and fungal pathogens by a natural product. The Open Microbiology Journal 5:96-106.

JEZEK, J.; BARRY, G.; HAGGETT, D.; ATKINSON, A.; RAWSON, D. M. 1999. Determination of glucosinolates using their alkaline degradation and with ferricyanide. J. Agric. Food Chem 47:4669-4674.

- KOJIMA, M.; OAWA, K, 1971. Studies on the effect of isothiocyanates and their analogues on microorganisms. (I) Effects of isothiocyanates on the oxygen uptake of yeast. *J Ferment Technology* 49:740–746.
- LÓPEZ, S.E.; CABRAL, D. 1999 *Alternaria*, pp. 42-49 En: ROBINSON RK, BATT CA, PATEL PD (Eds). *Encyclopedia of food microbiology*. London, Academic Press.
- MARI, M.; LEONI, O.; BERNARDI, R.; NERI, F.; PALMIERI. S. 2008. Control of brown rot on stonefruit by synthetic and glucosinolate-derived isothiocyanates. *Postharvest Biology and Technology* 47:61-67.
- MASAHIRO, K.; ANDRIANTSOA, R.; YOKO, O.; MOTOAKI, T.; HITOSHI, H.; RYO F. 2006. Induction of soil supresiveness against *Rhizoctonia solani* by incorporation of dried plant residues into soil. *Phytopatology* 96:1372-1379.
- MERCADO VERGNES, D.; RENARD, M. E.; DUVEILLER, E.; MARAITE, H. 2006. Identification of *Alternaria* spp. on wheat by pathogenicity assays and sequencing. *Plant Pathology* 55:485-493.
- MOLINA-VARGAS, L. F.; BENTURA-CASTELLANOS, J. U. 2009. Efecto inhibitorio *in vitro* de cinco isotiocianatos sobre *Rhizoctonia solani* Kühn AG-3. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental (RIAA)* 0(1):37-40.
- MUCETE, D.; BOROZAN, A.; RADU F.; JIANU, I. 2006. Antibacterial activity of isiothiocyanantes, active principles in *Armoracia rusticana* roots (I). *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies* 2:443-452.
- NIDHI, S.; MUHAMMAD, H. R.; STEPHEN, S.; MOHAN, T.; VIPAN K. B.; NAT N. V. K. 2007. Proteome-level changes in two *Brassica napus* lines

exhibiting differential responses to the fungal pathogen *Alternaria brassicae*. Plant Science 172:95-110.

QUINTANA-OBREGÓN, E. A.; LÓPEZ-CERVANTES, J.; CIRA-CHÁVEZ, L. A.; SÁNCHEZ-MACHADO, D. 2011. Antifungal activity of chitosan *in vitro* against *Alternaria tenuissima* and safflower seeds. Revista Mexicana de Fitopatología 29(2):168-171.

ROTEM, Y. 1994. The Genus *Alternaria*: Biology, Epidemiology and Pathogenicity. APS Press, American Phytopathological Society. 326 p.

SISTI, M.; AMAGLIANI, G.; BRANDI, B. 2006. Antifungal activity of *Brassica oleracea* var. *botrytis* fresh aqueous juice. Fitoterapia 74:453-458.

SERDANI, M.; KANG, J.; ANDERSEN, B.; CROUS, P. 2002. Characterization of *Alternaria* species-groups associated with core rot of apples in South Africa. Mycol. Res. 106(5):561-569.

THOMMA B. P. H. J. 2003. *Alternaria* sp. From general saprophyte to specific parasite. Molecular Plant Pathology 4(4):225-226.

TRIPATHI, P.; DUBEY, N. K. 2004. Exploitation of natural products as an alternative strategy to control postharvest fungal rotting of fruit and vegetables. Postharvest Biology and Technology 32:235-245.

TRONCOSO-ROJAS, R.; SÁNCHEZ-ESTRADA, A.; RUELAS, C.; GARCÍA, H. S. 2005. Effect of benzyl isothiocyanate on tomato fruit infection development by *Alternaria alternata*. Journal of the Science of Food and Agriculture 85:1427-1434.

VARGAS-ARISPURO, I.; CORRALES-MALDONADO C.; VALLEJO-COHEN, S.; MARTÍNEZ-TÉLLEZ M. 2005. Correlación entre contenido de azufre y actividad antifúngica de variedades de *Brassica oleracea* L. para el control de *Phymatotrichopsis omnívora* (Duggar) Hennebert. Revista Mexicana de Fitopatología 23:320-322.

### **CAPITULO III**

#### **3. EFECTO DEL JUGO DE BRÓCOLI EN LA INHIBICIÓN DE *Alternaria alternata* EN ARÚGULA MÍNIMAMENTE PROCESADA. I CALIDAD POSTCOSECHA.**

### 3.1 RESUMEN

Algunos vegetales de la familia de las *Brassicas* muestran propiedades antifúngicas contra varios microorganismos de importancia económica. Los glucosinolatos (GLs) mediante hidrólisis de la enzima mirosinasa se conocen por ser compuestos antifúngicos *in vitro* en contra de diferentes hongos. En este trabajo se estudió el efecto del jugo de brócoli (GLs) *in vitro* y en vivo en la inhibición de *Alternaria* para mejorar la calidad de hojas de Arúgula. Para el ensayo *in vitro* se utilizó medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA) y concentraciones de 0.15, 0.11, 0.07, 0.04, 0.01, 0  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , para evaluar su efecto en la germinación de esporas de *Alternaria alternata*. En el ensayo en vivo se evaluó la calidad postcosecha de Arúgula almacenada a 0, 4 °C y temperatura ambiente (22 °C) por 15 días, mediante inoculación con esporas de *Alternaria* a concentraciones de: 2.98  $\mu\text{g}/\text{ml}$  + inóculo y 1.49  $\mu\text{g}/\text{ml}$  + inóculo, usando una solución de esporas de *Alternaria* ( $1 \times 10^6$ ) y un testigo. La severidad e incidencia del daño se evaluó cada tercer día, a partir de las siguientes variables: ángulo hue, croma, luminosidad, clorofilas,  $\text{CO}_2$  y etileno. Los resultados obtenidos en el presente estudio mostraron que la concentración mínima de jugo de brócoli *in vitro* para obtener un 100% de inhibición fue de 0.07  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , en vivo la concentración de 2.98  $\mu\text{g}/\text{ml}$  y la temperatura de 0 °C fueron las que conservaron los parámetros de calidad en Arúgula al final del almacenamiento. Por lo que el jugo de brócoli (GLs) puede ser usado en postcosecha para el control de *Alternaria alternata*.

**Palabras claves adicionales:** *Eruca sativa*, glucosinolatos, bajas temperaturas, color, respiración.

### 3.2 ABSTRACT

Some plants of the *Brassica* family have shown antifungal properties against various microorganisms of economic importance. Glucosinolates (GLs) produced on hydrolysis by the enzyme myrosinase are known to be *in vitro* antifungal compounds against various fungi. In this study work the effect of broccoli juice (GLs) was *in vitro* and in vivo in the inhibition of spore germination or was evaluated of *Alternaria*. *In vitro*, concentrations of 0.15, 0.11, 0.07, 0.04, 0.01, 0  $\text{g}/\text{ml}$ , were applied to culture medium of potato, dextrose and agar (PDA). At the in vivo essay the effect of *Alternaria* on postharvest quality of arugula stored at 0, 4 °C temperature (22 °C) for 15 days, was estimated by inoculating spores at the following concentrations: 2.98  $\mu\text{g}/\text{ml}$  + inoculum and 1.49  $\mu\text{g}/\text{ml}$  + inoculum using a spore solution of *Alternaria* ( $1 \times 10^6$ ) and a control. The severity and damage incidence were assessed every third day by measuring the following traits: angle hue, chroma, brightness, chlorophyll,  $\text{CO}_2$  and ethylene. The obtained results showed that the lowest concentration of broccoli juice was 0.07  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  to obtained 100 % inhibition of spore germination. Juice concentration of 2.98 live  $\mu\text{g}/\text{ml}$  in addition to storage at 0 °C kept quality parameters. At the in vivo essay juice concentration or 2.98  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Arúgula leaves until the end of the storage period. Therefore the GLs contained in broccoli juice can be used for postharvest control of *Alternaria*.

**Additional keywords:** *Eruca sativa*, glucosinolates, low temperatures, color, breath.

### 3.3 INTRODUCCIÓN

Los cambios demográficos y sociales han ejercido un efecto muy marcado en el consumo de alimentos en el mundo. Teniendo como resultado que los consumidores demanden alimentos naturales, de buena apariencia y valor nutricional y microbiológicamente seguros como son los productos mínimamente procesados (García *et al.*, 2006). Un ejemplo de éstos son las hierbas aromáticas frescas, cuya demanda ha crecido de manera sistemática y para muchos países en desarrollo representan el rubro principal de exportación y fuente de divisas. La pérdida del valor del producto y de su calidad, pueden darse durante el manejo postcosecha, almacenamiento y distribución, factores que causan considerables pérdidas económicas en los países productores (González-Aguilar, 2005). Dentro de las hierbas aromáticas la Arúgula es una especie de origen mediterráneo y gracias a la demanda por la industria de mínimos procesados ha visto resurgir su consumo como un ingrediente de los más codiciados. Sus hojas, además de enriquecer el sabor de las ensaladas, son una fuente de compuestos antioxidantes, entre los que se incluyen los polifenoles y la vitamina C (Herrero y Romero 2006). Desafortunadamente, esta hierba es susceptible al deterioro, así como al daño causado por *Alternaría*, hongo patógeno causante de la pérdida de calidad del producto, lo que tiende a acortar el tiempo de vida útil. La permanencia constante bajo refrigeración y envasado, salvaguarda el producto frente a posibles alteraciones mecánicas, microbiológicas y biológicas (Artés, 2006). Así mismo, se ha observado que la calidad de los alimentos mejora significativamente con la incorporación de

productos naturales denominados antimicrobianos, ya que retardan el crecimiento o inactivan su actividad metabólica y por lo tanto detienen el deterioro del producto (Rodríguez-Sauceda, 2011).

Los principales productos naturales que se utilizan para el control microbiológico de este tipo de alimentos son metabolitos secundarios como flavonoides, taninos, glucosinolatos, etc. A algunos vegetales de la familia *Brassicaceae* como el brócoli, se les atribuye la capacidad de sintetizar compuestos ricos en azufre, debido a su composición química, como son los glucosinolatos, los cuales contienen nitrógeno y azufre y se biosintetizan a partir de diversos aminoácidos (Bellostas *et al.*, 2004). Con el daño tisular, los glucosinolatos (GLs) son hidrolizados rápidamente por la actividad de la enzima mirosinasa, siendo los precursores relativamente estables de los isotiocianatos, tiocianatos o nitrilos, los cuales tienen propiedades antimicrobianas por lo que pueden ser empleados para controlar diferentes enfermedades fitopatógenas (Zukalová y Vasák, 2002). El potencial fungicida del género *Brassica* se ha comprobado en estudios *in vitro*. Por ejemplo, el uso de extractos acuosos de nabo inhibió completamente el crecimiento de oosporas de *Aphanomyces euteiches* (Hernández-Lauzardo *et al.* 2007). Mari *et al.* (2002) usaron allyl itiocianato en vapor reduciendo la incidencia de *Penicillium* en un 90 %. Al respecto Smolinska *et al.* (2003) mencionan que el mecanismo responsable de la acción antimicrobiana no está claro, pero el efecto perjudicial de los tejidos de crucíferas en microorganismos se atribuye principalmente a productos volátiles de degradación de glucosinolatos liberados por estas plantas. Los productos de degradación de GLs, tanto los solubles en agua como los volátiles pueden por

lo tanto participar en la supresión de la enfermedad y ser útiles en el control de patógenos de plantas. Es por ello que en el presente estudio se evaluó el efecto de diferentes concentraciones de jugo de brócoli (GLs) tanto *in vitro* como en vivo en la inhibición de la germinación de esporas de *Alternaria alternata*, a bajas temperaturas de refrigeración (0, 4 °C y temperatura ambiente), evaluando la calidad y vida de anaquel de Arúgula.

### **3.4 MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **Obtención del jugo crudo de brócoli**

Se empleó brócoli proveniente del mercado de abastos de Texcoco, Edo. de México, el cual fue trasladado al Laboratorio de Fisiología de Frutales de la UACH. Los floretes y tallos de brócoli se desinfectaron con hipoclorito de sodio a 100 ppm y se molieron en un extractor Moulinex. De acuerdo a la metodología establecida por Brandi *et al.* (2006), el jugo obtenido se dejó reposar por espacio de una hora, con el fin de llevar a cabo el proceso de hidrolisis mediante la enzima mirosina. La muestra se pasó a una centrifuga a 7080 g 10 min y posteriormente el sobrenadante se almacenó a -20 °C hasta su uso.

#### **Método para determinar glucosinolatos en brócoli mediante espectrofotometría**

Se tomaron aproximadamente 0.5 mg de extracto de brócoli liofilizado (Jezek *et al.*, 1999) al cual se le adicionaron 7.5 ml de amortiguador acetato 0.2 M a pH 4.2 y 1.5 ml de acetato de plomo y bario 0.5 M. La mezcla se agitó vigorosamente en vortex. Se adicionaron 0.4 g de polivinilpolipirrolidona (PVPP)

y se incubó a temperatura ambiente, con agitación, por 15 min Después se agregaron 1.5 ml de sulfato de sodio 2 M y se centrifugó a 11336 g por 5 min a temperatura ambiente. Se tomaron 0.9 ml de extracto tratado con PVPP que se mezclaron con 0.9 ml de hidróxido de sodio 2M y para enseguida incubar por 30 min A la mezcla se le adicionaron 0.138 ml de ácido clorhídrico y se centrifugó a 4000 g por 10 min. Para la determinación espectrofotométrica se tomaron 0.5 ml de sobrenadante y se mezclaron con 0.5 µl de solución de ferricianuro 2mM en amortiguador fosfato 0.2 M a pH 7.0. Finalmente se midió la absorbancia de la solución a 420 nm antes de 15 s usando amortiguador fosfato 0.2 M a pH 7.0 como blanco. Para la curva de calibración se utilizó el patrón sinigrina  $5,60 \times 10^{-3}$  M con diferentes diluciones que iban de 0 a 90 µl. Con los datos del espectrofotómetro se ajustó un modelo de regresión, para determinar la concentración de los GLs obtenidos del jugo de brócoli. El modelo utilizado fue:  $Y = -0.0041x + 0.9313$  ( $r^2$  de 0.97,  $P = 0.002$ ) y la concentración de glucosinolatos obtenida fue de 0.0029 mg/ml.

### **Efecto del jugo de brócoli (GLs) en *Alternaria in vitro***

El aislamiento de *Alternaria* se obtuvo de hojas de Arúgula proporcionada por la empresa Glezte ubicada en Axochiapan estado de Morelos, con síntomas de la mancha de la hoja. Los aislamientos se sembraron en medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA). Se estudiaron las características de los hongos de acuerdo a las claves morfológicas de Barnett y Hunter (1998) y Rotem (1994) y la identificación definitiva se realizó mediante secuenciación del ADN fungal.

Se probaron diferentes concentraciones para inhibir la germinación de esporas: 0.15, 0.11, 0.07, 0.04, 0.01, 0  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Para ello el jugo fue adicionado al medio de cultivo PDA, y luego se adicionaron 20  $\mu\text{l}$  de la solución de esporas de *Alternaria*. Con la ayuda de un microscopio se cuantificó la germinación de las esporas de *Alternaria* a las 2, 4 y 6 horas. Para la evaluación se consideraron 100 esporas al azar, para cada concentración se realizaron tres repeticiones. El porcentaje de inhibición se determinó mediante la fórmula:

$$\text{IN (\%)} = \frac{a-b}{a} * 100$$

Donde: a= Total de esporas germinadas en el testigo

b= Total de esporas germinadas en el tratamiento

### **Efecto del jugo de brócoli (GLs) en *Alternaria* en vivo**

El experimento se llevó a cabo en el Laboratorio de Fisiología de Frutales de la UACH, la Arúgula empleada fue proporcionada por la empresa Glezte ubicada en Axochiapan, Morelos. Ésta fue lavada y desinfectada con hipoclorito de sodio a 100 ppm, posteriormente se dividió el material vegetal en 4 grupos para las aplicaciones correspondientes. El grupo uno fue sumergido en jugo de brócoli a una concentración de 2.98  $\mu\text{g}/\text{ml}$  y luego fue inoculado con las esporas de *Alternaria*; el grupo dos fue sumergido a una concentración de 1.49  $\mu\text{g}/\text{ml}$  en jugo de brócoli más la inoculación de esporas de *Alternaria*; el grupo tres solo fue inoculado con la solución de esporas de *Alternaria* ( $1 \times 10^6$ ) y el grupo cuatro fue el testigo (sin concentraciones y sin inóculo). Posteriormente las Arúgulas se secaron y finalmente se envasaron en charolas rígidas conteniendo 100 g de

planta y se almacenaron en refrigeración a 0, 4 °C y a temperatura ambiente (22 °C) durante 15 días.

La severidad del daño por hongo se evaluó cada tercer día y se reportó como porcentaje de infección por planta, utilizando una escala diagramatizada elaborada con el programa 2log. Con esta calificación nominal se obtuvo el índice poblacional de severidad al aplicar la siguiente fórmula:

$$IS = \sum_{i=1}^K X_{ki}(N_{ki}) / N_j$$

Donde: IS = índice de severidad

$X_{ki}$  = nivel del daño en el momento i

$N_{ki}$  = número de plantas con el nivel del daño en el momento i

$N_j$  = número total de plantas evaluadas

La incidencia del daño en las hojas se determinó mediante la fórmula:

$I \% = n_i / N_j * 100$  Donde: I (%) = incidencia de la enfermedad en porcentaje

$n_i$  = número de plantas enfermas en el momento i

$N_j$  = número total de plantas evaluadas.

### **Efecto de GLs en la calidad postcosecha de Arúgula en vivo**

El efecto del jugo de brócoli en la calidad y vida de anaquel de las hojas de Arúgula, se evaluó a través de las siguientes variables:

#### **Color**

Se determinó mediante un espectrofotómetro de esfera X Rite modelo SP62, el cual a partir de un sistema triestímulo permite obtener las dimensiones L, a y b.

El parámetro L mide directamente la luminosidad o brillantez y varía de 0 (color totalmente oscuro) hasta 100 (máximo brillo). El valor “a” si es positivo representa al color rojo mientras que si es negativo representa el color verde positivo y verde si es negativo. El parámetro “b” si es positivo corresponde al amarillo mientras que si es negativo corresponde al azul (Figuroa *et al.*, 2001).

### **Clorofilas**

Se determinaron por el método descrito por Witham *et al.* (1971); se pesó 0.1g de tejido fresco, se cortó en pequeños pedazos, que se maceraron con 5 ml de acetona al 100% v/v y se dejó reposar por 3 min y después se uniformizó la muestra con un homogenizador T25 basic IKA Labortechnik. Se procedió luego a filtrar con gasa y al residuo se le adicionó acetona hasta aforar a 5 ml y se dejó reposar. Posteriormente se aforó a 25 ml con acetona y se determinó la absorbancia a 662 y 645 nm en un espectrofotómetro Genesys Thermo Scientific (E.U). Los cálculos se realizaron con las siguientes formulas:

$$\text{Clorofila a (Ca)} = 11.24 (A662) - 2.04 (A645)$$

$$\text{Clorofila b (Cb)} = 20.13 (A645) - 4.19 (A662)$$

$$\text{Clorofila total (Ca+b)} = 7.05 (A662) + 18.09 (A645).$$

### **CO<sub>2</sub> y Etileno**

Se colocaron las hojas de Arúgula en recipientes de vidrio con tapa hermética por 1 hora, pasado este tiempo se extrajeron 5 ml de la muestra con una jeringa (10 ml) y se colocaron en un vacutainer al vacío a -20 °C hasta su evaluación. Se tomó 1 ml cada muestra y se inyectó en un cromatógrafo de gases (Varian

Star 3400), con detector de ionización de flama (FID) y columna capilar *Chrompak* de 27.5 m de largo, 0.32 mm de diámetro interno y 0.45 mm de diámetro externo y con capa porosa de sílica como fase estacionaria. El gas de arrastre fue helio; las temperaturas del cromatógrafo fueron de 80, 150, 250 y 170 °C en columna, inyector, auxiliar y detector, respectivamente.

### **Análisis estadístico**

Los datos obtenidos *in vitro* y en vivo se sometieron a un análisis de varianza y pruebas de comparación de medias de Tukey ( $P=0.05$ ) mediante programa estadístico SAS. El diseño experimental utilizado en ambos experimentos fue completamente al azar, con tres repeticiones.

## **3.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **Efecto del jugo de brócoli (GLs) en *Alternaria alternata in vitro***

Se identificó una colonia fungal de color verde oscuro en hojas de Arúgula. Al observarla al microscopio ésta presentó, conidióforos simples de color café claro tabicados, y conidios con septa transversal y longitudinal, características que corresponden a la especie de *Alternaria alternata* de acuerdo a las claves y descripciones de Barnett y Hunter (1998) y Rotem (1994).

Esta identificación morfológica fue confirmada por la secuenciación del genoma fungal alineada en el banco de genes (NCBI), de acuerdo con lo reportado por Andersen *et al.* (2001) y Fraire *et al.* (2010).

En la figura 1 se muestra el efecto a las 6 horas de diferentes concentraciones de jugo de brócoli (GLs) en la inhibición de la germinación de esporas de *Alternaria* incubadas a 26 °C.

En ella se puede observar que para las concentraciones 0.15, 0.11 y 0.07 µg/µl, el porcentaje de germinación fue del 0 %, mientras que las concentraciones de 0.01 y 0.04 µg/µl presentan menor control, lo cual sugiere que a mayor concentración de GLs se presentó un menor crecimiento fungal.

Todos los tratamientos con jugo de brócoli GLs disminuyeron el crecimiento del hongo respecto al testigo (sin tratamiento). Varios autores han demostrado previamente que los GLs tienen efecto en contra de algunos patógenos.

Por ejemplo Sisti *et al.* (2006), quienes probaron el efecto del jugo acuoso crudo de *Brassica* en la inhibición del crecimiento del hongo *Candidas albicans* encontraron que después de 4 horas de incubación a una concentración de 10.9 µg/ml obtuvieron 95 % de inhibición, resultados similares a los encontrados en este estudio. Mari *et al.* (1996) reportan que los isotiocinatos derivados de los glucosinolatos usados a una concentración de 3.6 mg/ml controlaron completamente al hongo *Penicillium expansum* en frutos de pera.

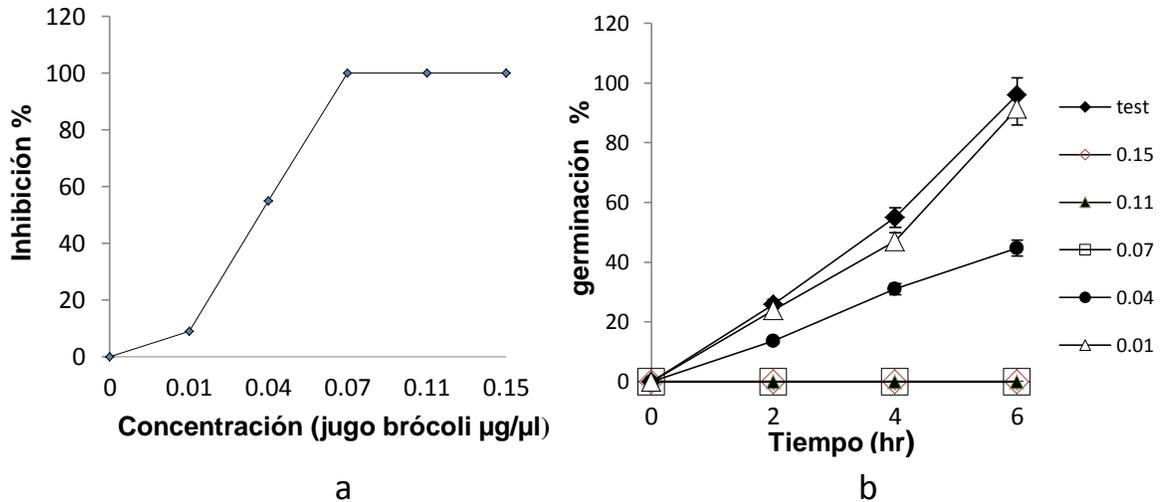


Figura 1 a) efecto de las concentraciones de jugo de brócoli en la inhibición de la germinación de esporas de *Alternaria alternata* en hojas en vivo de Arúgula (*Eruca sativa*). b) efecto de las concentraciones de jugo de brócoli a través del tiempo en el porcentaje de germinación de esporas de *Alternaria alternata* en Arúgula

Así mismo sustancias volátiles obtenidas de plantas de *Brassicca rapa* y a una concentración de 20 mg/g inhibieron el crecimiento micelial de *Rhizoctonia solani* (Masahiro *et al.*, 2006). Los resultados obtenidos en el presente estudio corroboran el efecto inhibitorio de los GLs en la germinación de esporas de *Alternaria alternata* en concordancia con lo obtenido en previos trabajos.

Por lo que se puede concluir que el jugo de brócoli (GLs) posee potencial antifúngico y podría ser usado como tratamiento en postcosecha, con el fin de disminuir los daños causados por *Alternaria alternata*.

### Efecto del jugo de broccoli (GLs) en *Alternaria alternata* en vivo

En el Cuadro 1 se presentó el porcentaje de severidad de daño (% del tejido dañado en relación al total del tejido evaluado) causado por *A. Alternata* en

hojas de Arúgula. Se puede observar que el tratamiento sin GLs + inóculo presentó la mayor severidad del daño durante todo el periodo de evaluación, mientras que la menor severidad se obtuvo cuando se utilizó la concentración de 2.98 µg/ml + inóculo, es evidente el efecto del jugo de brócoli (GLs) en la disminución del daño causado por *A. Alternata*. Los resultados obtenidos en este trabajo fueron superiores a los reportados por Troncoso-Rojas *et al.* (2005) quienes tuvieron una reducción del 80 % en el daño causado por *Alternaria alternata* en tomates, al utilizar isotiocinatos (ITCs) (derivados de los glucosinolatos), a una concentración de 0.56 mg/ml.

Así mismo, se encontró que no existieron diferencias significativas entre tratamientos hasta el día cinco de evaluación, y fue a partir del día siete que la concentración de 2.98 µg/ml de GLs + inóculo presentó la menor severidad de daño con excepción del día nueve. Por lo que dicha concentración resultó ser más efectiva para el control de *A. Alternata*, similar resultado obtenido por Tiznado-Hernández y Troncoso-Rojas (2006) quienes demostraron que el isotiocinato (ITC) 3-metilsufnil-3-butenil a una concentración de 3.6 mg/ml, inhibió totalmente el crecimiento de *Monilinia laxa* en frutos de pera. En otro experimento, se demostró que el (ITC) de bencil a las concentraciones de 0.28 y 0.56 mg/ml inhibió en 100 % el crecimiento micelial de *Alternaria alternata* en frutos de pimiento morrón (Troncoso *et al.*, 2005).

**CUADRO 1.** Efecto de las diferentes concentraciones de GLs y temperaturas de almacenamiento en la severidad del daño de *A. alternata* en hojas de Arúgula.

Factor /Nivel µg/ml GLs	% de Severidad de daño de <i>Alternaria</i>							
	Día 0	Día 3	Día 5	Día 7	Día 9	Día11	Día13	Día15
<b>Concentraciones</b>								
Sin GLs, sin inóculo	0 <sup>*</sup>	5.5 b <sup>†</sup>	9.26 a	13.8 b	4.16 b	9.03 b	13.1 b	17.3 b
Sin GLs + inóculo	0	6.90 a	12.9 b	22.6 a	13.1 a	17.3 a	19.8 a	37.2 a
1.49 GLs + inóculo	0	1.80 c	5.09 c	6.90 c	0.69 c	2.08 c	3.40 c	3.40 c
2.98 GLs + inóculo	0	1.30 c	3.70 c	5.00 d	0.00 c	0.00 d	0.00 d	0.00 d
DMSH		0.90	2.02	1.80	2.81	2.78	2.50	2.50
<b>Temperatura °C</b>								
22	0	11.8 a	22.5 a	32.2 a	- <sup>‡</sup>	-	-	-
4	0	0.00 b	0.69 b	3.10 b	5.90 a	9.30 a	11.6 a	17.7 a
0	0	0.00 b	0.00 b	1.04 c	3.10 b	4.80 b	6.59 b	11.6 b
DMSH		0.73	1.58	1.41	1.40	1.45	1.31	2.60

<sup>†</sup>Medias con la misma letra dentro de columnas no son diferentes (Tukey con  $P \leq 0.05$ ). <sup>\*</sup>No significativo; DMSH: Diferencia mínima significativa honesta. GLs: Glucosinolatos; <sup>‡</sup>Datos perdidos por senescencia.

En cuanto al tratamiento manejado a temperatura ambiente (22 °C) se observó mayor daño causado por *A. Alternata* durante el periodo de almacenamiento. Las temperaturas de almacenamiento de 0 y 4 °C fueron estadísticamente iguales los días tres y cinco de almacenamiento, sin embargo a partir del día siete en adelante existieron diferencias significativas entre ambos, por lo que se puede observar que la temperatura de 0 °C proporcionó mayor control de la presencia de *A. Alternata* que la de 4 °C. En cuanto a la conservación de la calidad, Koukounaras *et al.* (2007) mencionan que las hojas de Arúgula se pueden refrigerar con buenos resultados a 0 °C, con una vida de almacenamiento máximo de 16 días, un comportamiento similar a los resultados de éste trabajo. Además se reporta que el almacenamiento a 5 °C produjo un deterioro ligero de la calidad y la vida útil se redujo 3 días, resultados similares a los obtenidos en este estudio, por lo que se puede concluir que el almacenamiento a 0 °C incrementa la vida de anaquel de Arúgula.

Los resultados del ensayo en vivo, al igual que los obtenidos del ensayo in vitro demostraron el efecto de los GLs sobre la inhibición de la germinación de esporas de *A. alternata* aislada de hojas de Arúgula. El modo de acción de los GLs no está dilucidado aún pero se postula que puede causar rompimiento a la pared y membrana celular e interferir con el buen funcionamiento de enzimas metabólicas, síntesis de proteínas y el sistema génico del patógeno (Rodríguez-Sauceda, 2011).

Se determinó que la incidencia de *A. Alternata* (Cuadro 2) mediante la combinación del porcentaje de plantas enfermas con relación al total de plantas evaluadas. La concentración de 2.98 µg/ml presentó 0 % de incidencia mientras que el tratamiento sin GLs + inóculo presentó la mayor incidencia (87.5 %) al final de la vida útil. Monfor *et al.* (2007) comprobaron que especies de Brassicas cultivadas en Georgia, EUA, como el nabo, brócoli y rábano, contienen propiedades que actúan contra hongos del suelo disminuyendo en 80 % la incidencia de estos microorganismos.

En el Cuadro 2 se observó que a partir del día tres, hubo diferencias significativas entre tratamientos, pero del día nueve en adelante la concentración de 2.98 µg/ml de GLs, fue la que produjo 0 % de incidencia.

En relación al efecto de la temperatura de almacenamiento sobre la incidencia de *Alternaria*, se observó que ésta fue mayor a temperatura ambiente (22 °C), mientras que para el tratamiento de 0 °C no se presentaron diferencias significativas los días tres, cinco y siete, pero a partir del día nueve y hasta el

día 15 si hubo diferencias estadísticas entre los tratamientos lo cual implica que la mejor temperatura para la conservación de las hojas de Arúgula fue de 0 °C.

**CUADRO 2.** Efecto de diferentes concentraciones de GLs y temperaturas de almacenamiento en la incidencia de *A. alternata* en hojas de Arúgula.

Factor /Nivel µg/ml GLs	% Incidencia								
	Día 0	Día 3	Día 5	Día 7	Día 9	Día11	Día13	Día15	
<b>Concentraciones</b>									
Sin GLs, sin inóculo	0*	22.2 a <sup>†</sup>	38.8 a	41.6 a	29.1 b	37.5 b	50.0 b	58.3 b	
Sin GLs + inóculo	0	27.7 a	30.0 ab	52.7 a	50.0 a	62.5 a	75.0 a	87.5 a	
1.49 GLs + inóculo	0	11.1 b	19.4 b	25.0 b	4.16 c	8.30 c	20.8 c	20.8 c	
2.98 GLs + inóculo	0	8.30 b	16.6 b	22.2 b	0.00 c	0.00 c	0.00 d	0.00 d	
DMSH		9.38	9.38	15.3	18.8	9.87	18.8	18.8	
<b>Temperatura °C</b>									
22	0	52.0 a	75.0 a	85.4 a	- <sup>†</sup>	-	-	-	
4	0	0.00 b	4.16 b	14.5 b	29.1 a	33.3 a	41.6 a	50.0 a	
0	0	0.00 b	0.00 b	6.20 c	12.5 b	20.8 b	31.2 b	35.4 b	
DMSH		7.30	7.35	12.0	9.80	9.87	9.80	7.60	

<sup>†</sup>Medias con la misma letra dentro de columnas no son diferentes (Tukey con  $P \leq 0.05$ ). \* No significativo; DMSH: Diferencia mínima significativa honesta. GLs: Glucosinolatos; <sup>†</sup>Datos perdidos por senescencia.

### Ángulo hue

En relación al ángulo hue medido en hojas de Arúgula hubo diferencias significativas de acuerdo a las concentraciones de GLs usadas durante todos los días de evaluación. A partir del día tres, el tratamiento 2.98 µg/ml de GLs + inóculo fue estadísticamente superior a los demás tratamientos seguido por 1.49 µg/ml de GLs + inóculo (Cuadro 3).

El color verde es un importante atributo para la percepción de frescura en hojas de Arúgula, por lo que el empleo del GLs favorece la permanencia del color verde por lo tanto mantiene la calidad de las mismas (Char *et al.* 2012). El tratamiento con inóculo y sin GLs presentó los valores promedio más bajos de

ángulo hue los cuales oscilan de 111 (verde) a 98 (amarillo) durante los 15 días de evaluación, por lo que este tratamiento presentó mayores daños en las hojas, lo cual podría explicarse debido a que el hongo inhibió la fosforilación al unirse al cloroplasto generando pérdida de color (Pavón *et al.*, 2012).

Koukounaras *et al.*, (2009) en un trabajo realizado en Arúgula, obtuvieron valores de ángulo hue de 126 a 122, con muy poco decremento. Lo que significa un mejor mantenimiento del color verde, situación que también se observó en este trabajo.

Con relación al efecto de la temperatura del almacenamiento a 0 °C, superó estadísticamente a las otras temperaturas empleadas, a partir del día tres al 15 de almacenamiento, reteniendo con mayor eficacia el color verde pues fue la que presentó valores más altos de ángulo hue, coincidiendo con los resultados obtenidos en el trabajo realizado por Koukounaras *et al.* (2007) quienes afirman que las hojas de Arúgula se pueden refrigerar con buenos resultados a 0 °C, así mismo con Marie *et al.* (2012) señalan que a 2 °C, la Arúgula mantiene su color verde hasta por 7 días.

Por el contrario, el almacenamiento a 20 °C por 4 y 6 días, produjo un amarillamiento intenso, y en consecuencia hubo pérdida de la calidad del producto.

**CUADRO 3.** Efecto de las diferentes concentraciones de GLs y temperaturas de almacenamiento en ángulo hue en hojas de Arúgula

Factor /Nivel µg/ml GLs	Ángulo hue							
	Día 0	Día 3	Día5	Día 7	Día9	Día11	Día13	Día15
<b>Concentraciones</b>								
Sin GLs, sin inóculo	116*	113c <sup>†</sup>	111 c	108 c	108 c	106 c	103 c	102 c
Sin GLs + inóculo	116	111 d	105 d	105 d	105 d	102 d	101 d	98.4 d
1.49 GLs+ inóculo	116	114 b	112 b	111 b	111 b	110 b	110 b	109 b
2.98 GLs+ inóculo	116	116 a	115 a	114 a	114 a	114 a	113 a	112 a
DMSH		0.36	0.41	0.30	0.30	0.40	0.37	0.46
<b>Temperatura °C</b>								
22	116	113 b	107 c	94.3c	- <sup>†</sup>	-	-	-
4	116	113 b	112 b	112 b	109 b	107 b	106 b	104 b
0	116	114 a	113 a	113 a	110 a	109 a	107 a	106 a
DMSH		0.28	0.32	0.32	0.16	0.21	0.19	0.24

<sup>†</sup>Medias con la misma letra dentro de columnas no son diferentes (Tukey con  $P \leq 0.05$ ). \* No significativo; DMSH: Diferencia mínima significativa honesta. GLs: Glucosinolatos; <sup>†</sup>Datos perdidos por senescencia.

### Croma

En cuanto a la variable croma se aprecia que hubo diferencias significativas entre tratamientos; la concentración 2.98 µg/ml de GLs + inóculo presentó la menor pérdida de saturación, mientras que el tratamiento sin GLs + inóculo tuvo la mayor pérdida por lo que las hojas se tornaron amarillas al final del almacenamiento (Cuadro 4). Estos resultados coinciden con un estudio previo de hojas de Arúgula donde el croma de las hojas aumentó de 26.39 a 34.22 a los 14 días de almacenamiento reduciendo la vida de anaquel (Koukounaras *et al.*, 2008).

El relación a las temperaturas todas fueron estadísticamente diferentes desde el día tres, en donde el valor más alto (39.0) se registró a los siete días con 22 ° y el más bajo se presentó a los 0 °C, considerándose ésta última como la más

adecuada para mantener la intensidad del color en el producto. Situación que coincide con los resultados obtenidos en ángulo hue.

**CUADRO 4.** Efecto de las diferentes concentraciones de GLs y temperaturas de almacenamiento en el croma de hojas de Arúgula.

Factor /Nivel µg/ml GLs	Croma							
	Día 0	Día 3	Día 5	Día 7	Día 9	Día11	Día13	Día15
<b>Concentraciones</b>								
Sin GLs, sin inóculo	22.1 <sup>†</sup>	22.0 c <sup>†</sup>	25.6 b	30.4 b	26.6 b	28.8 b	31.4 b	33.2 b
Sin GLs + inóculo	22.1	23.9 a	27.5 a	34.5 a	30.4 a	32.7 a	35.0 a	36.7 a
1.49 GLs + inóculo	22.1	22.6 b	24.2 c	23.7 c	23.7 c	24.4 c	24.8 c	26.2 c
2.98 GLs + inóculo	22.1	22.2 c	23.4 d	24.0 d	24.0 d	23.3 d	23.4 d	23.6 d
DMSH		0.29	0.32	0.37	0.37	0.34	0.41	0.32
<b>Temperatura °C</b>								
22	22.1	23.2 a	28.5 a	39.0 a	- <sup>†</sup>	-	-	-
4	22.1	22.6 b	24.0 b	25.3 b	24.8 b	26.0 b	27.6 b	30.8 a
0	22.1	22.3 c	23.0 c	23.9 c	27.1 a	28.6 a	29.7 a	29.0 b
DMSH		0.228	0.251	0.182	0.196	0.178	0.219	0.169

<sup>†</sup>Medias con la misma letra dentro de columnas no son diferentes (Tukey con P≤0.05). \* No significativo; DMSH: Diferencia mínima significativa honesta. GLs: Glucosinolatos; <sup>†</sup>Datos perdidos por senescencia.

### Luminosidad

En el Cuadro 5 se presentan los resultados obtenidos para luminosidad donde se aprecia que hubo diferencias significativas entre todos los tratamientos. Con la concentración de 2.98 µg/ml se tuvo un incremento de 32.4 a 34.0 durante todo el periodo de almacenamiento, lo que indica que las hojas conservaron su brillantez, en cambio para el tratamiento sin GLs + inóculo, se presentó mayor luminosidad con una tasa de 32.4 a 49.0, con la consecuente pérdida de brillantez.

Con respecto al efecto de las temperaturas, a partir del día tres de almacenamiento todas fueron estadísticamente diferentes; en la temperatura de 22 °C se presentó una luminosidad de 50.2, mientras que con la de 0 °C mostró

un valor de 39.1 a los 15 días, coincidiendo con los resultados obtenidos para ángulo hue y croma. De estos resultados se puede concluir que la combinación de GLs más almacenamiento a una temperatura de 0 °C, se tuvo un efecto positivo al evitar la pérdida de brillantez y con ella de calidad, durante los días de almacenamiento conservando en buenas condiciones todo el producto.

**CUADRO 5.** Efecto de las diferentes concentraciones de GLs y temperaturas de almacenamiento en la luminosidad de hojas de Arúgula.

Factor /Nivel µg/ml GLs	Luminosidad								
	Día 0	Día 3	Día 5	Día 7	Día 9	Día11	Día13	Día15	
<b>Concentraciones</b>									
Sin GLs, sin inóculo	32.4 <sup>*</sup>	30.c <sup>†</sup>	33.5 b	36.0 b	36.0 b	38.0 b	39.6 b	40.9 b	
Sin GLs + inóculo	32.4	32.7 a	35.8 a	44.7 a	41.7 a	43.4 a	46.0 a	49.0 a	
1.49 GLs + inóculo	32.4	32.1 b	33.4 b	34.3 c	34.3 c	35.2 c	36.0 c	36.8 c	
2.98 GLs+ inóculo	32.4	32.0 b	32.7 c	33.1 d	33.1 d	33.5 d	33.6 d	34.0 d	
DMSH		0.29	0.29	0.45	0.45	0.45	0.39	0.44	
<b>Temperatura °C</b>									
22	32.4	32.3 a	35.8 a	50.2 a	- <sup>†</sup>	-	-	-	
4	32.4	31.7 b	33.4 b	35.2 b	35.7 b	37.0 b	38.0 b	41.3 a	
0	32.4	31.1 c	32.3 c	33.9 c	36.8 a	38.1 a	39.6 a	39.1 b	
DMSH		0.234	0.233	0.283	0.237	0.239	0.205	0.235	

<sup>†</sup>Medias con la misma letra dentro de columnas no son diferentes (Tukey con  $P \leq 0.05$ ). <sup>\*</sup>No significativo; DMSH: Diferencia mínima significativa honesta. GLs: Glucosinolatos; <sup>†</sup>Datos perdidos por senescencia.

Estos resultados dan una clara idea del efecto de los glucosinolatos sobre el color de las hojas de Arúgula. Koukounaras *et al.* (2007, 2008) mencionan que las hojas almacenadas a 10 °C muestran una gran alteración en los parámetros de color, con resultados de 41.3 a 56.11 en hojas maduras, un aumento en los valores implica oscurecimiento en los tejidos el cual es consecuencia de reacciones oxidativas (Guevara *et al.*, 2003). A diferencia de los resultados obtenidos en este estudio, la pérdida de luminosidad es mínima, por lo que el tratamiento aplicado, mantiene en mejores condiciones la calidad de la hoja.

## Clorofilas

En cuanto a lo observado en el contenido de clorofilas en las hojas de Arúgula, se aprecia que la concentración de 2.98 µg/ml de GLs + inóculo generó la menor pérdida de clorofilas, con un contenido de 0.55 mg/g en el transcurso de la evaluación mientras que sin GLs + inóculo se presentó la mayor pérdida (0.36 mg/g), lo que significa que los GLs permitieron que las hojas de Arúgula conservaran más clorofilas (Cuadro 6). Los valores obtenidos en este estudio son superiores a los encontrados por Koukounaras *et al.* (2007) los que encontraron un contenido de clorofilas de 0.49 µg/g, pero se asemejan a los niveles encontrados por Nicola *et al.* (2010) con 0.58 mg/g. En este estudio, se encontró que existieron diferencias significativas en respuesta a todas las concentraciones aplicadas del día tres al día 15 de almacenamiento. Por su parte Martínez-Sánchez *et al.* (2006) reportan una disminución de 75 % de clorofilas, resultado muy diferente al encontrado en este trabajo.

Con relación al efecto de las temperaturas en el contenido total de clorofilas se observó que a 22 °C se tuvo una mayor pérdida de clorofila durante el periodo de almacenamiento, respecto a las temperaturas de 0 y 4 °C, en donde se presentó la menor pérdida. Por lo que de acuerdo a los resultados obtenidos se puede concluir que la concentración de 2.98 µg/ml de GLs + inóculo fue la mejor al preservar tanto el contenido de la clorofila como el ángulo hue y la luminosidad. Por su parte, Nicola *et al.* (2010) confirman que las bajas temperaturas retardan la pérdida de clorofilas, toda vez que a 12 °C obtuvieron un decremento de 53 y 59 % después de 10 días de almacenamiento.

**CUADRO 6.** Efecto de las diferentes concentraciones de GLs y temperaturas de almacenamiento en el contenido total de clorofila en hojas de Arúgula.

Factor /Nivel µg/ml GLs	Clorofila Total mg/g								
	Día 0	Día 3	Día 5	Día 7	Día 9	Día11	Día13	Día15	
<b>Concentraciones</b>									
Sin GLs, sin inóculo	0.76 <sup>*</sup>	0.60c <sup>†</sup>	0.55 c	0.55 c	0.52 c	0.48 c	0.48 c	0.42 c	
Sin GLs + inóculo	0.76	0.55 d	0.48 d	0.48 d	0.46 d	0.43 d	0.39 d	0.36 d	
1.49 GLs + inóculo	0.76	0.67 b	0.63 b	0.63 b	0.62 b	0.59 b	0.53 b	0.50 b	
2.98 GLs + inóculo	0.76	0.72 a	0.68 a	0.68 a	0.66 a	0.64 a	0.60 a	0.55 a	
DMSH		0.005	0.002	0.002	0.002	0.002	0.003	0.003	
<b>Temperatura °C</b>									
22	0.76	0.60 c	0.50 c	0.37 c	- <sup>†</sup>	-	-	-	
4	0.76	0.64 b	0.60 b	0.57 b	0.54 b	0.51 b	0.46 b	0.41 b	
0	0.76	0.69 a	0.66 a	0.62 a	0.59 a	0.56 a	0.52 a	0.50 a	
DMSH		0.004	0.001	0.002	0.001	0.001	0.001	0.001	

<sup>†</sup>Medias con la misma letra dentro de columnas no son diferentes (Tukey con  $P \leq 0.05$ ). <sup>\*</sup>No significativo; DMSH: Diferencia mínima significativa honesta. GLs: Glucosinolatos; <sup>†</sup>Datos perdidos por senescencia.

## Respiración

La respiración es un proceso de interés en el proceso de maduración de hierbas aromáticas. En este estudio con la aplicación de la concentración de 2.98 µg/ml de Glucosinolatos se presentó una tasa baja de respiración a los 15 días de almacenamiento de 0.03 % CO<sub>2</sub> mientras que en el tratamiento sin GLs + inóculo la tasa de respiración fue mayor con valores de 0.10 % de CO<sub>2</sub>, siendo estas diferencias significativas a partir del día tres al final del almacenamiento (Cuadro 7). Martínez-Sánchez *et al.* (2006) evaluaron la respiración de diferentes hojas baby de Arúgula, y obtuvieron valores de 940, 650, 600 y 300 µmol CO<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup>g<sup>-1</sup>. Estos resultados muestran que la respiración es muy susceptible al cambio de la temperatura y pequeños incrementos en ésta aumenta dramáticamente la tasa de respiración.

En este estudio, se encontró que a 0 °C, se presentaron valores bajos de CO<sub>2</sub> (0.05 %) mientras que a temperatura ambiente se registró 0.12 % de CO<sub>2</sub>, encontrándose diferencias significativas a partir del día tres. Al incrementarse la temperatura aumentó drásticamente la respiración y con ello el producto tiene pérdida de nutrientes y vapor de agua (González-Aguilar, 2005).

Por lo que el almacenamiento de bajas temperaturas constituye una herramienta importante en la disminución de diversos procesos fisiológicos que conllevan a alterar la vida de anaquel de Arúgula (Rennie *et al.*, 2003).

**CUADRO 7.** Efecto de las diferentes concentraciones de GLs y temperaturas de almacenamiento en % CO<sub>2</sub>, en hojas de Arúgula.

Factor /Nivel µg/ml GLs	% CO <sub>2</sub>							
	Día 0	Día 3	Día5	Día 7	Día 9	Día11	Día13	Día15
<b>Concentraciones</b>								
Sin GLs, sin inóculo	0.05*	0.08b <sup>†</sup>	0.10 a	0.09 b	0.06 b	0.06 b	0.06 b	0.06 b
Sin GLs + inóculo	0.05	0.08 a	0.06 b	0.11 a	0.08 a	0.09 a	0.09 a	0.10 a
1.49 GLs + inóculo	0.05	0.06 c	0.06 c	0.07 c	0.05 c	0.05 c	0.04 c	0.04 c
2.98 GLs+ inóculo	0.05	0.05 d	0.05 c	0.06 d	0.04 d	0.04 d	0.04 d	0.03 d
DMSH		0.008	0.001	0.008	0.001	0.009	0.001	0.001
<b>Temperatura °C</b>								
22	0.05	0.09 a	0.11 a	0.12 a	- <sup>†</sup>	-	-	-
4	0.05	0.06 b	0.08 b	0.07 b	0.05 b	0.06 a	0.06 a	0.06 a
0	0.05	0.05 c	0.07 c	0.05 c	0.06 a	0.05 b	0.05 b	0.05 b
DMSH		0.006	0.001	0.006	0.007	0.005	0.008	0.007

<sup>†</sup>Medias con la misma letra dentro de columnas no son diferentes (Tukey con P≤0.05). \* No significativo; DMSH: Diferencia mínima significativa honesta. GLs: Glucosinolatos; <sup>†</sup>Datos perdidos por senescencia.

## Etileno

En el Cuadro 8 se presentó el efecto de los GLs en la producción de etileno. Se encontró que la concentración de 2.98 µg/ml de GLs, produjo una concentración de etileno de 0.33 µl Kg<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, a diferencia del tratamiento sin GLs + inóculo en

donde se observa un valor de  $0.67 \mu\text{l Kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . A partir del día tres al 15 de refrigeración se observaron diferencias significativas, entre todos los tratamientos aplicados. Koukounaras *et al.* (2009) mencionan que al primer día de almacenamiento el etileno se disparó a  $2 \mu\text{l L}^{-1}$  decayendo hasta  $0.5 \mu\text{l L}^{-1}$  y argumentan que una concentración de  $1 \mu\text{l L}^{-1}$  fue responsable del amarillamiento de las hojas de Arúgula.

**CUADRO 8.** Efecto de las diferentes concentraciones de GLs y temperaturas de almacenamiento en la producción de etileno, en hojas de Arúgula.

Factor /Nivel $\mu\text{g/ml}$ GLs	Etileno $\mu\text{l Kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$							
	Día 0	Día 3	Día 5	Día 7	Día 9	Día11	Día13	Día15
<b>Concentraciones</b>								
Sin GLs, sin inóculo	0.30 <sup>*</sup>	0.53b <sup>†</sup>	0.59 b	0.67 b	0.56 b	0.53 b	0.52 b	0.55 b
Sin GLs + inóculo	0.30	0.62 a	0.75 b	0.86 a	0.74 a	0.63 a	0.92 a	0.67 a
1.49 GLs + inóculo	0.30	0.41 c	0.46 c	0.52 c	0.40 c	0.42 c	0.41 c	0.42 c
2.98 GLs+ inóculo	0.30	0.34 d	0.38 d	0.41 d	0.34 d	0.35 d	0.33 d	0.33 d
DMSH		0.008	0.005	0.020	0.012	0.007	0.005	0.004
<b>Temperatura °C</b>								
22	0.30	0.66 a	0.73 a	0.83 a	- <sup>†</sup>	-	-	-
4	0.30	0.43 b	0.54 b	0.61 b	0.63 a	0.57 a	0.54 a	0.59 a
0	0.30	0.34 c	0.37 c	0.40 c	0.39 b	0.40 b	0.40 b	0.40 b
DMSH		0.006	0.004	0.015	0.006	0.004	0.002	0.002

<sup>†</sup>Medias con la misma letra dentro de columnas no son diferentes (Tukey con  $P \leq 0.05$ ). <sup>\*</sup>No significativo; DMSH: Diferencia mínima significativa honesta. GLs: Glucosinolatos; <sup>†</sup>Datos perdidos por senescencia.

El almacenamiento produjo bajas concentraciones de etileno con la temperatura de  $0 \text{ }^\circ\text{C}$  ( $0.40 \mu\text{l Kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ), mientras que a temperatura ambiente, el etileno se incrementó a  $0.83 \mu\text{l kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . Able *et al.* (2005), obtuvieron valores relativamente bajos de  $0.9 \text{ nl}$  a  $0.5 \text{ nl g}^{-1}\text{FW h}^{-1}$  a  $2 \text{ }^\circ\text{C}$  mientras que Char *et al.* (2012) presentan valores de  $77.7$  a  $47.6 \text{ nl g}^{-1}\text{FW h}^{-1}$  a  $5 \text{ }^\circ\text{C}$ . Nuevamente se observó que el almacenamiento a  $0^\circ\text{C}$  presentó la mejor conservación, ya que se reduce

la producción de etileno y por lo tanto se retrasó la maduración en las hojas de Arúgula.

### 3.7 CONCLUSIONES

La concentración mínima de 0.07 µg/ml de jugo de brócoli (GLs), inhibió en 100 % la germinación de esporas de *Alternaria alternata* bajo condiciones *in vitro*, mientras que en vivo la concentración de 2.98 µg/ml redujo en mayor porcentaje la severidad del daño causado por *Alternaria* en hojas de Arúgula. La calidad de hojas de Arúgula y la vida de anaquel fueron mejor conservadas con la aplicación de GLs y el almacenamiento de la temperatura de 0 °C, permitiendo conservar el color y la calidad de la misma. Por lo que el jugo de brócoli (GLs) al mostrar evidencia antifúngica, podría ser utilizado como una alternativa ecológica para el control de *Alternaria alternata* durante el manejo postcosecha en Arúgula.

### 3.8 LITERATURA CITADA

ABLE, A. J.; WONG, L. S.; PRASAD, A.; O'HARE, J. 2005. The physiology of senescence in detached pak choy leaves (*Brassica rapa* var. *Chinensis*) during storage at different temperatures. *Postharvest Biology and Technology* 35:271-278.

ANDERSEN, B.; KROGER E.; ROBERTS, G. 2001. Chemical and Morphological segregation of *Alternaria alternata*, *A. gaisen* and *A. longipes*. *Mycological Research* 105:291-299.

- ARTES, F. 2006. El envasado en atmósfera modificada mejora la calidad de consumo de los productos hortofrutícolas intactos y mínimamente procesados en fresco. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha* 7(2):61-85.
- BARNETT, H. L.; HUNTER, B. B. 1998. *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*. Cuarta edición. Minnesota. APS Press. 210 p.
- BELLOSTAS, N.; SORENSEN, J. C.; SORENSEN, H. 2004. Quantitative and qualitative evaluation of glucosinolates in cruciferous plants during their life cycles. *Agroindustria* 3(3):5-10.
- BRANDI, G.; AMAGLIANI, G.; SCHIAVANO, G.; DE SANTI, M.; SISTI, M. 2006. Activity of *Brassica oleracea* leaf juice on foodborne pathogenic bacteria. *Journal of Food Protection* 69(9):2274–2279.
- CHAR, C.; SILVEIRA, A. C.; INESTROZA-LIZARDO C.; HINOJOSA, A.; MACHUCA, A.; ESCALONA, V. H. 2012. Effect of noble gas-enriched atmospheres on the overall quality of ready-to-eat Arúgula salads. *Postharvest Biology and Technology* 73:50-55.
- FRAIRE-CORDERO, M. L.; NIETO-ÁNGEL, D.; CÁRDENAS-SORIANO, E. 2010. *Alternaria tenuissima*, *A. alternata* y *F. oxysporum* hongos causantes de la pudrición de florete de brócoli. *Revista Mexicana de Fitopatología* 28(1):25-33.
- FIGUEROA, I.; M. T. COLINAS; J. MEJÍA; F. RAMÍREZ. 2005. Cambios fisiológicos en postcosecha de dos cultivares de rosa con diferente duración en florero. *Cien. Inv. Agr.* 32(3):209-219.

- GARCÍA, I. E.; GAGO, C. L.; FERNÁNDEZ, N., J. L. 2006. Tecnología del Envasado en Atmósfera Protectora. CIEM. Dirección General de Universidades e Investigación. 141 p.
- GONZÁLEZ-AGUILAR, G. A. 2005. Nuevas Tecnologías de Conservación de Productos Vegetales Frescos Cortados. CIAD México. 558 p.
- GUEVARA, J. C.; YAHIA, E. M.; BRITO DE LA FUENTE, E.; BISERKA, S.P. 2003. Effects of elevated concentrations of CO<sub>2</sub> in modified atmosphere packaging on the quality of prickly pear cactus stems (*Opuntia* spp). Postharvest Biology and Technology 29:167-176.
- HERNÁNDEZ-LAUZARDO, A.; BAUTISTA-BAÑOS, S.; VELÁZQUEZ, M. 2007. Prospectiva de Extractos Vegetales para controlar enfermedades postcosecha hortofrutícolas. Revista Fitotecnia Mexicana 2:119-123.
- JEZEK, J.; BARRY, G.; HAGGETT, D.; ATKINSON, A.; RAWSON, D. M. 1999. Determination of glucosinolates using their alkaline degradation and reaction with ferricyanide. J. Agric. Food Chem. 47:4669-4674.
- KOUKOUNARAS, A.; SIOMOS, A. S.; SFAKIOTAKIS, E. 2007. Postharvest CO<sub>2</sub> and ethylene production and quality of rocket (*Eruca sativa* Mill.) leaves as affected by leaf age and storage temperature. Postharvest Biology and Technology 46:167-173.
- KOUKOUNARAS, A.; SIOMOS, A. S.; SFAKIOTAKIS, E. 2008. Effects of degree of cutting and storage on atmosphere composition, metabolic activity and quality of rocket leaves under modified atmosphere packaging. Journal of Food Quality 33: 303-316.

- KOUKOUNARAS, A.; SIOMOS, A. S.; SFAKIOTAKIS E. 2009. Impact of heat treatment on ethylene production and yellowing of modified atmosphere packaged rocket leaves. *Postharvest Biology and Technology* 54:172-176.
- MARI, M.; IORI, R.; LEONI, O.; MARCHI, A. 1996. Bioassays of glucosinolate-derived isothiocyanates against postharvest pear pathogens. *Plant Pathology* 45: 753-760.
- MARI, M.; LEONI O.; LORI, R.; CEMBALI, T. 2002. Antifungal vapour-phase activity of allyl-isothiocyanate against *Penicillium expansum* on pears. *Plant Pathology* 51:231-236.
- MARIE, L. M.; FAST, S. H.; EDELENBOS, M. 2012. Freshness and sensory quality of packaged wild rocket. *Postharvest Biology and Technology* 73: 99-106.
- MASAHIRO, K.; ANDRIANTSOA, R.; YOKO, O.; MOTOAKI, T.; HITOSHI, H.; RYO F. 2006. Induction of soil suppressiveness against *Rhizoctonia solani* by incorporation of dried plant residues into soil. *Phytopathology* 96:1372-1379.
- MARTÍNEZ-SÁNCHEZ, A.; ALLENDE, A.; BENNETT, R. N.; FERRERES, F.; GIL, M. I. 2006. Microbial, nutritional and sensory quality of rocket leaves as affected by different sanitizers. *Postharvest Biology and Technology* 42:86-97.
- MONFORT, W. S.; CSINOS, A.; DESAEGER, J.; SEEHOLD, K.; WEBSTER, T.; DÍAZ-PÉREZ, J.C. 2007. Evaluating *Brassica* species as an alternative control measure for root-knot nematode (*M. incognita*) in Georgia vegetable plasticulture. *Crop Protection* 26:1359-1368.

- NICOLA, S. FONTANA, E.; TIBALDI, G.; ZHAN, L. 2010. Quantitative and physiological response of minimally processed rocket (*Eruca sativa* Mill.) to package filling amount and shelf-life temperature. *Acta Horticulturae* 877:611-618.
- PAVÓN, M. M. A.; GONZÁLEZ, A. I.; MARTÍN, D. S. R.; GARCÍA, L. T. 2012. Importancia del género *Alternaria* como productor de micotoxinas y agente causal de enfermedades humanas. *Nutrición Hospitalaria* 27:(6)1772-1781.
- RENNIE, T. J.; VIGNEAULT, C.; DEELL, J. R. AND VIJAYA, R. G. S. 2003. Cooling and storage, pp. 505-538. *In: Postharvest Technology: Cereals, Fruits, Vegetables, Tea, and Spices.* CHAKRAVERTY, A., MUJUMDA, R. S. A., RAGHAVAN, S. G. V. AND RAMASWAMY, H. S. (eds.). Marcel Dekker, Inc. New York, USA.
- RODRÍGUEZ-SAUCEDA, E. N. 2011. Uso de agentes antimicrobianos naturales en la conservación de frutas y hortalizas. *Ra Ximhai* 7(1):153-170.
- HERRERO, A. M.; ROMERO, DE AVILA, M. D 2006. Innovaciones en el procesado de alimentos: Tecnologías no térmicas. *Rev. Med. Univ. Navarra* 50:71-74.
- ROTEM, Y. 1994. The Genus *Alternaria*: Biology, Epidemiology and Pathogenicity. APS Press, American Phytopathological Society. 326 p.
- SISTI, M.; AMAGLIANI, G.; BRANDI, B. 2006. Antifungal activity of *Brassica oleracea* var. botrytis fresh aqueous juice. *Fitoterapia* 74:453-458.

- SMOLINSKA, U.; MORRA, M.; KNUDSEN, G.; JAMES, R. L. 2003. Isothiocyanates produced by *Brassicaceae* species as inhibitors of *Fusarium oxysporum*. *Plant disease* 87(4):407-412.
- TIZNADO-HERNANDEZ, M.; TRONCOSO-ROJAS, R. 2006. Control of fungal diseases with isothiocyanates. *Stewart Postharvest Review* 1(4):1-14.
- TRONCOSO-ROJAS, R.; SÁNCHEZ-ESTRADA, A.; RUELAS, C.; GARCÍA, H. S. 2005. Effect of benzyl isothiocyanate on tomato fruit infection development by *Alternaria alternata*. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 85:1427-1434.
- TRONCOSO, R.; ESPINOZA, C.; SÁNCHEZ-ESTRADA, A.; TIZNADO, M.; GARCÍA H. 2005. Analysis of the isothiocyanates present in cabbage leaves extract and their potential application to control *Alternaria* rot in bell peppers. *Food Research International* 38:701-708.
- WITHAM, H. F.; BLAYDES, D. F.; DEVLIN, R. M. 1971. *Experiments in Plant Physiology*. Van Nostrand Reinhold C. New York, USA. 245 p.
- ZUKALOVÁ, H.; VASÁK, J. 2002. The role and effects of glucosinolates of *Brassica* species-a review. *Rostlinná Výroba* 4

## **CAPITULO IV**

### **4. EFECTO DEL JUGO DE BRÓCOLI EN LA INHIBICIÓN DE *Alternaria alternata* EN ARÚGULA MÍNIMAMENTE PROCESADA. II FISIOLOGÍA POSTCOSECHA**

#### 4.1 RESUMEN

El brócoli es una especie de la familia de las *Brassicas* las cuales poseen propiedades antifúngicas contra varios microorganismos de importancia económica. Los glucosinolatos (GLs) han sido conocidos por ser compuestos antifúngicos *in vitro* en contra de diferentes hongos mediante hidrólisis de la enzima mirosinasa. En este estudio se probó el efecto del jugo de brócoli (GLs) en vivo en la inhibición de *Alternaria* y conservación de la calidad de Arúgula. Se evaluó la fisiología postcosecha de Arúgula almacenadas a 0, 4 °C y temperatura ambiente por 15 días, después de la inoculación con esporas de *Alternaria* ( $1 \times 10^6$ ). Los tratamientos fueron: jugo de 2.98 µg/ml + inóculo, 1.49 µg/ml + inóculo, con solución de esporas de *Alternaria* y el testigo. Cada tercer día se evaluó la incidencia y severidad del daño por hongo. Las variables medidas fueron sólidos solubles, acidez titulable, vitamina C, capacidad antioxidante, fenoles, acetaldehído y etanol. Los resultados obtenidos mostraron que la concentración de 2.98 µg/ml con y la temperatura de 0 °C fueron las que conservaron los parámetros de calidad en excelentes condiciones hasta el almacenamiento. Por lo que se concluye que el jugo de brócoli (GLs) puede ser usado en postcosecha para el control de *Alternaria alternata*.

**Palabras claves adicionales:** *Eruca sativa*, glucosinolatos, capacidad antioxidante, fenoles, vitamina C.

#### 4.2 ABSTRACT

Broccoli is a species of the *Brassica* family which possess antifungal properties against several economically important microorganisms. Glucosinolates (GLs) have been known to be *in vitro* antifungal compounds against various fungi by hydrolysis of the enzyme myrosinase. In this study, we evaluated under *in vivo* conditions in the effect of broccoli juice (GLs) inhibition of spore germination of *Alternaria* and therefore in the quality of Arugula. Postharvest physiology of arugula plants stored at 0, 4 °C and room temperature for 15 days, was evaluated. Treatments were as follow: 2.98 mg/ml + inoculum, 1.49 mg/ml + inoculum with spore solution and control. Incidence and severity of damage was measured every third day. Measured traits were: soluble solids, titrable acidity, vitamin C, antioxidant, phenols, acetaldehyde and ethanol concentration. The obtained results showed that the concentration of 2.98 mg/ml with and storage temperature of 0 °C were kept parameters excellent condition until the end of the storage. Therefore, broccoli juice (GLs) can be used to control postharvest infestation *Alternaria alternata*.

**Additional Keywords:** *Eruca sativa*, glucosinolates, antioxidant capacity, phenolic, vitamin C.

### 4.3 INTRODUCCION

La calidad y seguridad microbiológica de los productos vegetales frescos cortados es un aspecto esencial en su procesamiento y distribución. Su contaminación puede ocurrir en cualquier punto entre el cultivo y el consumo de los mismos. Para lograr productos de alta calidad que cumplan con estos requisitos es necesaria la puesta en práctica de métodos de conservación con bajo impacto sobre el alimento y a menudo una combinación inteligente de ellos (González-Aguilar, 2005). Hoy en día los consumidores demandan productos vegetales como la Arúgula, (*Eruca sativa* Mill.), perteneciente a la familia *Brassicaceae*, originaria de la región mediterránea, y que se distribuye en todo el mundo. Sin embargo esta hierba es susceptible al deterioro, así como al daño causado por *Alternaría*, hongo patógeno causante de la pérdida de calidad del producto, acortándose su vida postcosecha por lo que se ha considerado el uso de la refrigeración durante el almacenamiento (Kader, 2003), siendo eficiente en la disminución de las alteraciones mecánicas, microbiológicas y biológicas, por lo que se ha convertido en un método ampliamente utilizado durante el manejo postcosecha (Tonoiven, 2004).

Los glucosinolatos (GLs) son una serie de compuestos del metabolismo secundario de las plantas principalmente del orden de los *Capparales*, familia *Brassicales*. Los GLs intactos tienen actividad biológica limitada, pero aumentan su actividad cuando son hidrolizados a isotiocianatos (ITCs). El brócoli es la principal fuente natural de los mismos, los cuales constituye más del 80 % de los glucosinolatos totales presentes en este vegetal (Campas-Baypoli *et al.*,

2009). Se ha comprobado que los isotiocianatos tienen la propiedad de controlar el crecimiento de microorganismos patógenos tales como *Fusarium* spp., *Alternaria* spp., *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp y *Rhizopus* spp., agentes causantes de enfermedades en los alimentos y/o descomposición de los mismos (Viuda-Martos *et al.*, 2007). Báez-Flores *et al.*, (2008) comentan que el mecanismo por el cual los ITCs inhiben el crecimiento de hongos y microorganismos aún no se conoce bien, sin embargo algunas hipótesis proponen que estos compuestos son la causa de la inactivación de las enzimas intracelulares por medio de la degradación oxidativa de los puentes disulfuro, de la inhibición de enzimas metabólicas por la acción del radical tiocianato y su acción desacopladora de la fosforilación oxidativa. Al parecer, la alta reactividad de los ITCs se debe principalmente a la fuerte naturaleza electrofílica del grupo funcional isotiocianato.

Es por ello, que el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la aplicación de refrigeración y el uso de jugo de brócoli tanto *in vitro* como en vivo en la inhibición de la germinación de esporas de *Alternaria* así como en la conservación y vida de anaquel de Arúgula mediante algunas variables químicas (acidez titulable, sólidos solubles, vitamina C, fenoles totales, capacidad antioxidante), fisiológicas (etanol y acetaldehído y % de pérdida de peso) y una escala hedónica.

## 4.4 MATERIALES Y MÉTODOS

### **Obtención del jugo crudo de brócoli**

Se empleó brócoli proveniente del mercado de abastos de Texcoco, Edo. de México, el cual fue trasladado al Laboratorio de Fisiología de Frutales de la UACH. Los floretes y tallos de brócoli se desinfectaron con hipoclorito de sodio y se molieron en un extractor Moulinex. De acuerdo a la metodología establecida por Brandi *et al.* (2006), el jugo obtenido se dejó reposar por espacio de una hora, con el fin de llevar a cabo el proceso de hidrolisis mediante la enzima mirosina. La muestra se pasó a una centrifuga a 7080 g 10 min El sobrenadante se almacenó a -20 °C hasta su uso.

### **Método para determinar glucosinolatos en brócoli mediante espectrofotometría**

Se tomaron aproximadamente 0.5 mg de extracto de brócoli liofilizado (Jezek *et al.*, 1999) al cual se le adicionaron 7.5 ml de amortiguador acetato 0.2 M a pH 4.2 y 1.5 ml de acetato de plomo y bario 0.5 M. La mezcla se agitó vigorosamente en vortex. Se adicionaron 0.4 g de polivinilpolipirrolidona (PVPP) y se incubó a temperatura ambiente, con agitación, por 15 min Después se agregaron 1.5 ml de sulfato de sodio 2 M y se centrifugó a 11336 g por 5 min a temperatura ambiente. Se tomaron 0.9 ml de extracto tratado con PVPP se mezclaron con 0.9 ml de hidróxido de sodio 2M y se incubaron por 30 min A la mezcla se le adicionó 0.138 ml de ácido clorhídrico concentrado y se centrifugó a 4000 g por 10 min Para la determinación espectrofotométrica se tomaron 0.5

ml de sobrenadante y se mezclaron con 0.5  $\mu$ l de solución de ferricianuro 2mM en amortiguador fosfato 0.2 M pH a 7.0. Finalmente se midió la absorbancia de la solución a 420 nm antes de 15 s usando amortiguador fosfato 0.2 M a pH 7.0 como blanco. Para la curva de calibración se utilizó el patrón sinigrina  $5,60 \times 10^{-3}$  M con diferentes diluciones que iban de 0 a 90  $\mu$ l. Con los datos del espectrofotómetro se ajustó un modelo de regresión, para determinar la concentración de los GLs obtenidos del jugo de brócoli. El modelo utilizado fue:  $Y = -0.0041x + 0.9313$  ( $r^2$  de 0.97,  $P = 0.002$ ) y la concentración de glucosinolatos obtenida fue de 0.0029 mg/ml.

### **Efecto del jugo de brócoli (GLs) en *Alternaria in vitro***

El aislamiento de *Alternaria* se obtuvo de hojas de Arúgula proporcionada por la empresa Glezte ubicada en Axochiapan estado de Morelos, con síntomas de la mancha de la hoja. Los aislamientos se sembraron en medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA). Se estudiaron las características de los hongos de acuerdo a las claves morfológicas de Barnett y Hunter (1998) y Rotem (1994) y la identificación definitiva se realizó mediante secuenciación del ADN fungal. Se probaron diferentes concentraciones para inhibir la germinación de esporas: 0.15, 0.11, 0.07, 0.04, 0.01, 0  $\mu$ g/ $\mu$ l. Para ello el jugo fue adicionado al medio de cultivo PDA, y luego se adicionaron 20  $\mu$ l de la solución de esporas de *Alternaria*. Con la ayuda de un microscopio se cuantificó la germinación de las esporas de *Alternaria* a las 2, 4 y 6 horas. Para la evaluación se consideraron 100 esporas al azar, para cada concentración se realizaron tres repeticiones. El porcentaje de inhibición se determinó mediante la fórmula:  $IN (\%) = a - b/a * 100$

Donde: a= Total de esporas germinadas en el testigo

b= Total de esporas germinadas en el tratamiento

### **Efecto del jugo de brócoli (GLs) en *Alternaria* bajo condiciones en vivo**

La Arúgula fue proporcionada por la empresa Glezte ubicada en Axochiapan, Morelos. ésta se lavó y desinfectó con hipoclorito de sodio a 100 ppm, posteriormente se dividió el material en 4 grupos para los tratamientos correspondientes: grupo uno, fue sumergido en una concentración de 2.98 µg/ml de jugo de brócoli más la inoculación de las esporas de *Alternaria* ( $1 \times 10^6$ ); grupo dos, fue sumergido en una concentración de 1.49 µg/ml de jugo de brócoli más la inoculación de esporas de *Alternaria*; grupo tres, inoculado sólo con la solución de esporas de *Alternaria*; grupo cuatro, testigo; posteriormente se secaron las hojas y luego se envasaron 100 g en charolas rígidas y se almacenaron en refrigeración a 0, 4 °C y temperatura ambiente (22 °C), durante 15 días. La severidad del daño por hongo se evaluó cada tercer día y se reportó como porcentaje de infección por planta, utilizando una escala diagramatizada elaborada con el programa 2log. Con esta calificación nominal se obtuvo el índice poblacional de severidad al aplicar la siguiente fórmula:

$$IS = \frac{\sum_{i=1}^K X_{ki}(N_{ki})}{N_j}$$

Donde: IS = índice de severidad

$X_{ki}$  = nivel del daño en el momento i

$N_{ki}$  = número de plantas con el nivel del daño en el momento i

$N_j$  = número total de plantas evaluadas

La incidencia del daño en las hojas se determinó mediante la fórmula:

$I \% = n_i/N_j * 100$  Donde: I (%) = incidencia de la enfermedad en porcentaje

$n_i$  = número de plantas enfermas en el momento i

$N_j$  = número total de plantas evaluadas

### **Efecto de GLs en la fisiología postcosecha de Arúgula en vivo**

El efecto del jugo de brócoli en la fisiología y vida de anaquel de las hojas de Arúgula, se determinó mediante la evaluación de las siguientes variables:

#### **Acidez titulable (AOAC, 1980)**

Se homogeneizaron 10 g de pulpa con 50 ml de agua destilada. De la mezcla obtenida se tomó una alícuota de 10 ml que se tituló con hidróxido de sodio 0.1 N utilizando timolftaleína como indicador hasta alcanzar un pH de 8.2. La acidez se expresó como porcentaje de ácido cítrico con la fórmula:

$\% \text{ ácido cítrico} = \text{ml NaOH} \times N \times \text{Meq. ácido} \times V \times 10 / \text{Peso muestra} \times \text{alícuota}$

N = Normalidad del NaOH

V = volumen total (ml después de moler en la licuadora)

Meq. ácido = Miliequivalentes del ácido presente en mayor proporción (0.064 para el ácido cítrico).

### **% Sólidos solubles totales (°Bx)**

Se determinaron en el jugo de la hoja, mediante un refractómetro digital marca ATAGO, modelo PAL-1 con escala de 0 a 53 % y se expresaron como °Bx.

### **Vitamina C (ácido ascórbico) por el método de Tillman (AOAC, 1980)**

Se homogeneizaron 5 ml de jugo con 50 ml de una solución de ácido oxálico (0.5 %), de la cual se tomó una alícuota de 5 ml y se tituló con solución de Tillman (0.01 %) hasta que permaneció una coloración rosa visible por 1 minuto. La concentración se expresó en mg/g utilizando como estándar el ácido ascórbico.

### **Fenoles totales**

Se empleó el método espectrofotométrico desarrollado por Folin y Ciocalteu descrito por Waterman y Mole (1994). Se pesaron 0.5 g de tejido fresco y se agregaron 5 ml de metanol al 100 %, se homogenizaron por 5 min a 13147g. Se tomaron 60 µl del sobrenadante, se tomaron 16 ml de agua desionizada y 0.5 ml de folin, se agitaron y antes de 8 minutos se agregó  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 20 % esta mezcla se agitó vigorosamente y luego se dejó reposar por 2 h, lejos de la luz. Transcurrido el periodo de incubación, la mezcla de reacción se analizó en un espectrofotómetro a  $\lambda$  de 760 nm para determinar su absorbancia. Se utilizó como blanco agua desionizada. La cuantificación se realizó mediante una curva patrón de ácido tánico, los datos se expresaron en mg/g de PF.

## **Determinación de la capacidad antioxidante por el método ABTS**

La determinación de la capacidad antioxidante, se realizó de acuerdo con el método ABTS [2,2'azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-ácido sulfónico] propuesto por Rice-Evans *et al.* (1997) modificado por Ozgen *et al.* (2006), para lo cual el radical ABTS se formó tras la reacción de ABTS (7 mM) con persulfato potásico (2.45mM, concentración final) incubados a temperatura ambiente y en oscuridad durante 16 h. Una vez formado el radical ABTS este se diluyó con PBS (solución amortiguador de fosfato) (pH 7.4) hasta obtener un valor de absorbancia de  $0.7 \pm 0.1$  a 734 nm (longitud de máxima absorción). Para el ensayo se mezclaron 3 ml de la solución ABTS y 20  $\mu$ l de extracto de la muestra, dejándose reposar por 2 h y posteriormente se realizó la lectura de absorbancia a 734 nm. El antioxidante de referencia fue el ácido ascórbico (de 0 a 2.5 mM).

## **Contenido de acetaldehído y etanol**

Se determinaron mediante el método propuesto por Davis y Chase (1969). Se tomaron 2g de tejido y se colocaron en viales de vidrio de 25 ml, inmediatamente se sellaron y se mantuvieron en congelación a  $-20 \pm 2$  °C hasta su evaluación. Cada vial se incubó en baño María a 60 °C durante 1 h. Posteriormente se homogeneizó por 1 minuto y se tomó 1 ml del espacio vacío y se inyectó en un cromatógrafo de gases, Varian Star 3400, con detector de ionización de flama (FID) y columna capilar *Chrompak* de 27.5 m de largo, 0.32 mm de diámetro interno y 0.45 mm de diámetro externo y con capa porosa de

sílica como fase estacionaria. Las temperaturas del cromatógrafo fueron de 160, 170, 170 y 170 °C en columna, inyector, auxiliar y detector, respectivamente.

### **Pérdida de peso (%)**

Se pesaron las plantas al inicio del tratamiento y después cada tercer día. La medición se hizo en los 15g de hojas, los cuales se pesaron en una balanza granataria electrónica Ohaus Portable Advance, de modelo CT 1200 (EUA), con una precisión de 0.1g; la pérdida de peso se obtuvo de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$PP(\%) = \frac{P_i - P_f}{P_i} \times 100$$

Donde: PP (%): pérdida de peso en porcentaje.

P<sub>i</sub>: peso inicial de la unidad experimental en g.

P<sub>f</sub>: peso final de la unidad experimental en g, al término del tratamiento

### **Escala Hedónica**

Se utilizó la escala hedónica propuesta por Cantwell *et al.* (1998) y Torales *et al.* (2010), con la que se evaluó la calidad visual, color, amarillamiento, desarrollo de malos olores y presencia de pudriciones. Para poder medir estas características se asignaron escalas de calificaciones de la siguiente manera: calidad visual (9=excelente, 7=Bueno, 6=Límite de comerciabilidad, 5=regular,

3=Malo, 1=Muy malo), amarillamiento (9=verde oscuro, 7=verde claro, 5=verde amarillo (no más del 20 %), 3= amarillo más algo de verde (no más del 50 %) 1=amarillo más del 75%), desarrollo de malos olores (9=sin olor, 7=incipiente, 5=regular, 3=intenso 1=muy intenso), y pudriciones (1=ninguno, 2=alguno, 3=poco, 4=mucho, 5=severo).

### **Análisis estadístico**

Los resultados de las variables químicas y fisiológicas se sometieron a un análisis de varianza y pruebas de comparación de medias (Tukey,  $p=0.05$ ) mientras que los datos obtenidos mediante la escala hedónica se llevó a cabo un análisis no paramétrico mediante la prueba de Kruskal-Wallis. Se emplearon los paquetes de análisis estadístico Infostat ® así como SAS ® (Statistical Analysis System) ver. 9.0 (SAS, 2002).

## **4.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **Efecto del jugo de brócoli (GLs) en *Alternaria alternata* in vitro**

Se identificó una colonia fungal de color verde oscuro en hojas de Arúgula. Al observarla al microscopio ésta presentó, conidióforos simples de color café claro tabicados, y conidios con septa transversal y longitudinal, características que corresponden a la especie de *Alternaria alternata* de acuerdo a las claves y descripciones de Barnett y Hunter (1998) y Rotem (1994).

Esta identificación morfológica fue confirmada por la secuenciación del genoma fungal alineada en el banco de genes (NCBI), de acuerdo con lo reportado por Andersen *et al.* (2001) y Fraire *et al.* (2010).

En la figura 1 se muestra el efecto a las 6 horas de diferentes concentraciones de jugo de brócoli (GLs) en la inhibición de la germinación de Arúgulas almacenadas esporas a 26 °C. En ella se puede observar que para las concentraciones 0.15, 0.11 y 0.07 µg/µl, el porcentaje de germinación fue del 0 %, mientras que las concentraciones de 0.01 y 0.04 µg/µl presentan menor control, lo cual sugiere que a mayor concentración de GLs se presentó un menor crecimiento fungal. Todos los tratamientos con jugo de brócoli GLs disminuyeron el crecimiento del hongo respecto al testigo (sin tratamiento). Varios autores han demostrado previamente que los GLs tienen efecto en contra de algunos patógenos. Por ejemplo Sisti *et al.* (2006), quienes probaron el efecto del jugo acuoso crudo de *Brassica* en la inhibición del crecimiento del hongo *Candidas albicans* encontraron que después de 4 horas de incubación a una concentración de 0.054 µg/ml obtuvieron 95 % de inhibición, resultados similares a los encontrados en este estudio. Mari *et al.* (1996) reportan que los isotiocinatos derivados de los glucosinolatos usados a una concentración de 3.6 mg/ml controlaron completamente al hongo *Penicillium expansum* en frutos de pera.

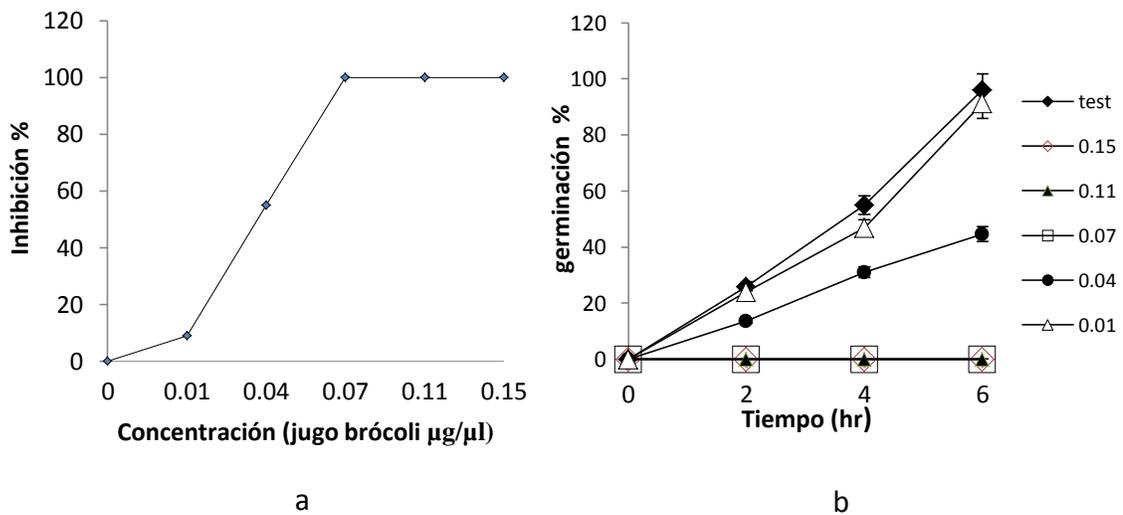


Figura 1 a) efecto de las concentraciones de jugo de brócoli en la inhibición de la germinación de esporas de *Alternaria alternata* en hojas en vivo de Arúgula (*Eruca sativa*). b) efecto de las concentraciones de jugo de brócoli a través del tiempo en el porcentaje de germinación de esporas de *Alternaria alternata* en Arúgula.

Así mismo sustancias volátiles obtenidas de plantas de *Brassicca rapa* y a una concentración de 20 mg/g inhibieron el crecimiento micelial de *Rhizoctonia solani* (Masahiro *et al.*, 2006). Los resultados obtenidos en el presente estudio corroboran el efecto inhibitorio de los GLs en la germinación de esporas de *Alternaria alternata* en concordancia con lo obtenido en previos trabajos.

Por lo que se puede concluir que el jugo de brócoli (GLs) posee potencial antifúngico y podría ser usado como tratamiento en postcosecha, con el fin de disminuir los daños causados por *Alternaria alternata*.

### Efecto del jugo de broccoli (GLs) en *Alternaria alternata* en vivo

En el Cuadro 1 se presentó el porcentaje de severidad de daño (% del tejido dañado en relación al total del tejido evaluado) causado por *A. Alternata* en

hojas de Arúgula. Se puede observar que el tratamiento sin GLs + inóculo presentó la mayor severidad del daño durante todo el periodo de evaluación, mientras que la menor severidad se obtuvo cuando se utilizó la concentración de 2.98 µg/ml + inóculo, es evidente el efecto del jugo de brócoli (GLs) en la disminución del daño causado por *A. Alternata*. Los resultados obtenidos en este trabajo fueron superiores a los reportados por Troncoso-Rojas *et al.* (2005) quienes tuvieron una reducción del 80 % en el daño causado por *Alternaria alternata* en tomates, al utilizar isotiocinatos (ITCs) (derivados de los glucosinolatos), a una concentración de 0.56 mg/ml.

Así mismo, se encontró que no existieron diferencias significativas entre tratamientos hasta el día cinco de evaluación, y fue a partir del día siete que la concentración de 2.98 µg/ml de GLs + inóculo presentó la menor severidad de daño con excepción del día nueve. Por lo que dicha concentración resultó ser más efectiva para el control de *A. Alternata*, similar resultado obtenido por Tiznado-Hernández y Troncoso-Rojas (2006) quienes demostraron que el isotiocinato (ITC) 3-metilsufnil-3-butenil a una concentración de 3.6 mg/ml, inhibió totalmente el crecimiento de *Monilinia laxa* en frutos de pera.

En otro experimento, se demostró que el (ITC) de bencil a las concentraciones de 0.28 y 0.56 mg/ml inhibió en 100 % el crecimiento micelial de *Alternaria alternata* en frutos de pimiento morrón (Troncoso *et al.*, 2005).

**CUADRO 1.** Efecto de las diferentes concentraciones de GLs y temperaturas de almacenamiento en la severidad del daño de *A. alternata* en hojas de Arúgula.

Factor /Nivel µg/ml GLs	% de Severidad de daño de <i>Alternaria</i>							
	Día 0	Día 3	Día 5	Día 7	Día 9	Día11	Día13	Día15
<b>Concentraciones</b>								
Sin GLs, sin inóculo	0*	5.5 b <sup>†</sup>	9.26 a	13.8 b	4.16 b	9.03 b	13.1 b	17.3 b
Sin GLs + inóculo	0	6.90 a	12.9 b	22.6 a	13.1 a	17.3 a	19.8 a	37.2 a
1.49 GLs + inóculo	0	1.80 c	5.09 c	6.90 c	0.69 c	2.08 c	3.40 c	3.40 c
2.98 GLs + inóculo	0	1.30 c	3.70 c	5.00 d	0.00 c	0.00 d	0.00 d	0.00 d
DMSH		0.90	2.02	1.80	2.81	2.78	2.50	2.50
<b>Temperatura °C</b>								
22	0	11.8 a	22.5 a	32.2 a	- <sup>‡</sup>	-	-	-
4	0	0.00 b	0.69 b	3.10 b	5.90 a	9.30 a	11.6 a	17.7 a
0	0	0.00 b	0.00 b	1.04 c	3.10 b	4.80 b	6.59 b	11.6 b
DMSH		0.73	1.58	1.41	1.40	1.45	1.31	2.60

<sup>†</sup>Medias con la misma letra dentro de columnas no son diferentes (Tukey con  $P \leq 0.05$ ). \*No significativo; DMSH: Diferencia mínima significativa honesta. GLs: Glucosinolatos; <sup>‡</sup>Datos perdidos por senescencia.

En cuanto al tratamiento manejado a temperatura ambiente (22 °C) se observó mayor daño causado por *A. Alternata* durante el periodo de almacenamiento. Las temperaturas de almacenamiento de 0 y 4 °C fueron estadísticamente iguales los días tres y cinco de almacenamiento, sin embargo a partir del día siete en adelante existieron diferencias significativas entre ambos, por lo que se puede observar que la temperatura de 0 °C proporcionó mayor control de la presencia de *A. Alternata* que la de 4 °C. En cuanto a la conservación de la calidad, Koukounaras *et al.* (2007) mencionan que las hojas de Arúgula se pueden refrigerar con buenos resultados a 0 °C, con una vida de almacenamiento máximo de 16 días, un comportamiento similar a los resultados de éste trabajo. Además se reporta que el almacenamiento a 5 °C produjo un deterioro ligero de la calidad y la vida útil se redujo 3 días, resultados similares a los obtenidos en este estudio, por lo que se puede concluir que el almacenamiento a 0 °C incrementa la vida de anaquel de Arúgula.

Los resultados del ensayo en vivo, al igual que los obtenidos del ensayo in vitro demostraron el efecto de los GLs sobre la inhibición de la germinación de esporas de *A. alternata* aislada de hojas de Arúgula. El modo de acción de los GLs no está dilucidado aún pero se postula que puede causar rompimiento a la pared y membrana celular e interferir con el buen funcionamiento de enzimas metabólicas, síntesis de proteínas y el sistema génico del patógeno (Rodríguez-Sauceda, 2011).

Se determinó que la incidencia de *A. Alternata* (Cuadro 2) mediante la combinación del porcentaje de plantas enfermas con relación al total de plantas evaluadas. La concentración de 2.98 µg/ml presentó 0 % de incidencia mientras que el tratamiento sin GLs + inóculo presentó la mayor incidencia (87.5 %) al final de la vida útil. Monfor *et al.* (2007) comprobaron que especies de Brassicas cultivadas en Georgia, EUA, como el nabo, brócoli y rábano, contienen propiedades que actúan contra hongos del suelo disminuyendo en 80 % la incidencia de estos microorganismos.

En el Cuadro 2 se observó que a partir del día tres, hubo diferencias significativas entre tratamientos, pero del día nueve en adelante la concentración de 2.98 µg/ml de GLs, fue la que produjo 0 % de incidencia.

En relación al efecto de la temperatura de almacenamiento sobre la incidencia de *Alternaria*, se observó que ésta fue mayor a temperatura ambiente (22 °C), mientras que para el tratamiento de 0 °C no se presentaron diferencias

significativas los días tres, cinco y siete, pero a partir del día nueve y hasta el día 15 si hubo diferencias estadísticas entre los tratamientos lo cual implica que la mejor temperatura para la conservación de las hojas de Arúgula fue de 0 °C.

**CUADRO 2.** Efecto de diferentes concentraciones de GLs y temperaturas de almacenamiento en la incidencia de *A. alternata* en hojas de Arúgula.

Factor /Nivel µg/ml GLs	% Incidencia							
	Día 0	Día 3	Día 5	Día 7	Día 9	Día11	Día13	Día15
<b>Concentraciones</b>								
Sin GLs, sin inóculo	0*	22.2 a <sup>†</sup>	38.8 a	41.6 a	29.1 b	37.5 b	50.0 b	58.3 b
Sin GLs + inóculo	0	27.7 a	30.0 ab	52.7 a	50.0 a	62.5 a	75.0 a	87.5 a
1.49 GLs + inóculo	0	11.1 b	19.4 b	25.0 b	4.16 c	8.30 c	20.8 c	20.8 c
2.98 GLs + inóculo	0	8.30 b	16.6 b	22.2 b	0.00 c	0.00 c	0.00 d	0.00 d
DMSH		9.38	9.38	15.3	18.8	9.87	18.8	18.8
<b>Temperatura °C</b>								
22	0	52.0 a	75.0 a	85.4 a	- <sup>†</sup>	-	-	-
4	0	0.00 b	4.16 b	14.5 b	29.1 a	33.3 a	41.6 a	50.0 a
0	0	0.00 b	0.00 b	6.20 c	12.5 b	20.8 b	31.2 b	35.4 b
DMSH		7.30	7.35	12.0	9.80	9.87	9.80	7.60

<sup>†</sup>Medias con la misma letra dentro de columnas no son diferentes (Tukey con P≤0.05). \* No significativo; DMSH: Diferencia mínima significativa honesta. GLs: Glucosinolatos; <sup>†</sup>Datos perdidos por senescencia.

### Acidez titulable

El efecto de los tratamientos en acidez titulable, fue que la concentración de 2.98 µg/ml GLs + inóculo indujo un ligero decremento de 0.24 a 0.20 % en las hojas, mientras que el tratamiento sin GLs + inóculo generó un aumento de 0.24 a 0.27 % (Cuadro 3). Torales *et al.* (2010) realizaron un trabajo con hojas de Arúgula al almacenarlas a 6 °C y obtuvieron una ligera disminución con valores de 0.05 a 0.03 % de ácido cítrico.

En el Cuadro 3, se observa que a partir del día tres, todas las concentraciones probadas fueron estadísticamente diferentes al tratamiento sin GLs sin inóculo (testigo) y el sin GLs + inóculo tuvieron una tendencia a incrementar la acidez

titulable, mientras que en los tratamientos con 2.98 GLs+ inóculo y 1.49 GLs + inóculo se presentó una ligera disminución.

**CUADRO 3.** Efecto de las diferentes concentraciones de GLs y temperaturas de almacenamiento en la acidez titulable de hojas de Arúgula.

Factor /Nivel µg/ml GLs	% Acidez titulable							
	Día 0	Día 3	Día5	Día 7	Día 9	Día11	Día13	Día15
<b>Concentraciones</b>								
Sin GLs, sin inóculo	0.24*	0.25b <sup>†</sup>	0.26 b	0.25 b	0.26 b	0.25 b	0.26 b	0.24 b
Sin GLs + inóculo	0.24	0.27 a	0.27 a	0.28a	0.29 a	0.27 a	0.28 a	0.27 a
1.49 GLs + inóculo	0.24	0.22 d	0.23 d	0.21d	0.21 d	0.19 d	0.20 d	0.19 d
2.98 GLs+ inóculo	0.24	0.23 c	0.24 c	0.22c	0.22 c	0.21 c	0.22 c	0.20 c
DMSH		0.002	0.003	0.004	0.00 2	0.003	0.001	0.001
<b>Temperatura °C</b>								
22	0.24	0.25 a	0.24 c	0.23 b	- <sup>†</sup>	-	-	-
4	0.24	0.25 b	0.25 a	0.25 a	0.24 b	0.24 b	0.23b	0.22 a
0	0.24	0.24 c	0.24 b	0.25 a	0.25 a	0.24 a	0.24a	0.23 b
DMSH		0.002	0.001	0.003	0.001	0.009	0.001	0.006

<sup>†</sup>Medias con la misma letra dentro de columnas no son diferentes (Tukey con P≤0.05). \* No significativo; DMSH: Diferencia mínima significativa honesta. GLs: Glucosinolatos; <sup>†</sup>Datos perdidos por senescencia.

Las temperaturas de almacenamiento también generaron cambios estadísticamente diferentes a partir del día tres hasta el día 15, a excepción del día nueve, en el cual se presentó muy poca disminución de la acidez. Estos resultados confirman que el uso de bajas temperaturas en la conservación de productos vegetales mantiene las características organolépticas con el menor número de cambios perceptibles en su calidad (Núñez-López *et al.*, 2012).

### % Sólidos solubles

En el cuadro 4 se presentó el comportamiento de los sólidos solubles y se observó que la menor disminución de esto se obtuvo con la concentración de

2.98 µg/ml GLs + inóculo la cual fue estadísticamente mejor que el tratamiento sin GLs + inóculo, el cual presentó la mayor disminución. Able *et al.* (2005) mencionan que los niveles de azúcares solubles totales en hojas de col china (*Brassica rapa pekinensis*) disminuyeron al ser almacenadas en paquetes dejados en las tiendas a 20 °C. La degradación de los azúcares ocurrió entre los días 2 y 3 antes del final de la vida de almacenamiento, coincidiendo con la aparición de amarillamiento en las hojas. En este estudio hubo diferencias significativas por efecto de las concentraciones probadas, a partir del día tres hasta el día 15 de evaluación. En el tratamiento de 2.98 µg/ml, los sólidos solubles presentaron valores de 7.0 a 5.90 °Bx, seguido por el tratamiento 1.49 µg/ml GLs + inóculo con 5.50 °Bx. Estos resultados sugieren que el metabolismo de azúcares totales no fue afectado. Con respecto al efecto de las temperaturas de almacenamiento los tratamientos fueron estadísticamente diferentes entre sí. A 0 °C presentaron valores de 6.9 hasta 5.3 °Bx a los 15 días de almacenamiento, confirmando ser la mejor. Por su parte Koukounaras *et al.* (2007), obtuvieron valores de 7.6 a 6.5 % en hojas de Arúgula, almacenadas a 0 °C por 16 días.

Sin embargo, en un trabajo por Koukounaras *et al.* (2009) encontraron contenidos de sólidos solubles de 4.1 a 3.8 % en almacenamiento por 10 días a 8 °C. González-Aguilar (2005) menciona que al retrasarse algunos procesos fisiológicos que utilizan como sustratos los azúcares y ácidos orgánicos, los niveles de estos compuestos se mantienen por un periodo mayor, lo cual confiere una mayor calidad a los vegetales.

**CUADRO 4.** Efecto de las diferentes concentraciones de GLs y temperaturas de almacenamiento en sólidos solubles en hojas de Arúgula.

Factor/Nivel µg/ml GLs	Sólidos solubles (°Bx)							
	Día 0	Día 3	Día 5	Día 7	Día 9	Día11	Día13	Día15
<b>Concentraciones</b>								
Sin GLs, sin inóculo	7.2*	6.76d <sup>†</sup>	6.11 c	5.57 c	5.71 c	5.31 c	5.18 c	4.95 c
Sin GLs + inóculo	7.2	6.35 c	5.51 d	4.91 d	5.03 d	4.91 d	4.46 d	4.21 d
1.49 GLs + inóculo	7.2	6.90 b	6.53 b	5.92 b	6.06 b	5.98 b	5.80 b	5.50 b
2.98 GLs+ inóculo	7.2	7.00 a	6.81 a	6.52 a	6.56 a	6.38 a	6.26 a	5.9 a
DMSH		0.09	0.092	0.112	0.175	0.106	0.165	0.178
<b>Temperatura °C</b>								
22	7.2	6.5 c	5.8 c	5.1 c	- <sup>†</sup>	-	-	-
4	7.2	6.8 b	6.4 b	5.9 b	5.7 b	5.5 b	5.2 b	4.9 b
0	7.2	6.9 a	6.5 a	6.1 a	5.9 a	5.7 a	5.6 a	5.3 a
DMSH		0.074	0.072	0.088	0.091	0.055	0.086	0.093

<sup>†</sup>Medias con la misma letra dentro de columnas no son diferentes (Tukey con  $P \leq 0.05$ ). \* No significativo; DMSH: Diferencia mínima significativa honesta. GLs: Glucosinolatos; <sup>†</sup>Datos perdidos por senescencia.

### Capacidad antioxidante

Con relación a la capacidad antioxidante la concentración de 2.98 µg/ml + inóculo presentó una ligera disminución de 3.16 a 2.89 mg/g, mientras que el tratamiento Sin GLs + inóculo osciló entre 3.16 y 2.32 mg/g (Cuadro 5). A partir del día tres al día 15, todos los tratamientos aplicados mostraron diferencias estadísticas significativas, lo cual indica que no hubo reducción en la capacidad antioxidante. En un trabajo realizado por Venneria *et al.* (2012) mencionan que tuvieron una disminución de la capacidad antioxidante del 8 % al segundo día de almacenamiento, obteniendo valores de 12.9 mM Fe<sup>2+</sup> por kg, en hojas de Arúgula fresca.

La temperatura de almacenamiento de mantener la capacidad antioxidante a 0 °C de 3.0 mg/g a 2.7 mg/g, durante los 15 días de almacenamiento siendo

diferente a los otros tratamientos estadísticamente. Autores como Martínez-Sánchez *et al.* (2006) cuando almacenaron a 4 °C obtuvieron una reducción del 60 % en la capacidad antioxidante con valores que pasaron de 104.8 hasta 47.6 mg 100 g<sup>-1</sup> a los 14 días. Por su parte Nicola *et al.* (2010) tuvieron un decremento del 69 % al almacenar a 12 °C con un valor de 1.96 μmol Fe<sup>2+</sup> g<sup>-1</sup> al respecto señalan que la capacidad antioxidante, fue dedicada a controlar las especies de radicales formados después del corte.

**CUADRO 5.** Efecto de las diferentes concentraciones de GLs y temperaturas de almacenamiento en capacidad antioxidante, en hojas de Arúgula.

Factor /Nivel μg/ml GLs	Capacidad antioxidante mg/g							
	Día 0	Día 3	Día5	Día 7	Día 9	Día11	Día13	Día15
<b>Concentraciones</b>								
Sin GLs, sin inóculo	3.16*	2.87c <sup>†</sup>	2.76 c	2.63 c	2.63 c	2.56 c	2.58 c	2.49 c
Sin GLs + inóculo	3.16	2.81 d	2.69 d	2.55 d	2.55 d	2.49 d	2.36 d	2.32 d
1.49 GLs + inóculo	3.16	3.03 b	2.86 b	2.74 b	2.72 b	2.68 b	2.77 b	2.78 b
2.98 GLs+ inóculo	3.16	3.09 a	2.97 a	2.81 a	2.87 a	2.80 a	2.87 a	2.89 a
DMSH		0.03	0.03	0.03	0.02	0.01	0.03	0.01
<b>Temperatura °C</b>								
22	3.16	2.94 b	2.83 b	2.54 c	- <sup>†</sup>	-	-	-
4	3.16	2.91 b	2.75 c	2.71 b	2.66 b	2.58 b	2.59 b	2.53 b
0	3.16	3.00 a	2.88 a	2.79 a	2.73 a	2.69 a	2.70 a	2.70 a
DMSH		0.02	0.02	0.02	0.01	0.005	0.01	0.01

<sup>†</sup>Medias con la misma letra dentro de columnas no son diferentes (Tukey con P≤0.05). \* No significativo; DMSH: Diferencia mínima significativa honesta. GLs: Glucosinolatos; <sup>†</sup>Datos perdidos por senescencia.

### Vitamina C

Con respecto al contenido de Vitamina C (Cuadro 6) éste se mantuvo dentro de los valores de 86.3 a 48.3 mg/g, en el tratamiento 2.98 μg/ml + inóculo, mientras que en el tratamiento sin GLs + inóculo decayó hasta 19.5 mg/g. Autores como Kim e Ishi, (2007) obtuvieron contenido de vitamina C de 1.45 mg/g a los 10

días de almacenamiento a 4 °C, valores más bajos a los obtenidos en este trabajo, El contenido es importante en la conservación de alimentos, toda vez que es uno de los antioxidantes más efectivos, con efecto protector frente a los radicales libres (González-Aguilar, 2005). En el Cuadro 4 puede apreciarse que para esta variable existieron diferencias significativas entre todos los tratamientos aplicados durante todo el periodo de evaluación.

**CUADRO 6.** Efecto de las diferentes concentraciones de GLs y temperaturas de almacenamiento en el contenido de vitamina C en hojas de Arúgula.

Factor /Nivel µg/ml GLs	Vitamina C mg/g								
	Día 0	Día 3	Día 5	Día 7	Día 9	Día11	Día13	Día15	
<b>Concentraciones</b>									
Sin GLs, sin inóculo	86.3 <sup>*</sup>	67.5c <sup>†</sup>	59.2 c	51.6 c	53.0 c	47.8 c	39.8 c	34.5 c	
Sin GLs + inóculo	86.3	59.0 d	41.5 d	35.8 d	32.6 d	27.9 d	22.4 d	19.5 d	
1.49 GLs + inóculo	86.3	70.1 b	64.2 b	56.1 b	59.5 b	54.0 b	44.4 b	39.4 b	
2.98 GLs + inóculo	86.3	73.8 a	69.2 a	59.2 a	67.5 a	61.8 a	53.4 a	48.3 a	
DMSH		1.50	1.57	1.33	1.33	1.07	1.32	0.76	
<b>Temperatura °C</b>									
22	86.3	60.3 c	47.0 c	32.1 c	- <sup>†</sup>	-	-	-	
4	86.3	69.0 b	61.0 b	56.5 b	50.9 b	45.7 b	38.2 b	33.5 b	
0	86.3	73.5 a	67.6 a	63.4 a	55.3 a	50.0 a	41.6 a	37.4 a	
DMSH		1.18	1.23	1.04	0.70	0.56	0.69	0.40	

<sup>†</sup>Medias con la misma letra dentro de columnas no son diferentes (Tukey con  $P \leq 0.05$ ). <sup>\*</sup>No significativo; DMSH: Diferencia mínima significativa honesta. GLs: Glucosinolatos; <sup>†</sup>Datos perdidos por senescencia.

En relación al efecto de la temperatura se obtuvo que el tratamiento de 2.98 µg/ml + inóculo a 0 °C fue el que conservó mejor este el contenido de vitamina C con un valor al final del almacenamiento de 37.4 mg/g a diferencia del tratamiento a temperatura ambiente el cual mostró un valor de 32.1 mg/g. Por su parte Nicola *et al.* (2010) encontraron un decremento del 32.5 % en el contenido de vitamina C ( $9.3 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$ ) al almacenar a 4 °C y del 46.6 % bajo

temperaturas de 12 °C después de 10 días de almacenamiento. Por su parte Martínez-Sánchez *et al.* (2006) obtuvieron valores de 50 mg/100 g<sup>-1</sup> al almacenar a 8 °C. Kim e Ishi (2007) mencionan que la disponibilidad de vitamina C total es influenciada por numerosos factores como la intensidad de la luz, temperatura de almacenamiento y exposición a contaminantes.

## **Fenoles**

En relación al contenido de fenoles (Cuadro 7), se observan diferencias significativas entre tratamientos a partir del día 9 al 15 de almacenamiento. El mejor contenido de fenoles (0.22 mg/g) se obtuvo en la concentración de 2.98 µg/ml de GLs, mientras que el tratamiento sin GLs + inóculo mostró 0.15 mg/g.

Por su parte Nicola *et al.* (2010) reportan valores de 0.20 a 0.15 mg/g encontraron resultados similares a los obtenidos en este estudio.

El almacenamiento a 0 °C presentó mantener cantidades de ácido tánico de 0.26 a 0.19 mg/g después de 15 días de almacenamiento. Estos resultados estuvieron más altos que de los observados por Martínez-Sánchez, *et al.* (2006) quienes encontraron de valores de 109.3 g a 56.3 mg 100 g<sup>-1</sup> de ácido gálico en hojas de arúgula, almacenadas a 4 °C, por 14 días lo que representó una disminución casi del 50 %.

**CUADRO 7.** Efecto de las diferentes concentraciones de GLs y temperaturas de almacenamiento en el contenido de fenoles en hojas de Arúgula.

Factor /Nivel µg/ml GLs	Fenoles mg/g							
	Día 0	Día 3	Día 5	Día 7	Día 9	Día11	Día13	Día15
<b>Concentraciones</b>								
Sin GLs, sin inóculo	0.32 <sup>*</sup>	0.23 c <sup>†</sup>	0.21 c	0.20 c	0.20 c	0.20 c	0.19 c	0.17 c
Sin GLs + inóculo	0.32	0.23 c	0.19 d	0.18 d	0.19 d	0.18 d	0.16 d	0.15 d
1.49 GLs + inóculo	0.32	0.26 b	0.23 b	0.22 b	0.24 b	0.23 b	0.21 b	0.20 b
2.98 GLs + inóculo	0.32	0.29 a	0.26 a	0.25 a	0.26 a	0.26 a	0.24 a	0.22 a
DMSH		0.007	0.004	0.004	0.004	0.004	0.005	0.003
<b>Temperatura °C</b>								
22	0.32	0.27 a	0.22 b	0.19 c	- <sup>†</sup>	-	-	-
4	0.32	0.24 c	0.21 b	0.21 b	0.21 b	0.21 b	0.20 a	0.18 b
0	0.32	0.26 b	0.24 a	0.23 a	0.23 a	0.22 a	0.20 a	0.19 a
DMSH		0.002	0.003	0.003	0.002	0.002	0.003	0.001

<sup>†</sup>Medias con la misma letra dentro de columnas no son diferentes (Tukey con  $P \leq 0.05$ ). \* No significativo; DMSH: Diferencia mínima significativa honesta. GLs: Glucosinolatos; <sup>†</sup>Datos perdidos por senescencia.

### Acetaldehído

En relación al contenido de acetaldehído (Cuadro 8), se encontró 0.69 µmol 100 ml con la concentración de 2.98 µg/ml, y de 6.55 µmol 100 ml cuando no se aplicaron GLs pero sí inóculo en el tratamiento de GLs + inóculo. Desafortunadamente no hay estudios realizados para este compuesto en hojas de Arúgula, para contrastarlos con lo obtenido en este trabajo. Sin embargo Meier *et al.* (2004) en naranjas y mandarinas, obtuvieron valores de 4.2 ppm de acetaldehído almacenadas a 2 y 4 °C. Referente a la temperatura, existieron diferencias significativas en las temperaturas aplicadas a partir del día cinco hasta el 15 de refrigeración. Tejacal *et al.* (2005) realizaron un trabajo en frutos de mamey y obtuvieron valores de acetaldehído que van de 24.8 mg kg<sup>-1</sup> hasta alcanzar 50.0 mg kg<sup>-1</sup> almacenados a 20 días a bajas temperaturas de 5 °C,

mencionan que el acetaldehído es un componente natural de los tejidos vegetales que se acumula en niveles bajos durante la maduración.

**CUADRO 8.** Efecto de las diferentes concentraciones de GLs y temperaturas de almacenamiento en el contenido de acetaldehído, en hojas de Arúgula.

Factor/Nivel µg/ml GLs	Acetaldehído µmol 100ml							
	Día 0	Día3	Día 5	Día 7	Día 9	Día 11	Día13	Día15
<b>Concentraciones</b>								
Sin GLs, sin inóculo	0*	-	1.03 b <sup>†</sup>	1.20 b	1.37 b	2.90 b	3.56 b	5.03 b
Sin GLs + inóculo	0	-	1.28 a	1.46 a	1.95 a	4.94 a	6.06 a	6.55 a
1.49 GLs + inóculo	0	-	0.28 c	0.46 c	0.33 c	0.51 c	0.76 c	0.93 c
2.98 GLs+ inóculo	0	-	0.20 d	0.29 d	0.21 d	0.28 d	0.48 d	0.69 d
DMSH			0.023	0.036	0.076	0.190	0.219	0.151
<b>Temperatura °C</b>								
22	0	-	1.25 a	1.44 a	- <sup>†</sup>	-	-	-
4	0	-	0.53 b	0.74 b	1.32 a	2.38 a	2.92 a	3.55 a
0	0	-	0.31 c	0.39 c	0.61 b	1.93 b	2.49 b	3.04 b
DMSH			0.004	0.015	0.006	0.004	0.002	0.002

<sup>†</sup>Medias con la misma letra dentro de columnas no son diferentes (Tukey con P≤0.05). \* No significativo; DMSH: Diferencia mínima significativa honesta. GLs: Glucosinolatos; <sup>†</sup>Datos perdidos por senescencia.

## Etanol

Cuando se utilizó la concentración de 2.98 µg/ml no se encontró etanol desde el día 7 hasta el final del almacenamiento (Cuadro 9). Sin embargo, cuando no se aplican GLs pero sí inóculo, se presentó contenido de etanol de 19.9 µmol 100 ml.

A la fecha no se han realizado estudios de producción de etanol en hojas de Arúgula, para contrastarlos con lo obtenido en este trabajo. Sin embargo Meier *et al.* (2004) en un estudio realizado con naranjas y mandarinas, obtuvieron valores de 706.5 ppm de etanol almacenadas a 2 y 4 °C.

**CUADRO 9.** Efecto de las diferentes concentraciones de GLs y temperaturas de almacenamiento en el contenido de etanol en hojas de Arúgula.

Factor/Nivel µg/ml GLs	Etanol µmol 100 ml							
	Día0	Día3	Día5	Día 7	Día 9	Día11	Día13	Día15
<b>Concentraciones</b>								
Sin GLs, sin inóculo	0*	-	16.0b <sup>†</sup>	18.0 b	18.0 b	18.3 b	18.6 b	18.9 b
Sin GLs + inóculo	0	-	18.6 a	19.3 a	19.3 a	19.9 a	20.0 a	19.9 a
1.49 GLs + inóculo	0	-	5.40 c	11.6 c	9.10 c	9.20 c	9.20 c	9.30 c
2.98 GLs+ inóculo	0	-	5.20 d	5.40 d	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 d
DMSH			0.17	0.23	0.21	0.32	0.30	0.36
<b>Temperatura °C</b>								
22	0	-	16.9 a	18.0 a	- <sup>†</sup>	-	-	-
4	0	-	8.69 b	11.9 b	12.0 a	12.2 a	12.3 a	12.5 a
0	0	-	8.40 c	10.9 c	11.2 b	11.4 b	11.5 b	11.6 b
DMSH		-	0.13	0.18	0.11	0.16	0.15	0.19

<sup>†</sup>Medias con la misma letra dentro de columnas no son diferentes (Tukey con  $P \leq 0.05$ ). \* No significativo; DMSH: Diferencia mínima significativa honesta. GLs: Glucosinolatos; <sup>†</sup>Datos perdidos por senescencia.

Las temperaturas mostraron diferencias significativas, la de 0 °C alcanzo un valor de 11.6 µmol 100 ml, considerándose la más adecuada. Tejacal *et al.* (2005) hace referencia a los valores obtenidos en mamey, los cuales oscilan entre 6.4 y 36.3 mg kg<sup>-1</sup> y después obtiene un incremento de 99.7 a 325 mg kg<sup>-1</sup> en la madurez y sobremaduración.

La producción de etanol y acetaldehído es estimulada por la destrucción de las células de los tejidos en alimentos mínimamente procesados (Artes *et al.*, 2007). Por lo que al no haber tal daño la presencia de este compuesto no es detectable, como fue el caso del tratamiento de 2.98 µg/ml que no presentó valor alguno.

### **Pérdida de peso (%)**

La pérdida de peso expresada en porcentaje se presentó en el Cuadro 10 con el cual se aprecia que existieron diferencias significativas entre todos los

tratamientos aplicados a partir del día tres al 15 de almacenamiento, la concentración 2.98 µg/ml de GLs, produjo una pérdida del 13 % mientras que el tratamiento sin GLs + inóculo presentó una pérdida de peso del 26.5 %.

**Cuadro 10.** Efecto de las diferentes concentraciones de GLs y temperaturas de almacenamiento en la pérdida de peso en hojas de Arúgula.

Factor /Nivel µg/ml GLs	Pérdida de peso (%)								
	Día 0	Día 3	Día 5	Día 7	Día 9	Día11	Día13	Día15	
<b>Concentraciones</b>									
Sin GLs, sin inóculo	0*	10.6 b <sup>†</sup>	19.7 b	26.6 b	13.9 b	17.1 b	20.3 b	22.3 b	
Sin GLs + inóculo	0	17.3 a	27.8 a	34.2 a	17.3 a	20.3 a	24.3 a	26.5 a	
1.49 GLs + inóculo	0	7.30 c	13.4 c	19.3 c	11.6 c	13.4 c	15.4 c	17.6 c	
2.98 GLs + inóculo	0	4.80 d	9.30 d	14.1 d	9.00 d	10.4 d	12.4 d	13.6 d	
DMSH		0.52	0.352	0.584	0.451	0.454	0.484	0.435	
<b>Temperatura °C</b>									
22	0	17.1 a	34.5 a	49.0 a	- <sup>†</sup>	-	-	-	
4	0	7.50 b	9.97 b	11.6 b	13.8 a	16.5 a	19.3 a	20.0 a	
0	0	5.40 c	8.28 c	10.0 c	12.0 b	14.2 b	16.8 b	18.0 b	
DMSH		0.41	0.276	0.458	0.236	0.238	0.253	0.224	

<sup>†</sup>Medias con la misma letra dentro de columnas no son diferentes (Tukey con P≤0.05). \* No significativo; DMSH: Diferencia mínima significativa honesta. GLs: Glucosinolatos; <sup>†</sup>Datos perdidos por senescencia.

Los resultados obtenidos en este estudio son similares a los reportados por Torales *et al.*, (2010), quienes encontraron pérdida del 12 % después de 12 días de almacenamiento. En cuanto al efecto de la temperatura en la pérdida de peso a partir del día 3 al 15 de refrigeración hubo diferencias significativas entre todos los tratamientos. Se ha considerado que la deshidratación superficial es uno de los principales problemas que afectan la calidad de las hojas. En el Cuadro 8 se observa la menor pérdida de peso en las hojas almacenadas a 0 °C (18%) en comparación a lo observado a temperatura ambiente del 49 %.

De acuerdo con Kader, (2007) debido al alto contenido de agua en las hierbas frescas, éstas deben almacenarse a temperaturas cercanas a 0 °C, ya que a

mayores temperaturas se presenta una mayor pérdida de agua. Las temperaturas de almacenamiento también afectan la maduración. Altas temperaturas incrementar la desecación por pérdida acelerada de agua, lo cual produce alteraciones tanto en el exterior como en el interior de la hoja (Romojaro *et al.*, 2006).

## Calidad

Uno de los principales atributos que impacta al consumidor es la apariencia, en el Cuadro 11 la concentración que permitió retener mejor el aspecto del producto fue la de 2.98 µg/ml de GLs + inóculo mientras que la mayor pérdida calidad se obtuvo sin GLs + inóculo. Aun cuando no hubo diferencias significativas para el periodo de almacenamiento de 3 a 7 días, a partir del día nueve todos los tratamientos fueron estadísticamente diferentes. Torales *et al.*, (2010) en un trabajo realizado con hojas de Arúgula encontró valores de 4.0 a 5.0 de calidad a los 15 días de almacenamiento.

**Cuadro 11.** Efecto de las diferentes concentraciones de GLs y temperaturas de almacenamiento en la calidad de Arúgula medido a través de promedios de rangos de Kruskal-Wallis.

Factor /Nivel µg/ml GLs	Calidad								
	Día 0	Día 3	Día 5	Día 7	Día 9	Día11	Día13	Día15	
<b>Concentraciones</b>									
Sin GLs, sin inóculo	0*	8.60 <sup>†</sup> a	7.60 a	5.40 a	6.50 a	5.70 a	5.50 a	4.00 a	
Sin GLs + inóculo	0	7.70 a	7.00 a	4.40 a	5.0 ab	4.60 ab	3.30 ab	2.00 ab	
1.49 GLs + inóculo	0	8.80 a	8.10 a	7.70 a	8.3 bc	7.70 bc	7.30 bc	6.50 bc	
2.98 GLs + inóculo		9.00 a	8.40 a	7.30 a	9.00 c	9.00 c	8.70 c	8.40 c	
<b>Temperatura °C</b>									
22	0	7.50 a	5.20 a	3.00 a	- <sup>†</sup>	-	-	-	
4	0	9.00 b	9.00 b	7.20 b	6.7 a	5.60 a	5.20 a	4.00 a	
0	0	9.00 b	9.00 b	8.30 b	7.5 a	6.70 b	6.40 b	6.00 b	

<sup>†</sup>Medias con la misma letra dentro de columnas no son diferentes (Tukey con P≤0.05); \*No significativo; GLs: Glucosinolatos; <sup>†</sup>Datos perdidos por senescencia.

En cuanto al efecto de la temperatura en la calidad de Arúgula el mejor tratamiento fue el 0 °C, mientras que en cambio a temperatura ambiente se presentó una rápida pérdida de calidad. Cantwell *et al.*, (1998) trabajaron con hojas de Arúgula y obtuvieron valores de calidad de 5.0 cuando almacenaron a 0 °C por 13 días.

### Amarillamiento

Un factor importante en el acortamiento de la vida comercial de la Arúgula es el amarillamiento de las hojas oscurecido por la pérdida de clorofila. En el cuadro 12 se muestra que el tratamiento de 2.98 µg/ml de GLs + inóculo fue el que conservó mejor el color inicial mientras que al no aplicar GLs + inóculo se presentó el mayor grado de amarillamiento. Koukounaras *et al.*, (2007) midieron el grado de amarillamiento en hojas de Arúgula y obtuvieron una calificación promedio de menos de 3 (equivalente a ligeramente verde) a los 14 días de almacenamiento.

**Cuadro 12.** Efecto de las diferentes concentraciones de GLs y temperaturas de almacenamiento en el amarillamiento de Arúgula medido a través de promedios de rangos de Kruskal-Wallis.

Factor /Nivel µg/ml GLs	Amarillamiento								
	Día 0	Día 3	Día 5	Día 7	Día 9	Día11	Día13	Día15	
<b>Concentraciones</b>									
Sin GLs, sin inóculo	0*	8.30 a <sup>†</sup>	7.90 b	5.9 ab	7.00 ab	6.00 ab	5.0 ab	3.7 ab	
Sin GLs + inóculo	0	8.10 a	5.90 a	4.80 a	4.70 a	4.60 a	3.30 a	2.00 a	
1.49 GLs + inóculo	0	8.80 a	8.30 b	7.50 b	8.30 b	8.00 bc	7.0b c	6.0b c	
2.98 GLs + inóculo	0	9.00 a	8.60 b	7.90 b	9.00 b	9.00 c	9.00 c	8.50 c	
<b>Temperatura °C</b>									
22	0	7.60 a	5.50 a	3.40 a	- <sup>†</sup>	-	-	-	
4	0	9.00 b	8.50 b	7.80 b	6.80 a	6.10 a	5.10 a	3.80 a	
0	0	9.00 b	8.70 b	8.50 b	8.30 a	7.40 b	6.50 b	6.00 b	

<sup>†</sup>Medias con la misma letra dentro de columnas no son diferentes (Tukey con P≤0.05); \* No significativo; GLs: Glucosinolatos; <sup>†</sup>Datos perdidos por senescencia.

En cuanto al almacenamiento a temperatura ambiente ésta presentó la mayor pérdida de amarillamiento al día 7 con un valor de 3.40, mientras que la de 0 °C obtuvo un promedio de 6.00 al día 15 de almacenamiento.

## Olor

Se encontraron diferencias significativas entre todas las aplicaciones a partir del día nueve al 15 de almacenamiento donde el efecto de la aplicación de GLs a una concentración de 2.98 µg/ml de GLs + inóculo, permitió que las hojas de Arúgula conservaran mejor su aroma (Cuadro 13), mientras que el tratamiento sin GLs + inóculo presentó el mayor grado de pérdida de olor en las hojas.

El almacenamiento a temperatura ambiente produjo una rápida desaparición del aroma, mientras que éste se preservó mejor a 0 °C.

**Cuadro 13.** Efecto de las diferentes concentraciones de GLs y temperaturas de almacenamiento en el aroma de Arúgula medido a través de promedios de rangos de Kruskal-Wallis.

Factor /Nivel µg/ml GLs	Olor								
	Día 0	Día 3	Día 5	Día 7	Día 9	Día11	Día13	Día15	
<b>Concentraciones</b>									
Sin GLs, sin inóculo	0*	8.30 a <sup>†</sup>	7.70 a	7.00 a	8.3 ab	6.70 ab	6.00 ab	5.00 ab	
Sin GLs + inóculo	0	8.10 a	6.80 a	5.20 a	7.00 a	5.30 a	4.70 a	2.30 a	
1.49 GLs + inóculo	0	8.60 a	7.90 a	7.70 a	9.00 b	8.00 bc	7.0b c	6.30 bc	
2.98 GLs + inóculo	0	9.00 a	8.40 a	7.90 a	9.00 b	8.70 c	8.00 c	8.00 c	
<b>Temperatura °C</b>									
22	0	7.50 a	5.00a	3.60 a	- <sup>†</sup>	-	-	-	
4	0	9.00 b	9.00b	8.50 b	8.50 a	6.60 a	6.10 a	4.60 a	
0	0	9.00 b	9.00c	8.70 b	8.20 a	7.70 a	7.70 b	6.20 b	

<sup>†</sup>Medias con la misma letra dentro de columnas no son diferentes (Tukey con P≤0.05); \*No significativa; GLs: Glucosinolatos; <sup>†</sup>Datos perdidos por senescencia.

## Pudrición

Debido a que durante los primeros 14 días de almacenamiento no se presentaron pudriciones en las hojas de Arúgula, no se detectaron diferencias estadísticas significativas entre tratamientos sólo para el día 15 se observó mayor pudrición para el tratamiento sin GLs + inóculo.

**Cuadro 14.** Efecto de las diferentes concentraciones de GLs y temperaturas de almacenamiento en la pudrición de Arúgula medido a través de promedios de rangos de Kruskal-Wallis.

Factor/Nivel µg/ml	Pudrición								
	Día 0	Día 3	Día 5	Día 7	Día 9	Día11	Día13	Día 15	
<b>Concentraciones</b>									
Sin GLs, sin inóculo	0*	1.00a <sup>†</sup>	1.44 a	1.44 a	1.00 a	1.00 a	1.00 a	1.50 a	
Sin GLs + inóculo	0	1.22 a	1.67 a	2.00 a	1.00 a	1.00 a	1.17 a	2.17 ab	
1.49 GLs + inóculo	0	1.00 a	1.00 a	1.00 a	1.00 a	1.00 a	1.00 a	1.00 b	
2.98 GLs + inóculo		1.00 a	1.00 a	1.11 a	1.00 a	1.00 a	1.00 a	1.00 b	
<b>Temperatura °C</b>									
22	0	1.17 a	1.83 a	2.17 a	- <sup>†</sup>	-	-	-	
4	0	1.00 a	1.00 a	1.00 a	1.00 a	1.00 a	1.08 a	1.50 a	
0	0	1.00 a	1.00 a	1.00 a	1.00 a	1.00 a	1.00 a	1.33 a	

<sup>†</sup>Medias con la misma letra dentro de columnas no son diferentes (Tukey con  $P \leq 0.05$ ); \* No significativo; GLs: Glucosinolatos; <sup>†</sup>Datos perdidos por senescencia.

## 4.6 CONCLUSIONES

La aplicación de GLs y el almacenamiento a 0 °C preservaron mejor la fisiología de las hojas de Arúgula y con ello la vida de anaquel. Por lo que estos resultados corroboran la actividad antifúngica del jugo de brócoli (GLs), como una alternativa potencial para el control de *Alternaria alternata* en el manejo postcosecha de Arúgula.

#### 4.7 LITERATURA CITADA

- ABLE, A. J.; WONG, L. S.; PRASAD, A.; O'HARE, J. 2005. The physiology of senescence in detached pak choy leaves (*Brassica rapa* var. *Chinensis*) during storage at different temperatures. *Postharvest Biology and Technology* 35:271-278.
- ANDERSEN, B.; KROGER, E.; ROBERTS, G. 2001. Chemical and morphological segregation of *Alternaria alternata*, *A. gaisen* and *A. longipes*. *Mycological Research* 105:291-299.
- ARTES, F.; GOMEZ, P.; ARTÉS-HERNÁNDEZ, F.; AGUAYO, E.; ESCALONA, V. 2007. Improved strategies for keeping quality of fresh-cut produce. *Acta Horticulturae* 746: 245-258.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). 1980. Official Methods of Analysis. HORWITZ, W. (ed). 13th Ed. Benjamin Franklin Station, Washington DC. USA. 1018 p.
- BARNETT, H. L.; HUNTER, B. B. 1998. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. Cuarta edición. Minnesota. APS Press. 210 p.
- BÁEZ-FLORES, M. E.; TRONCOSO-ROJAS, R.; TIZNADO HERNÁNDEZ, M.E. 2008. Respuestas genéticas provocadas por el tratamiento con isotiocianatos en hongos del género *Alternaria*. *Revista Mexicana de Fitopatología* 29:61-68.
- BRANDI, G.; AMAGLIANI, G.; SCHIAVANO, G. F.; DE SANTI, M.; SISTI, M. 2006. Activity of *Brassica oleracea* leaf juice on foodborne pathogenic bacteria. *Journal of Food Protection* 9:2274–2279.

- CAMPAS-BAYPOLI, O. N.; BUENO-SOLANO, C.; MARTÍNEZ-IBARRA, D. M.; CAMACHO-GIL F.; VILLA-LERMA A. G.; RODRÍGUEZ-NUÑEZ J. R.; LÓPEZ CERVANTES J.; SÁNCHEZ-MACHADO, D. I. 2009. Contenido de sulforafano (1 isotiocianato-4-(metilsulfinil)-butano) en vegetales crucíferos. Archivos Latinoamericanos de Nutrición 59:(1) 95-100.
- CANTWELL, M.; ROVELO, J.; NIE, X.; RUBARZKY, V. 1998. Speciality salad greens: postharvest physiology and shelf-life. Acta Horticulturae 467:371-377.
- DAVIES, P. L.; CHACE, W. G. 1969. Determination of alcohol in citrus juice by Gas chromatographic analysis of headspace. HortScience 4:117-119.
- FRAIRE-CORDERO, M. L.; NIETO-ÁNGEL, D.; CÁRDENAS-SORIANO, E. 2010. *Alternaria tenuissima*, *A. alternata* y *Fusarium oxysporum* hongos causantes de la pudrición de florete de brócoli. Revista Mexicana de Fitopatología 28(1):25-33.
- GONZÁLEZ-AGUILAR, G. A. 2005. Nuevas tecnologías de conservación de productos vegetales frescos cortados. CIAD México. 558 p.
- JEZEK, J.; BARRY, G.; HAGGETT, D.; ATKINSON, A.; RAWSON, D. M. 1999. Determination of glucosinolates using their alkaline degradation and with ferricyanide. J. Agric. Food Chem 47:4669-4674.
- KADER, A. A. 2003. A perspective on Postharvest Horticulture. Hortscience 38:(5)1004-1008.
- KADER, A. A. 2007. Tecnología Postcosecha de cultivo hortofrutícolas. Tercera edición, Univ. Calif. Peer Reviewed. 299 p.

- KIM, S. J.; ISHI, G. 2007. Effect of storage temperature and duration on glucosinolate, total vitamin C and nitrate contents in rocket salad (*Eruca sativa* Mill). Journal of The Science of Food and Agriculture 87:966-973.
- KOUKOUNARAS, A.; SIOMOS, A. S.; SFAKIOTAKIS, E. 2007. Postharvest CO<sub>2</sub> and ethylene production and quality of rocket (*Eruca Sativa* Mill.) leaves as affected by leaf age and storage temperature. Postharvest Biology and Technology 46:167-173.
- KOUKOUNARAS, A.; SIOMOS, A. S.; SFAKIOTAKIS, E. 2009. Impact of heat treatment on ethylene production and yellowing of modified atmosphere packaged rocket leaves. Postharvest Biology and Technology 54:172-176.
- MARI, M.; IORI, R.; LEONI, O.; MARCHI, A. 1996. Bioassays of glucosinolate-derived isothiocyanates against postharvest pear pathogens. Plant Pathology 45: 753-760.
- MARTÍNEZ-SÁNCHEZ, A.; ALLENDE, A.; BENNETT, R. N.; FERRERES, F.; GIL, M. I. 2006. Microbial, nutritional and sensory quality of rocket leaves as affected by different sanitizers. Postharvest Biology and Technology 42:86-97.
- MASAHIRO, K.; ANDRIANTSOA, R.; YOKO, O.; MOTOAKI, T.; HITOSHI, H.; RYO F. 2006. Induction of soil suppressiveness against *Rhizoctonia solani* by incorporation of dried plant residues into soil. Phytopathology 96:1372-1379.
- MONFORT, W. S.; CSINOS, A.; DESAEGER, J.; SEEHOLD, K.; WEBSTER, T.; DÍAZ-PÉREZ, J.C. 2007. Evaluating *Brassica* species as an alternative

control measure for root-knot nematode (*M. incognita*) in Georgia vegetable plasticulture. *Crop Protection* 26:1359-1368.

MEIER, G. E.; PONTE, E.; VÁZQUEZ, D. E. 2004. Contenido de acetaldehído y etanol en naranjas y mandarinas durante la postcosecha. *Revista de investigaciones Agropecuarias* 33(001):135-150.

NICOLA, S.; FONTANA, E.; TIBALDI, G.; ZHAN, L. 2010. Quantitative and physiological response of minimally processed rocket (*Eruca sativa* Mill.) to package filling amount and shelf-life temperature. *Acta Horticulturae* 877: 611-618.

NÚÑEZ-LOPEZ, V.; MARTINEZ-DAMIÁN, T.; COLINAS-LEON, M. T. 2012. Fisiología postcosecha de albahaca (*Occimum basilicum* L.) con y sin acolchado. *Revista Chapingo serie Horticultura* 18:307-315.

OZGEN, M.; REESE, N. R.; ARTEMIO, Z.; TULIO, JR.; SCHEERENS, C. J.; MILLER, R. A. 2006. Modified 2,2-Azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) method to measure antioxidant capacity of selected small fruits and comparison to ferric reducing antioxidant power (FRAP) and 2,2'-diphenil-1-picrylhydrazyl (DPPH) methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54(4):1151-1157.

ROTEM, Y. 1994. The Genus *Alternaria*: Biology, Epidemiology and Pathogenicity. APS Press, American Phytopathological Society. 326 p.

ROMOJARO, F.; MARTÍNEZ-MADRID, M.C.; PRETEL, M.T. 2006. Factores precosecha determinantes de la calidad y conservación en postcosecha de productos agrarios. V Simposio Ibérico VIII Nacional de Maduración y Post-Recolección, Orihuela Alicante. 91-96.

- SISTI, M.; AMAGLIANI, G.; BRANDI, B. 2006. Antifungal activity of *Brassica oleracea* var. *botrytis* fresh aqueous juice. *Fitoterapia* 74:453-458.
- TEJACAL, I. A.; COLINAS, LEÓN M. T.; MARTÍNEZ DAMIÁN, M. T.; SOTO HERNÁNDEZ, R. M. 2005. Daños por frío en zapote mamey (*Pouteria sapota* (kacq.) H. E. Moore and Stearn). I. Cambios en volátiles, firmeza y azúcares totales *Revista Fitotecnia Mexicana* 28(001):17-24.
- TIZNADO-HERNANDEZ, M.; TRONCOSO-ROJAS, R. 2006. Control of fungal diseases with isothiocyanates. *Stewart Postharvest Review* 1(4):1-14.
- TONOIVEN, P. M. A. 2004. Postharvest storage procedures and oxidative stress. *HortScience* 39(5):938-942.
- TRONCOSO-ROJAS, R.; SÁNCHEZ-ESTRADA, A.; RUELAS, C.; GARCÍA, H. S. 2005. Effect of benzyl isothiocyanate on tomato fruit infection development by *Alternaria alternata*. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 85:1427-1434.
- TORALES, A. C.; CHÁVEZ, A. R.; RODRÍGUEZ, S. C. 2010. Cambios en la calidad de rúcula mínimamente procesada, efecto de distintos envases. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha* 11(2):196-203.
- VENNERIA, E.; MARINELLI, L.; INTORRE, F.; FODDAI, M. E.; AURIGEMMA, C.; DURAZZO, A.; MAIANI, G.; GIUSTI, M. 2012. Effect of harvest time and minimal processing on nutritional and microbiological quality of three leaf crops. *Journal of Agriculture and Biodiversity Research* 1(1):11-17.
- VIUDA-MARTOS, M.; RUIZ-NAVAJAS, Y.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.; PÉREZ-ÁLVAREZ, J.A. 2007. Antifungal activities of thyme, clove and oregano essential oils. *J Food Safety* 27:91-101.

WATERMAN, P. G.; MOLE, S. 1994. Analysis of Phenolic Plant Metabolites. Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK. 238 p.

## 5. CONCLUSIONES GENERALES

1. El jugo de brócoli (GLs) puede ser usado en la conservación postcosecha, toda vez que resultó 100 % efectivo en la inhibición de la germinación de esporas de *Alternaria alternata* bajo condiciones *in vitro*.
2. La concentración de 2.98 µg/ml de jugo de brócoli (GLs) presentó la mayor eficiencia en la preservación del daño causado por *Alternaria* en hojas de Arúgula.
3. El almacenamiento de Arúgula a 0 °C y la aplicación de jugo de brócoli (GLs) a una concentración de 2.98 µg/ml permitió mantener la calidad, color y sanidad postcosecha de esta hortaliza.

## 6. LITERATURA CITADA GENERAL

CAMPAS –BAYPOLI. O. N.; BUENO-SOLANO, C.; MARTÍNEZ-IBARRA, D. M.; CAMACHO-GIL F.; VILLA-LERMA A. G.; RODRÍGUEZ-NUÑEZ J. R.; LÓPEZ-CERVANTES J.; SÁNCHEZ-MACHADO D. I. 2009. Contenido de sulforafano (1-isotiocianato-4-(metilsulfinil)-butano) en vegetales crucíferos. Archivos Latinoamericanos de Nutrición. 59(1):95-100.

CHAR, C.; SILVEIRA, A. C.; INESTROZA-LIZARDO, C.; HINOJOSA, A.; MACHUCA A.; ESCALONA, V. H. 2012. Effect of noble gas-enriched

atmospheres on the overall quality of ready-to-eat Arúgula salads. *Postharvest Biology and Technology*. 73:50-55.

CHIRINOS, J. 2009. Uso de extractos naturales como una alternativa ecológica para el control de enfermedades en plantas. *INIA Divulga* 14:40-42.

FALK, K. L.; VOGEL, CH.; TEXTOR, S.; BARTRAM, S.; HICK, A.; PICKETT, J. A.; GERSHENZON, J. 2004. Glucosinolate biosynthesis: demonstration and characterization of the condensing enzyme of the chain elongation cycle in *Eruca sativa*. *Phytochemistry*. 65:1073-1084.

GONZÁLEZ-AGUILAR G. A. 2005. Nuevas Tecnologías de Conservación de Productos Vegetales Frescos Cortados. CIAD México. 558 p.

KADER, A. A. 2003. A perspective on postharvest horticulture. *Hortscience* 38(5):1004-1008.

KIM, S. J.; JIN, S.; ISHII G. 2004. Isolation and structural elucidation of 4-( $\beta$ -D-Glucopyranosyldisulfanyl) butyl glucosinolate from leaves of rocke salad (*Eruca sativa* L.) and its antioxidative activity. *Biosci. Biotechnol. Biochem* 68(12): 2444-2450.

MORALES M., JANICK J. 2002. Arugula: A promising Specialty Leaf Vegetable. J. JANICK AND A. WHIPKEY (eds.) ASHS Press, Alexandria, VA. 423 p.

NICOLA, S.; FONTANA, E.; TIBALDI, G.; ZHAN, L. 2010. Quantitative and physiological response of minimally propcessed rocket (*Eruca sativa* Mill.) to package filling amount and shelf-life temperature. *Acta Horticulturae* 6<sup>th</sup> Internacional Postharvest Symposium 877:611-618.

- RODRÍGUEZ SAUCEDA, E. N. 2011. Uso de agentes antimicrobianos naturales en la conservación de frutas y hortalizas. *Revista Ra Ximhai*. 7(1):153-170.
- HERRERO, A. M. ROMERO DE ÁVILA M. D. 2006. Innovaciones en el procesado de alimentos: Tecnologías no térmicas. *Rev. Med. Univ. Navarra* 50:71-74.
- TONOIVEN, P. M. A. 2004. Postharvest storage procedures and oxidative stress. *HortScience* 39(5):938-942.
- VIUDA-MARTOS, M.; RUIZ-NAVAJAS, Y.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.; PÉREZ-ÁLVAREZ, J.A. 2007. Antifungal activities of thyme, clove and oregano essential oils. *J Food Safety* 27:91-101.

## 7. ANEXOS

**Cuadro 1A.** Cuadrados medios y significancia estadística de la severidad evaluada en hojas de Arúgula.

FV	GL	Día 3	Día 5	Día 7	Día 9	Día 11	Día 13	Día 15
Conc	3	67.4**	158.6**	572.8**	220.7**	637.9**	495.1**	1672 **
Temp	2	557.5**	1976.8**	3663.2**	46.2*	122.9**	155.0**	219.4**
C x T	6	67.4*	121.0**	223.1	13.4*	31.7**	39.0**	57.41*
Error	24	0.48	2.41	1.9	2.8	2.8	2.2	9.20
Total	35							
CV		17.61	20.0	11.43	23.6	23.6	16.5	20.6
Media		3.93	7.75	12.1	4.51	7.11	9.13	14.6

FV: fuente de variación; GL: grados libertad \*\* significancia estadística con  $p=0.05$ ; CV: coeficiente de variabilidad. CxT: concentración por temperatura

**Cuadro 2A.** Cuadrados medios y significancia estadística de la incidencia evaluada en hojas de Arúgula.

FV	GL	Día 3	Día 5	Día 7	Día 9	Día 11	Día 13	Día 15
Conc	3	84.2**	949**	1869**	3263**	4895**	6484**	8428**
Temp	2	1205**	21319**	22708**	1666**	937*	651*	1276**
C x T	6	84.2**	532.4**	185.1	347.2**	312.5	95.4	95.48
Error	24	5.78	52.0	138	130	130	130	78.1
Total	35							
CV		41.5	27.3	32.2	54.7	42.1	31.2	20.6
Media		5.78	26.3	35.4	20.8	27.0	36.4	42.71

FV: fuente de variación; GL: grados libertad \*\* significancia estadística con  $p=0.05$ ; CV: coeficiente de variabilidad. CxT: concentración por temperatura.

**Cuadro 3A.** Cuadrados medios y significancia estadística de los parámetros evaluados en hojas de Arúgula mínimamente procesada.

FV	GL	CL*	CC <sup>+</sup>	CH <sup>0</sup>	Chl a	Chl b	Chl T	C	SS	AT	VC	CA	F	PP	C02	ET	AC	ETA	
					mg/g	mg/g	mg/g	mg/g	% Ácido cítrico	% Ácido cítrico	mg/g Ácido cítrico	mg/g	mg/g	%	%	µl Kg <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	µmol 100 ml	µmol 100 ml	
<b>Día 3</b>																			
Conc	3	10.6**	7.14**	44.1**	0.027**	0.002**	0.04**	0.002**	0.90**	0.002**	355.6**	1,80**	0,09**	262.0**	0.002**	0.13**			
Temp	2	4.31**	2.79**	4.93**	0.005**	0.006**	0.02**	6x10 <sup>-4</sup> **	0.76**	4x10 <sup>-4</sup> **	544.07	0,33**	0,04**	467.6**	0.006*	0.33**			
C x T	6	3.21**	1.15**	0.64**	5x10 <sup>-4</sup> **	1x10 <sup>-4</sup> **	1x10 <sup>-4</sup> **	4x10 <sup>-5</sup> **	0.16**	2x10 <sup>-4</sup> **	12.56**	0,02*	0,01**	83.74**	1 x10 <sup>-4</sup>	0.007**			
Error	24	0.05	0.05	0.07	4 x10 <sup>-6</sup>	8 x 10 <sup>-6</sup>	1 x10 <sup>-5</sup>	1 x10 <sup>-6</sup>	5 x 10 <sup>-3</sup>	5 x 10 <sup>-6</sup>	1.34	0.008	9 x 10 <sup>-5</sup>	0.16	3 x10 <sup>-7</sup>	4 x 10 <sup>-5</sup>			
Total	35																		
CV		0.72	0.98	0.24	0.50	1.33	0.67	1.06	1.06	0.90	1.71	3.12	3.76	4.01	0.81	1.41			
Media		31.7	22.7	113.9	0.42	0.22	0.64	0.12	6.79	0.25	67.6	2.95	0.25	10.0	0.07	0.47			
<b>Día 5</b>																			
Conc	3	16.4 **	29.0**	141.5**	0.03**	0.004**	0.06**	0.003**	2.88 **	0.005**	1309**	1.64**	0.09**	589.8**	0.003**	0.22**	2.61**	444**	
Temp	2	38.09**	103.5**	119.8**	0.01**	0.02**	0.07**	0.001**	1.79**	1x10 <sup>-4</sup> **	1325**	0.57**	0.006**	2603**	0.009**	0.37**	2.89**	258**	
C x T	6	2.65**	4.90**	14.85**	5x10 <sup>-4</sup> **	4x10 <sup>-4</sup> **	0.001**	2 x10 <sup>-5</sup>	0.02**	2x10 <sup>-4</sup> **	42.89**	0.01	0.009**	283.0**	3x10 <sup>-5</sup> **	0.008**	0.08**	78.3**	
Error	24	0.05	0.06	0.10	2 x 10 <sup>-2</sup>	3 x 10 <sup>-6</sup>	3 x10 <sup>-6</sup>	1 x10 <sup>-5</sup>	0.005	3 x10 <sup>-6</sup>	1.46	0.007	1 x 10 <sup>-4</sup>	0.07	2 x 10 <sup>-6</sup>	2 x 10 <sup>-5</sup>	3 x10 <sup>-4</sup>	0.01	
Total	35																		
CV		0.67	0.97	0.28	0.38	0.93	0.29	2.99	1.13	0.73	2.06	3.14	6.10	1.53	1.5	0.82	2.53	1.16	
Media		33.90	25.22	110.94	0.39	0.19	0.59	0.10	6.24	0.24	58.56	2.82	0.22	17.61	0.07	0.55	0.70	11.36	
<b>Día 7</b>																			
Conc	3	128.2**	136.8**	290.8**	0.03**	0.005**	0.07**	0.003**	4.07 **	0.009**	975.3**	1.42**	0.08**	691.3**	0.004**	0.34**	2.80**	368**	
Temp	2	987.2**	835.9**	1163 **	0.08**	0.02**	0.21**	0.001**	3.52**	0.001**	3236**	2.3**	0.05**	5847**	0.01**	0.55**	3.41**	176**	
C x T	6	24.85**	30.13**	42.51**	9x10 <sup>-4</sup> **	3x10 <sup>-4</sup> **	0.002**	4x10 <sup>-6</sup> **	0.05**	2x10 <sup>-4</sup> **	123.9**	0.01	0.004**	311.1**	5x10 <sup>-4</sup> **	0.01**	0.09**	54.9**	
Error	24	0.07	0.03	0.10	2 x 10 <sup>-6</sup>	1 x 10 <sup>-6</sup>	4 x 10 <sup>-6</sup>	8 x 10 <sup>-7</sup>	0.007	1 x 10 <sup>-5</sup>	1.05	0.009	1 x 10 <sup>-4</sup>	0.20	4 x10 <sup>-7</sup>	2 x 10 <sup>-4</sup>	7x10 <sup>-4</sup>	0.03	
Total	35																		
CV		0.69	0.60	0.30	0.49	0.60	0.41	0.99	1.51	1.36	2.02	3.54	5.37	1.90	0.90	2.51	3.24	1.29	
Media		39.84	29.4	105.72	0.34	0.18	0.52	0.09	5.73	0.24	50.72	2.68	0.21	23.58	0.10	0.61	0.85	13.64	
<b>Día 9</b>																			
Conc	3	86.67**	68.7**	89.97**	0.029**	0.002**	0.04**	0.002**	2.49**	0.009**	1336**	1.31**	0.07**	74.83**	0.002**	0.19**	4.20**	485**	
Temp	1	7.03**	31.4**	12.65**	0.002**	0.005**	0.01**	3x10 <sup>-4</sup> **	0.18**	3x10 <sup>-5</sup> **	114.3**	0.35**	0.009**	19.97**	2x10 <sup>-4</sup> **	0.35**	3.05**	4.53**	

C x T	3	0.98**	4.49**	0.41**	3x10 <sup>-4**</sup>	2x10 <sup>-4**</sup>	9x10 <sup>-4**</sup>	6 x 10 <sup>-6</sup>	0.01	3x10 <sup>-4**</sup>	6.78**	0.005	0.002**	1.60**	3x10 <sup>-6**</sup>	0.04**	0.80**	1.00**
Error	16	0.07	0.51	0.34	1 x 10 <sup>-6</sup>	1x10 <sup>-6</sup>	1x10 <sup>-6</sup>	7 x 10 <sup>-7</sup>	0.11	1 x 10 <sup>-6</sup>	0.65	0.004	1 x 10 <sup>-4</sup>	0.07	5 x 10 <sup>-7</sup>	5 x 10 <sup>-5</sup>	0.002	0.01
Total	23																	
CV		0.75	0.87	0.16	0.28	0.53	0.20	0.94	1.81	0.53	1.52	2.39	4.85	2.10	1.22	1.41	4.77	1.13
Media		36.30	25.9	110.18	0.36	0.20	0.56	0.09	5.84	0.25	53.18	2.69	0.22	12.98	0.06	0.51	0.97	11.64

**Día 11**

Conc	3	113.2**	111.8**	135.2**	0.03**	0.002**	0.05**	0.002**	2.59**	0.009**	1261**	1.33**	0.06**	112.4**	0.003**	0.09**	29.0**	508**
Temp	1	7.68**	41.50**	9.00**	0.002**	0.005**	0.01**	4x10 <sup>-4**</sup>	0.08**	3x10 <sup>-4**</sup>	108.8**	0.77**	0.003**	31.71**	4x10 <sup>-4**</sup>	0.18**	1.24**	3.61**
C x T	3	1.51**	10.39**	0.17	2 x 10 <sup>-4</sup>	3x10 <sup>-4**</sup>	8x10 <sup>-4**</sup>	1x10 <sup>-5**</sup>	0.01**	6x10 <sup>-4**</sup>	6.59**	0.01**	0.003**	2.83**	6x10 <sup>-5**</sup>	0.003**	0.25**	1.21**
Error	16	0.07	0.04	0.06	9 x 10 <sup>-7</sup>	1 x 10 <sup>-6</sup>	2 x 10 <sup>-6</sup>	1 x 10 <sup>-6</sup>	0.004	1x 10 <sup>-6</sup>	0.42	6 x 10 <sup>-4</sup>	9 x 10 <sup>-5</sup>	0.07	3 x 10 <sup>-7</sup>	2 x 10 <sup>-5</sup>	0.01	0.03
Total	23																	
CV		0.73	0.75	0.22	0.28	0.66	0.26	1.61	1.14	0.43	1.36	0.92	4.4	1.79	0.91	0.93	5.33	1.63
Media		37.58	27.33	108.51	0.34	0.19	0.53	0.08	5.65	0.24	47.90	2.63	0.22	15.35	0.06	0.48	2.16	11.86

**Día 13**

Conc	3	176.2**	180.6**	174.5**	0.02**	0.002**	0.04**	0.002**	3.65**	0.008**	1009**	3.59**	0.07**	165.2**	0.003**	90.09**	41.7**	520**
Temp	2	15.64**	26.02**	14.75**	0.007**	0.004**	0.02**	4x10 <sup>-4**</sup>	0.77**	3x10 <sup>-4**</sup>	67.62**	0.99**	6 x 10 <sup>-5</sup>	37.82**	5x10 <sup>-4**</sup>	0.10**	1.11**	3.70**
C x T	6	1.08**	6.48**	1.18**	0.001**	8 x 10 <sup>-5</sup>	0.001**	1x10 <sup>-5**</sup>	0.10**	9x10 <sup>-4**</sup>	2.09**	0.22**	0.001**	1.78**	9x10 <sup>-5**</sup>	0.001**	0.01	1.21**
Error	24	0.05	0.06	0.05	2 x 10 <sup>-6</sup>	2 x 10 <sup>-6</sup>	4 x 10 <sup>-6</sup>	7 x 10 <sup>-7</sup>	0.01	4 x 10 <sup>-6</sup>	0.64	0.005	2 x 10 <sup>-4</sup>	0.08	9 x 10 <sup>-7</sup>	1 x 10 <sup>-5</sup>	0.01	0.03
Total	35																	
CV		0.61	0.88	0.21	0.47	0.93	0.40	1.18	1.84	0.90	2.00	2.73	7.37	1.61	1.53	0.67	4.88	1.53
Media		38.8	28.7	107.0	0.32	0.17	0.49	0.07	5.42	0.23	39.9	2.65	0.20	18.1	0.06	0.47	2.71	11.9

**Día 15**

Conc	3	256.7**	222.1**	227.9**	0.02**	0.002**	0.04**	0.002**	3.19**	0.008**	874.7**	4.87**	0.06**	190.5**	0.005**	0.12**	51.9**	526**
Temp	1	28.21**	19.45**	10.86**	0.01**	0.004**	0.04**	4x10 <sup>-4**</sup>	0.60**	2x10 <sup>-4**</sup>	91.17**	2.00**	0.01**	25.47**	2x10 <sup>-4**</sup>	0.20**	1.55**	4.65**
C x T	3	2.45**	2.43**	3.48**	7x10 <sup>-4**</sup>	1x10 <sup>-4**</sup>	6 x 10 <sup>-4</sup>	7 x 10 <sup>-6</sup>	0.07**	0.001**	0.93**	0.02**	9x10 <sup>-4**</sup>	0.03	1 x 10 <sup>-5</sup>	0.005**	0.05*	1.21**
Error	24	0.07	0.03	0.07	1 x 10 <sup>-6</sup>	1 x 10 <sup>-6</sup>	3 x 10 <sup>-6</sup>	1 x 10 <sup>-6</sup>	0.01	4 x 10 <sup>-7</sup>	0.21	0.001	6 x 10 <sup>-5</sup>	0.06	6 x 10 <sup>-7</sup>	7 x 10 <sup>-6</sup>	0.008	0.04
Total	35																	
CV		0.067	0.65	0.26	0.38	0.71	0.40	1.75	2.10	0.29	1.30	1.70	4.09	1.31	1.25	0.56	2.78	1.84
Media		40.2	29.9	105.4	0.29	0.16	0.46	0.06	5.14	0.23	35.4	2.62	0.19	20.0	0.06	0.49	3.30	12.0

FV: fuente de variación; GL grados libertad; CL: luminosidad; CC: croma; CH: Angulo hue; Chla: clorofila ; Chlb: clorofila b; Chlt: clorofila total; C: carotenos; SS: sólidos solubles; AT: acidez titulable; VC: vitamina; CA: capacidad antioxidante; F: fenoles; PP: pérdida de peso; CO<sub>2</sub>; ET: etileno; AC: Acetaldehído; ETA etanol. \*\* Significancia estadística con p= 0.05; CxT: concentración por temperatura.

**Cuadro 4A.** Diferencias entre temperaturas de las variables evaluadas en hojas de arúgula mínimamente procesada.

Temp	CL	CC	CH	Chl a mg/g	Chl b mg/g	Chl T mg/g	C mg/g	SS % Ácido cítrico	AT % Ácido cítrico	VC mg/g Ácido cítrico	CA mg/g	F mg/g Ácido tánico	PP %	CO2 %	ET μl Kg <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	AC mg/g	ETA mg/g	
<b>Día 3</b>																		
24	32.38a	23.25a	113.6b	0.40 c	0.20 c	0.60 c	0.11 c	6.50 c	0.25 a	60.35c	2.94 b	0.27 a	17.13a	0.09 a	0.66 a			
4	31.73b	22.60b	113.5b	0.42 b	0.22 b	0.64 b	0.12 b	6.87 b	0.25 b	69.09b	2.91 b	0.24 c	7.5 b	0.06 b	0.43 b			
0	31.18c	22.31c	114.6a	0.44 a	0.24 a	0.69 a	0.13 a	6.9 a	0.24 c	73.59a	3.0 a	0.26 b	5.4 c	0.05 c	0.34 c			
DMSH	0.234	0.228	0.287	0.002	0.003	0.004	0.001	0.074	0.002	1.18	0.025	0.002	0.41	0.0006	0.006			
<b>Día 5</b>																		
24	35.86a	28.5 a	107.3c	0.35 c	0.15 c	0.50 c	0.09 c	5.8 c	0.24 c	47.04c	2.83 b	0.22 b	34.5 a	0.11 a	0.73 a	1.25 a	16.9 a	
4	33.47b	24.0 b	112.3b	0.39 b	0.20 b	0.60 b	0.10 b	6.4 b	0.25 a	61.0 b	2.75 c	0.21 b	9.97 b	0.08 b	0.54 b	0.53 b	8.69 b	
0	32.37c	23.09c	113.1a	0.42 a	0.23 a	0.66 a	0.11 a	6.5 a	0.24 b	67.6 a	2.88 a	0.24 a	8.28 c	0.07 c	0.37 c	0.31 c	8.40 c	
DMSH	0.233	0.251	0.328	0.001	0.001	0.001	0.003	0.072	0.001	1.23	0.024	0.003	0.276	0.001	0.004	0.018	0.134	
<b>Día 7</b>																		
24	50.28a	39.06a	94.36c	0.24 c	0.13 c	0.37 c	0.07 c	5.11 c	0.23 b	32.17c	2.54 c	0.19 c	49.06a	0.12 a	0.83 a	1.44 a	18.03a	
4	35.28b	25.36b	110.9b	0.38 b	0.19 b	0.57 b	0.09 b	5.95 b	0.25 a	56.5 b	2.71 b	0.21 b	11.66b	0.07 b	0.61 b	0.74 b	11.98b	
0	33.95c	23.95c	111.8a	0.39 a	0.22 a	0.62 a	0.10 a	6.13 a	0.25 a	63.4 a	2.79 a	0.23 a	10.04c	0.05 c	0.40 c	0.39 c	10.92c	
DMSH	0.283	0.182	0.331	0.001	0.001	0.002	0.001	0.088	0.003	1.04	0.026	0.003	0.458	0.0006	0.015	0.028	0.180	
<b>Día 9</b>																		
4	35.76b	24.83b	109.46	0.35 b	0.18 b	0.54 b	0.08 b	5.75 b	0.24 b	50.99b	2.66 b	0.21 b	13.89a	0.05 b	0.63 a	1.32 a	12.07a	
0	36.85a	27.12 <sup>a</sup>	110.9a	0.37 a	0.21 a	0.59 a	0.09 a	5.93 a	0.25 a	55.36a	2.73 a	0.23 a	12.07b	0.06 a	0.39 b	0.61 b	11.20b	
DMSH	0.237	0.196	0.161	0.0009	0.0009	0.001	0.0007	0.091	0.001	0.701	0.015	0.002	0.236	0.0007	0.006	0.040	0.114	
<b>Día 11</b>																		
4	37.01b	26.01b	107.8b	0.33 b	0.17 b	0.51 b	0.07 b	5.59 b	0.24 b	45.77b	2.58 b	0.21 b	16.50a	0.06 b	0.57 a	2.38 a	12.25a	
0	38.14a	28.64 <sup>a</sup>	109.1a	0.35 a	0.20 a	0.56 a	0.08 a	5.70 a	0.24 a	50.03a	2.69 a	0.22 a	14.20b	0.05 a	0.40 b	1.93 b	11.47b	
DMSH	0.239	0.178	0.214	0.0009	0.001	0.001	0.001	0.055	0.0009	0.565	0.005	0.002	0.238	0.0005	0.004	0.099	0.168	
<b>Día 13</b>																		
4	38.03b	27.66b	106.2b	0.30 b	0.16 b	0.46 b	0.07 b	5.25 b	0.23 b	38.28b	2.59 b	0.20 a	19.39a	0.06 a	0.54 a	2.92 a	12.37a	
0	39.65a	29.74 <sup>a</sup>	107.7a	0.33 a	0.19 a	0.52 a	0.07 a	5.60 a	0.24 a	41.64a	2.70 a	0.20 a	16.88b	0.05 b	0.40 b	2.49 b	11.59b	
DMSH	0.205	0.219	0.198	0.001	0.001	0.001	0.0008	0.086	0.001	0.695	0.016	0.003	0.253	0.0008	0.002	0.114	0.158	
<b>Día 15</b>																		
4	41.33a	30.88a	104.74	0.26 b	0.15 b	0.41 b	0.06 b	4.98 b	0.23 a	33.52b	2.53 b	0.18 b	21.08a	0.06 a	0.59 a	3.55 a	12.50a	
0	39.16b	29.08b	106.0a	0.31 a	0.18 a	0.50 a	0.07 a	5.30 a	0.22 b	37.42a	0.270a	0.19 a	19.02b	0.05 b	0.40 b	3.04 b	11.62b	
DMSH	0.235	0.169	0.244	0.001	0.001	0.001	0.001	0.093	0.0006	0.400	0.010	0.001	0.224	0.0007	0.002	0.079	0.193	

Medias con la misma letra dentro de columnas no son diferentes (Tukey con  $P \leq 0.05$ ). DMSH: Diferencia mínima significativa honesta; CL: luminosidad; CC: croma; CH: Angulo hue; Chla: clorofila; Chlb: clorofila b; Chlt: clorofila total; C: carotenos; SS: sólidos solubles; AT: acidez titulable; VC: vitamina; CA: capacidad antioxidante; F: fenoles; PP: pérdida de peso; CO<sub>2</sub>; ET: etileno; AC: Acetaldehído; ETA etanol.

**Cuadro 5A.** Diferencias entre concentraciones de las variables evaluadas en hojas de arúgula mínimamente procesada.

Conc D1	CL	CC	CH	Chla mg/g	Chlb mg/g	ChIT mg/g	C mg/g	SS % Ácido cítrico	AT % Ácido cítrico	VC mg/g Ácido cítrico	CA mg/g	F mg/g Ácido tánico	PP %	C02 %	ET µl Kg <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	AC mg/g	ETA mg/g
<b>Día 3</b>																	
<b>Test</b>	30.20c	22.02c	113.01c	0.41 c	0.21 c	0.62 c	0.11 c	6.76 d	0.26 b	67.56c	2.87 c	0.23 c	10.64 b	0.08 b	0.53 b		
<b>0</b>	32.70a	23.99a	111.01d	0.35 d	0.20 d	0.55 d	0.10 d	6.35 c	0.27 a	59.09d	2.81 d	0.23 c	17.3 a	0.089a	0.62 a		
<b>50</b>	32.16b	22.67b	114.68b	0.45 b	0.22 b	0.67 b	0.12 b	6.9 b	0.23 d	70.19b	3.03 b	0.26 b	7.32 c	0.062c	0.41 c		
<b>100</b>	32.01b	22.20c	116.30a	0.47 a	0.24 4	0.72 a	0.14 a	7.0 a	0.24 c	73.87a	3.09 a	0.29 a	4.86 d	0.055d	0.34 d		
<b>DMSH</b>	0.299	0.291	0.366	0.002	0.003	0.0057	0.001	0.09	0.003	1.50	0.032	0.007	0.52	0.0008	0.008		
<b>Día 5</b>																	
<b>Test</b>	33.55b	25.61b	111.11c	0.36 c	0.18 c	0.55 c	0.10 c	6.11 c	0.25 b	59.25c	2.76 c	0.21 c	19.78b	0.10a	0.59 b	1.03 b	16.09b
<b>0</b>	35.86a	27.56a	105.39d	0.31 d	0.17 d	0.48 d	0.08 d	5.51 d	0.27 a	41.53d	2.69 d	0.19 d	27.89a	0.06 b	0.75 b	1.28 a	18.66a
<b>50</b>	33.41b	24.27c	112.68b	0.42 b	0.20 b	0.63 b	0.11 b	6.53 b	0.22 d	64.26b	2.86 b	0.23 b	13.42c	0.06 c	0.46 c	0.28 c	5.44 c
<b>100</b>	32.77c	23.40d	114.58a	0.45 a	0.22 a	0.68 a	0.12 a	6.81 a	0.23 c	69.22a	2.97 a	0.26 a	9.33 d	0.05 c	0.38 d	0.20 d	5.25 d
<b>DMSH</b>	0.298	0.320	0.418	0.002	0.002	0.0023	0.004	0.092	0.002	1.57	0.031	0.004	0.352	0.001	0.005	0.023	0.171
<b>Día 7</b>																	
<b>Test</b>	40.48b	30.41b	103.45c	0.32 c	0.17 c	0.50 c	0.08 c	5.57 c	0.25 b	51.62c	2.63 c	0.20 c	26.62b	0.09 b	0.67 b	1.20 b	18.06b
<b>0</b>	44.78a	34.51a	99.10 d	0.25 d	0.15 d	0.41 d	0.06 d	4.91 d	0.28 a	35.83d	2.55 d	0.18 d	34.24a	0.11 a	0.86 a	1.46 a	19.35a
<b>50</b>	38.12c	27.21c	108.10b	0.37 b	0.19 b	0.57 b	0.10 b	5.92 b	0.21 d	56.17b	2.74 b	0.22 b	19.31c	0.07 c	0.52 c	0.46 c	11.68c
<b>100</b>	35.97d	25.70d	112.22a	0.40 a	0.21 a	0.62 a	0.11 a	6.52 a	0.22 c	59.27a	2.81 a	0.25 a	14.14d	0.06 d	0.41 d	0.29 d	5.47 d
<b>DMSH</b>	0.362	0.233	0.423	0.002	0.001	0.0029	0.001	0.112	0.004	1.33	0.033	0.004	0.584	0.0008	0.020	0.036	0.230
<b>Día 9</b>																	
<b>Test</b>	36.07b	26.65b	108.75c	0.33 c	0.19 c	0.52 c	0.08 c	5.71 c	0.26 b	53.01c	2.63 c	0.20 c	13.92b	0.06 b	0.56 b	1.37 b	18.07b
<b>0</b>	71.71a	30.48a	105.55d	0.28 d	0.18 d	0.46 d	0.06 d	5.03 d	0.29 a	32.64d	2.55 d	0.19 d	17.35a	0.08 a	0.74 a	1.95 a	19.34a
<b>50</b>	34.34c	23.74c	111.95b	0.40 b	0.21 b	0.62 b	0.10 b	6.06 b	0.21 d	59.51b	2.72 b	0.24 b	11.61c	0.05 c	0.40 c	0.33 c	9.13 c
<b>100</b>	33.10d	24.04d	114.47a	0.43 a	0.22 a	0.66 a	0.11 a	6.56 a	0.22 c	67.54a	2.87 a	0.26 a	9.04 d	0.04 d	0.34 d	0.21 d	0.00 d
<b>DMSH</b>	0.453	0.374	0.308	0.001	0.001	0.002	0.001	0.175	0.002	1.33	0.027	0.004	0.451	0.001	0.012	0.076	0.217
<b>Día 11</b>																	
<b>Test</b>	38.09b	28.87b	106.43c	0.30 d	0.18 c	0.48 c	0.07 c	5.31 c	0.26 b	47.80c	2.56 c	0.20 c	17.13b	0.06 b	0.53 b	2.90 b	18.34b
<b>0</b>	43.45a	32.71a	102.99d	0.26 d	0.17 d	0.43 d	0.05 d	4.91 d	0.28 a	27.92d	2.49 d	0.18 d	20.39a	0.09 a	0.63 a	4.94 a	19.91a
<b>50</b>	35.28c	24.43c	110.89b	0.39 b	0.19 b	0.59 b	0.09 b	5.98 b	0.20 d	54.07b	2.68 b	0.23 b	13.44c	0.05 c	0.42 c	0.51 c	9.21 c
<b>100</b>	33.50d	23.30d	113.72a	0.42 a	0.22 a	0.64 a	0.10 a	6.38 a	0.22 c	61.81a	2.80 a	0.26 a	10.46d	0.04 d	0.35 d	0.28 d	0.00 d
<b>DMSH</b>	0.456	0.340	0.408	0.001	0.002	0.0024	0.002	0.106	0.001	1.07	0.010	0.004	0.454	0.0009	0.007	0.190	0.320
<b>Día 13</b>																	
<b>Test</b>	39.62b	31.42b	103.99c	0.28 c	0.16 c	0.48 c	0.06 c	5.18 c	0.25 b	39.84c	2.58 c	0.19 c	20.34b	0.06 b	0.52 b	3.56 b	18.66b
<b>0</b>	46.09a	35.08a	101.12d	0.24 d	0.15 d	0.39 d	0.05 d	4.46 d	0.27 a	22.46d	2.36 d	0.16 d	24.30a	0.09 a	0.92 a	6.06 a	20.00a
<b>50</b>	36.00c	24.85c	110.03b	0.34 b	0.18 b	0.53 b	0.08 b	5.80 b	0.19 d	44.41b	2.77 b	0.21 b	15.48c	0.04 c	0.41 c	0.76 c	9.26 c
<b>100</b>	33.66d	23.46d	112.87a	0.40 a	0.20 a	0.60 a	0.09 a	6.26 a	0.21 c	53.43a	2.87 a	0.24 a	12.42d	0.04 d	0.33 d	0.48 d	0.00 d

<b>DMSH</b>	0.392	0.418	0.379	0.002	0.002	0.0033	0.001	0.165	0.003	1.32	0.031	0.005	0.484	0.001	0.005	0.219	0.303
<b>Día 15</b>																	
<b>Test</b>	40.97b	33.29b	102.11c	0.26 c	0.15 c	0.42 c	0.05 b	4.95 c	0.24 b	34.57c	2.49 c	0.17 c	22.38b	0.06 b	0.55 b	5.03 b	18,95b
<b>0</b>	49.09a	36.75a	98.54 d	0.21 d	0.14 d	0.36 d	0.04 d	4.21 d	0.27 a	19.51d	2.32 d	0.15 d	26.57a	0.10 a	0.67 a	6.55 a	19.98a
<b>50</b>	36.87c	26.23c	109.1 b	0.32 b	0.17 b	0.50 b	0.07 b	5.50 b	0.19 d	39.44b	2.78 b	0.20 b	17.62c	0.04 c	0.42 c	0.93 c	9.33 c
<b>100</b>	34.06d	23.64d	111.90a	0.36 a	0.19 a	0.55 a	0.08 a	5.9 a	0.20 c	48.36a	2.89 a	0.22 a	13.61d	0.03 d	0.33 d	0.69 d	0.00 d
<b>DMSH</b>	0.449	0.324	0.466	0.001	0.002	0.003	0.001	0.178	0.001	0.763	0.019	0.003	0.435	0.001	0.004	0.151	0.368

Medias con la misma letra dentro de columnas no son diferentes (Tukey con  $P \leq 0.05$ ). DMSH: Diferencia mínima significativa honesta; CL: luminosidad; CC: croma; CH: Angulo hue; Chla: clorofila; Chlb: clorofila b; Chlt: clorofila total; C: carotenos; SS: sólidos solubles; AT: acidez titulable; VC: vitamina; CA: capacidad antioxidante; F: fenoles; PP: pérdida de peso; CO<sub>2</sub>; ET: etileno; AC: Acetaldehído; ETA etanol.

**Cuadro 6A.** Comparaciones entre temperatura y concentraciones evaluadas de obtenidos de hojas de Arúgula mínimamente procesada a tres temperaturas ( 4, 0 y 22 °C)

Temp	Conc	CL	CC	CH	Chl T mg/g	C mg/g	SS % Ácido cítrico	AT % Ácido cítrico	VC mg/g Ácido cítrico	CA mg/g	F mg/g Ácido tánico	PP %	CO2 %	ET µl Kg <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	AC mg/g	ETA mg/g
<b>Día 3</b>																
24	Test	31.58 c	22.37 a	113.63 b	0.58 c	0.10 c	6.50 b	0.27 c	60.72 b	2.83bc	0.27bc	16.70c	0.11 c	0.76 c		
24	0	33.26 a	25.21 c	110.23 c	0.50 d	0.09 d	5.70 c	0.28 d	53.90 c	2.79 c	0.26 c	33.26d	0.12 d	0.85 d		
24	50	32.26 bc	23.34 b	114.23 b	0.64 b	0.12 b	6.83 a	0.22 a	61.03 a	2.98ab	0.27 b	11.42b	0.08 b	0.55 b		
24	100	32.45 b	22.10 a	116.57 b	0.68 a	0.14 a	7.00 a	0.24 b	65.78 b	3.05 a	0.28 a	7.16 a	0.07 a	0.49 a		
4	Test	28.53 c	21.12 c	113.47 b	0.62 c	0.11 c	6.77 a	0.26 b	67.72 b	2.90bc	0.22bc	8.85 c	0.06 c	0.48 c		
4	0	33.60 a	23.48 a	110.47 c	0.56 d	0.10 d	6.63 b	0.27 c	61.26 c	2.80 c	0.21 c	10.24d	0.07 d	0.57 d		
4	50	32.35 b	22.35 b	114.28 b	0.66 b	0.13 b	7.00 a	0.23 a	71.32 a	3.00ab	0.23 b	6.32 b	0.05 b	0.38 b		
4	100	32.47 b	22.32 b	115.87 a	0.72 a	0.14 a	7.10 a	0.23 b	76.08 a	3.08 a	0.28 a	4.87 a	0.04 a	0.29 a		
0	Test	30.50 c	22.59 a	114.43 c	0.67 c	0.12 c	7.03bc	0.24 c	74.27 c	2.90 b	0.22 c	6.38 c	0.06 c	0.35 c		
0	0	31.25 ab	23.30 b	112.34 d	0.60 d	0.10 d	6.73 c	0.25 b	62.11 d	2.86 b	0.21 c	8.43 d	0.07 d	0.45 d		
0	50	31.89 a	22.35 a	115.53 b	0.72 b	0.13 b	7.07ab	0.23 a	78.24 a	3.12 a	0.28 b	4.23 b	0.04 b	0.30 b		
0	100	31.12 bc	22.19 a	116.49 a	0.76 a	0.14 a	7.13 a	0.24 b	79.78 b	3.16 a	0.32 a	2.57 a	0.04 a	0.25 a		
<b>DMSH</b>		0.745	0.461	0.913	0.014	0.004	0.236	0.007	3.74	0.171	0.013	1.29	0.001	0.022		

Día 5																
24	Test	36.67 c	30.56c	108.52 c	0.45 c	0.09 c	5.60 c	0.25 c	43.58 c	2.79bc	0.21 c	39.48c	0.12 c	0.80 c	0.26 c	17.49 c
24	0	38.44 d	31.64 d	97.96 d	0.38 d	0.06 d	5.07 d	0.27 d	35.31 d	2.69 c	0.19 d	59.40d	0.13 d	0.95 d	0.33 d	18.39 d
24	50	34.69 b	26.72 b	110.25 b	0.56 b	0.10 b	6.03 b	0.21 a	50.33 b	2.89 b	0.23 b	24.13b	0.10 b	0.62 b	0.13 b	16.33 d
24	100	33.66 c	25.39 a	112.61 a	0.61 a	0.12 a	6.50 a	0.23 b	58.98 a	2.97 a	0.25 a	15.37a	0.08 a	0.54 a	0.10 a	15.76 a
4	Test	32.38 a	23.46 a	112.23 c	0.57 c	0.10 c	6.30 c	0.25 c	63.47 b	2.71bc	0.21 c	10.80c	0.07 c	0.57 c	1.63 b	15.73 b
4	0	35.40 b	26.56 c	108.73 d	0.49 d	0.08 d	5.70 d	0.29 d	42.90 c	2.61 c	0.18 d	12.85d	0.08 d	0.80 d	2.00 c	19.06 c
4	50	33.40 a	23.46 a	113.37 b	0.64 b	0.11 b	6.70 b	0.22 a	67.36 a	2.81 b	0.22 b	8.93 b	0.05 b	0.44 b	0.00 a	0.00 a
4	100	32.74 a	22.53 a	115.05 a	0.70 a	0.12 a	6.93 a	0.23 b	70.38 a	2.90 a	0.25 a	7.30 a	0.04 a	0.34 a	0.00 a	0.00 a
0	Test	31.61 a	22.83 b	112.58 c	0.64 c	0.10 c	6.43 c	0.25 c	70.71 b	2.81bc	0.22 c	9.12 c	0.06 c	0.40 c	0.47 b	15.07 b
0	0	33.76 c	24.49 c	109.48 d	0.57 d	0.09 d	5.77 d	0.26 d	46.39 c	2.77 c	0.19 d	11.45d	0.07 d	0.50 d	0.79 c	18.56 c
0	50	32.21 b	22.66 b	114.45 b	0.69 b	0.12 b	6.87 b	0.22 a	75.10 a	2.90 b	0.24 b	7.20 b	0.04 b	0.32 b	0.00 a	0.00 a
0	100	31.93 ab	22.40 a	116.09 a	0.73 a	0.13 a	7.00 a	0.23 b	78.33 a	3.06 a	0.30 a	5.35 a	0.04 a	0.27 a	0.00 a	0.00 a
DMSH		0.743	0.798	1.042	0.005	0.003	0.229	0.005	3.91	0.111	0.010	0.877	0.003	0.015	0.058	0.42
Día 7																
24	Test	53.45 c	41.25 c	89.51 c	0.35 c	0.07 c	4.83 c	0.24 c	30.09 b	2.49 b	0.18 c	57.06c	0.13 c	0.91 c	0.36 c	18.68 c
24	0	58.06 d	48.55 d	83.37 d	0.22 d	0.05 d	4.33 d	0.26 d	28.17 b	2.40 b	0.17 d	73.66d	0.15 d	1.10 d	0.62 d	19.98 d
24	50	47.35 b	34.77 b	98.41 b	0.42 b	0.09 b	5.23 b	0.20 a	34.15 a	2.63 a	0.20 b	38.37b	0.11 b	0.71 b	0.27 b	17.04 b
24	100	42.28 a	31.69 a	106.15 a	0.50 a	0.10 a	6.07 a	0.21 b	36.29 a	2.66 a	0.22 a	27.16 <sup>a</sup>	0.09 a	0.59 a	0.16 a	16.43 a
4	Test	34.80 b	25.66 c	110.32 c	0.53 c	0.08 c	5.73 c	0.26 c	59.25 c	2.65bc	0.20 c	12.31c	0.07 c	0.65 c	1.70 c	18.71 c
4	0	38.54 c	29.15 d	106.37 d	0.48 d	0.07 d	5.17 d	0.30 d	34.57 d	2.59 c	0.19 d	15.25d	0.09 d	0.95 d	2.24 d	19.32 d
4	50	34.42 b	23.87 b	112.39 b	0.62 b	0.10 b	6.20 b	0.21 a	63.87 b	2.78ab	0.22 b	10.46b	0.05 b	0.50 b	0.23 b	9.91 b
4	100	33.38 a	22.79 a	114.77 c	0.67 a	0.11 a	6.70 a	0.22 b	68.69 a	2.86 a	0.24 a	8.63 a	0.04 a	0.35 a	0.00 a	0.00 a
0	Test	33.22 b	24.34 b	110.53 c	0.61 c	0.09 c	6.17 c	0.26 c	65.54 c	2.77bc	0.20 c	10.62c	0.06 c	0.43 c	0.55 c	16.80 c
0	0	37.74 c	25.85 c	107.57 d	0.53 d	0.07 d	5.23 d	0.28 d	44.78 d	2.66 c	0.20 d	13.82d	0.09 d	0.54 d	0.87 d	18.78 d
0	50	32.60 ab	23.00 a	113.50 b	0.66 b	0.11 b	6.33 b	0.22 a	70.50 b	2.83ab	0.24 b	9.11 b	0.04 b	0.35 b	0.16 b	8.11 b
0	100	32.25 a	22.63 a	115.76 a	0.70 a	0.12 a	6.80 a	0.23 b	72.83 a	2.92 a	0.29 a	6.64 a	0.04 a	0.28 a	0.00 a	0.00 a
DMSH		0.902	0.581	1.054	0.007	0.003	0.281	0.0108	3.32	0.134	0.010	1.45	0.002	0.050	0.090	0.57
Día 9																
4	Test	36.78 c	28.47 c	108.23 c	0.48 c	0.07 c	5.57 c	0.27 b	51.40 c	2.61 c	0.20 c	14.26c	0.06 c	0.66 c	1.90 c	18.63 c
4	0	41.67 d	32.43 d	104.45 d	0.43 d	0.06 d	4.97 d	0.30 b	29.24 d	2.51 d	0.19 d	18.95d	0.09 d	0.99 d	2.75 d	19.59 d
4	50	35.25 b	24.31 b	111.27 b	0.61 b	0.10 b	6.03 b	0.20 a	56.84 b	2.70 b	0.23 b	12.42b	0.05 b	0.48 b	0.42 b	10.09 b
4	100	33.70 a	23.28 a	113.89 a	0.64 a	0.11 a	6.47 a	0.22 a	66.51 a	2.84 a	0.25 a	9.96 a	0.04 a	0.40 a	0.24 a	0.00 a
0	Test	35.37 c	24.84 b	109.28 c	0.56c	0.08 c	5.87 b	0.26bc	54.63 c	2.67 c	0.20 c	13.58c	0.06 c	0.45 c	0.85 c	17.53 c
0	0	41.75 d	28.53 c	106.67 d	0.49d	0.07 d	5.10 c	0.28 c	36.06 d	2.60 d	0.19 d	15.77d	0.08 d	0.50 d	1.16 d	19.11 d
0	50	33.44 b	23.17 a	112.63 b	0.63b	0.10 b	6.10 b	0.21ab	62.19 b	2.75 b	0.25 b	10.80b	0.05 b	0.32 b	0.25 b	8.19 b
0	100	32.51 a	22.80 a	115.07 a	0.67 <sup>a</sup>	0.11 a	6.67 a	0.23 a	68.58 a	2.90 a	0.27 a	8.14 a	0.04 a	0.28 a	0.19 a	0.00 a
DMSH		0.811	0.671	0.552	0.003	0.002	0.314	0.003	2.39	0.067	0.006	0.808	0.002	0.021	0.13	0.39
Día 11																
4	Test	38.43 c	30.63c	105.57 c	0.44 c	0.06 c	5.30 c	0.27 c	46.38 c	2.53 c	0.19 c	17.50c	0.06 c	0.62 c	3.44 c	18.94 c
4	0	43.48 d	35.69 d	102.48 d	0.40 d	0.05 d	4.83 d	0.30 d	24.95 d	2.43 d	0.18 d	22.44d	0.10 d	0.75 d	5.08 d	19.94 d

4	50	36.48 b	24.57 b	110.31 b	0.57 b	0.08 b	5.97 b	0.19 a	50.99 b	2.62 b	0.23 b	14.60b	0.05 b	0.50 b	0.68 b	10.14 b
4	100	34.20 a	23.70 a	113.23 a	0.63 a	0.10 a	6.27 a	0.21 b	60.78 a	2.77 a	0.24 a	11.50 <sup>a</sup>	0.04 a	0.42 a	0.36 a	0.00 a
0	Test	37.75 c	27.12 c	107.30 c	0.52 c	0.07 c	5.33 c	0.25 c	49.23 c	2.61 c	0.20 c	16.77c	0.06 c	0.45 c	2.37 c	17.75 c
0	0	43.42 d	29.73 d	103.50 d	0.46 d	0.06 d	5.00 d	0.27 d	30.89 d	2.56 d	0.19 d	18.36d	0.08 d	0.51 d	4.80 d	19.88 d
0	50	34.08 b	24.30 b	111.47 b	0.61 b	0.09 b	6.00 b	0.20 a	57.16 b	2.75 b	0.22 b	12.29b	0.04 b	0.35 b	0.35 b	8.29 b
0	100	32.81 a	22.91 a	114.22 a	0.65 a	0.10 a	6.50 a	0.22 b	62.85 a	2.85 a	0.27 a	9.42 a	0.03 a	0.28 a	0.21 a	0.00 a
DMSH		0.817	0.661	0.732	0.004	0.003	0.191	0.003	1.93	0.063	0.010	0.814	0.001	0.014	0.34	0.57
Día 13																
4	Test	40.42 c	32.42 c	102.57 c	0.40 c	0.06 c	5.13 c	0.27 c	38.94 c	2.56 c	0.19 c	21.17c	0.06 c	0.60 c	3.82 c	19.25 c
4	0	46.43 d	37.61 d	100.44 d	0.37 d	0.04 d	4.10 d	0.29 d	20.29 d	2.23 d	0.18 d	26.36d	0.10 d	0.70 d	6.28 d	20.06 d
4	50	37.37 b	25.10 b	109.39 b	0.49 b	0.08 b	5.63 b	0.18 a	42.02 b	2.74 b	0.23 b	16.56b	0.05 b	0.48 b	0.98 b	10.21 b
4	100	34.39 a	23.87 a	112.47 a	0.59 a	0.09 a	6.13 a	0.21 b	51.90 a	2.84 a	0.24 a	13.50 <sup>a</sup>	0.04 a	0.38 a	0.64 a	0.00 a
0	Test	38.82 c	30.43 c	105.41 c	0.50 c	0.07 c	5.23 c	0.24 c	40.75 c	2.61 c	0.20 c	19.53c	0.05 c	0.45 c	3.32 c	18.08 c
0	0	45.76 d	32.56 d	101.80 d	0.42 d	0.05 d	4.83 d	0.26 d	24.64 d	2.51 d	0.19 d	22.25d	0.08 d	0.53 d	5.85 d	19.96 d
0	50	34.64 b	24.61 b	110.67 b	0.56 b	0.09 b	5.97 b	0.20 a	46.22 b	2.80 b	0.22 b	14.41b	0.04 b	0.35 b	0.49 b	8.33 b
0	100	32.94 a	23.07 a	113.27 a	0.62 a	0.10 a	6.40 a	0.22 b	54.97 a	2.91 a	0.27 a	11.35 <sup>a</sup>	0.03 a	0.29 a	0.32 a	0.00 a
DMSH		0.702	0.749	0.638	0.005	0.002	0.296	0.006	2.37	0.041	0.010	0.867	0.002	0.010	0.39	0.54
Día 15																
4	Test	42.47 c	34.13 c	100.42 c	0.37 c	0.05 c	4.83 c	0.26 c	32.37 c	2.40 c	0.16 c	23.32c	0.06 c	0.649c	5.17 c	19.61 c
4	0	49.30 d	38.56 d	98.60 d	0.33 d	0.03 d	3.90 d	0.28 d	17.21 d	2.22 d	0.15 d	27.67d	0.11 d	0.807d	6.77 d	20.06 d
4	50	38.49 b	26.84 b	108.82 b	0.45 b	0.07 b	5.43 b	0.18 a	37.59 b	2.72 b	0.18 b	18.74b	0.05 b	0.503b	1.29 b	10.21 b
4	100	35.09 a	24.00 a	111.15 a	0.51 a	0.08 a	5.77 a	0.20 b	46.93 a	2.82 a	0.22 a	14.60a	0.04 a	0.406a	1.00 a	0.00 a
0	Test	39.49 c	32.47 c	103.82 c	0.47 c	0.06 c	5.07 c	0.23 c	36.78 c	2.58 c	0.17 c	21.44c	0.05 c	0.454c	4.89 c	18.08 c
0	0	48.89 d	34.94 d	98.48 d	0.38 d	0.04 d	4.53 d	0.26 d	21.83 d	2.43 d	0.16 d	25.49d	0.10 d	0.544d	6.33 d	19.96 d
0	50	35.26 b	25.63 b	109.40 b	0.54 b	0.08 b	5.57 b	0.20 a	41.30 b	2.85 b	0.21 b	16.52b	0.04 b	0.352b	0.58 b	8.33 b
0	100	33.04 a	23.28 a	112.67 a	0.60 a	0.09 a	6.03 a	0.21 b	49.80 a	2.96 a	0.23 a	12.63a	0.03 a	0.274a	0.39 a	0.00 a
DMSH		0.805	0.580	0.835	0.005	0.003	0.319	0.002	1.36	0.058	0.012	0.778	0.002	0.008	0.27	0.65

Medias con la misma letra dentro de columnas, no son diferentes Tukey con  $P \leq 0.05$ . DMSH: Diferencia mínima significativa honesta. FV: fuente de variación, CL: luminosidad, CC: croma, CH. Hue, Chl a: clorofila a, Chl b: clorofila b, Chl T: clorofila total, C: carotenos, SS: sólidos solubles, AT: acidez titulable, VC: vitamina, CA: capacidad antioxidante, C: fenoles, PP: pérdida de peso, CO<sub>2</sub>, ET: etileno, AC: Acetaldehído, ETA etanol.