



# **COLEGIO DE POSTGRADUADOS**

**INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS**

**CAMPUS MONTECILLO**

**POSTGRADO EN RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD-FISIOLOGÍA VEGETAL**

**INCIDENCIA DE ENFERMEDADES CALIDAD POSTCOSECHA Y  
CONTENIDO DE GLUCOSINOLATOS EN BRÓCOLI**

**Francisco Marcelo Lara Viveros**

**T E S I S**

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

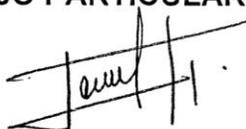
**DOCTOR EN CIENCIAS**

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

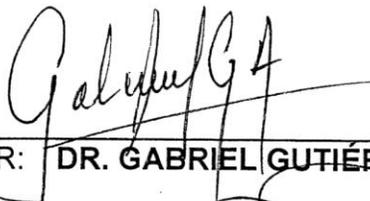
La presente tesis titulada: **Incidencia de enfermedades calidad postcosecha y contenido de glucosinolatos en brócoli**, realizada por el alumno **Francisco Marcelo Lara Viveros**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para la obtención del grado de:

**DOCTOR EN CIENCIAS**  
**RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD-FISIOLOGÍA VEGETAL**

**CONSEJO PARTICULAR**



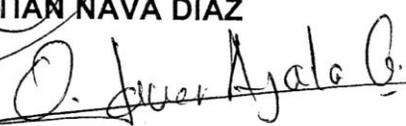
\_\_\_\_\_  
CONSEJERO: **DR. DANIEL NIETO ANGEL**



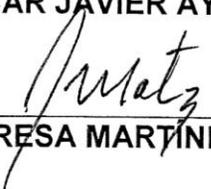
\_\_\_\_\_  
ASESOR: **DR. GABRIEL GUTIÉRREZ ALONSO**



\_\_\_\_\_  
ASESOR: **DR. CRISTIAN NAVA DÍAZ**



\_\_\_\_\_  
ASESOR: **DR. OSCAR JAVIER AYALA GARAY**



\_\_\_\_\_  
ASESOR: **DRA. TERESA MARTÍNEZ DAMIÁN**

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Diciembre del 2010.

Para Nadia. Mi amada esposa, por que compartir el tiempo contigo es lo mejor que me ha pasado en la vida. Por ensañarme en la luz de tus ojos el verdadero significado de la palabra amor. Por tu apoyo en todo momento, por tus palabras y presencia que llenan mi alma.

Con amor y admiración para ti.

## **Dedicatorias:**

**A mi Padre.** (QEPD). Por tener la fortaleza para afrontar los problemas con una sonrisa. Por enseñarme con tu ejemplo que la vida es algo a lo que vale la pena aferrarse y que la paciencia no es una virtud, sino una condición de aquel que no espera nada porque todo lo tiene.

**A mi Madre.** Porque con amor y esfuerzo nos supo mostrar el camino correcto. Por la increíble fortaleza para afrontar los momentos difíciles y cuidar de mí y mis hermanos. Para ti, con amor, agradecimiento y admiración.

**A mi Hermana.** Por enseñarme con tu ejemplo, que en esta vida ningún obstáculo es suficientemente grande como para no superarlo, por tu apoyo incondicional en momentos críticos. Si hay alguien que puede ejemplificar la fortaleza y servir de inspiración para un trabajo como este, sin duda eres tú.

**A mi Hermano.** Por tu apoyo en todo momento, por mantener la fuerza en la familia, por tener pese a todo, tu vista en las metas más altas, lo cual para mí siempre ha sido un ejemplo a seguir.

**A Víctor y Nancy.** Para ustedes el cielo es el límite.

Por todos ustedes insisto: Si he llegado a ver más lejos, es porque estoy en hombros de gigantes.

**Al Doctor Daniel Nieto:** Por su apoyo, sin el cual la realización de un proyecto como este no hubiera sido posible. Por sus enseñanzas y sobre todo. Porque una de las cosas que me llevo del Colegio de Postgraduados es su amistad, la cual agradezco.

**Miembros de mi comité particular.** Porque cada uno de ustedes aportaron sus conocimientos y experiencias en sus respectivas áreas, sin lo cual hubiera sido imposible la realización de este trabajo.

**A los compañeros y amigos del Colegio de Postgraduados.** Porque de alguna u otra manera contribuyeron al aprendizaje dentro de la institución y por las innumerables anécdotas que sin duda serán recordadas por todos nosotros mucho tiempo después.

*Yo creo no haber sido más que un niño que juega en la playa  
y que se divierte encontrando a las veces una piedra más lisa  
que otra, o una concha más bella que la anterior, mientras el  
inmenso océano de la verdad se extiende desconocido ante mí.*

*Isaac Newton 1642-1727.*

## Índice

1. Capítulo I. Revisión de Literatura .....	1
1.1. Antecedentes históricos .....	1
1.2. Síntesis de metabolitos secundarios .....	2
1.3. Glucosinolatos .....	3
1.4. Síntesis.....	4
1.5. Función fisiológica de los glucosinolatos en las plantas .....	4
1.6. Efecto en el ser humano.....	5
1.8. Degradación de los glucosinolatos durante el procesamiento del brócoli.....	7
2. Capítulo II. Cromatografía en capa fina acoplada densitometría para la cuantificación y aislamiento de glucorafano en extracto crudo de brócoli ( <i>Brassica oleracea L.</i> ) .....	9
2.1 Resumen .....	9
2.2. Introducción.....	10
2.3. Materiales y métodos.....	11
2.3.1. Cuantificación de glucorafano.....	11
2.3.1.2. Reactivos y materiales .....	11
2.3.1.3. Preparación de las muestras.....	11
2.3.1.4. Método de cromatografía en capa fina .....	12
2.3.1.5. Análisis por densitometría.....	12
2.4. Aislamiento de glucorafano.....	13
2.4.1. Reactivos y materiales.....	13
2.4.2. Preparación de las muestras.....	14
2.5. Resultados y discusión .....	15
2.5.1. Desarrollo de las placas de cromatografía para la determinación de la concentración de glucorafano .....	15
3. Capítulo III. Efecto de tratamientos de precocción sobre color, textura y contenido de glucorafano en brócoli. ....	21
3.1. Resumen .....	21
3.1.2. Tratamientos .....	24
3.1.3. Análisis estadísticos.....	26
3.1.3. Variables analizadas .....	25

3.2. Introducción.....	22
3.3. Materiales y Métodos .....	24
3.3.1. Material vegetal .....	24
3.4. Resultados y discusión .....	27
3.4.1. Color .....	27
3.4.2. Textura.....	29
3.4.3. Contenido de Glucorafano.....	31
3.5. Conclusiones.....	34
4. Capítulo IV. Efecto del glucorafano aislado de floretes de brócoli ( <i>Brassica oleracea</i> ) sobre la germinación de esporas de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> . .....	35
4.1. Resumen .....	35
4.2. Introducción.....	36
4.3. Materiales y métodos.....	37
4.3.1. Aislamiento y pruebas de patogenicidad.....	37
4.3.2. Aislamiento de Glucorafano.....	38
4.3.2.1. Material Vegetal .....	38
4.3.2.2. Procesamiento del material vegetal .....	38
4.3.2.3. Separación y aislamiento del glucorafano .....	38
4.3.2.4. Método para determinar la concentración del glucorafano aislado.....	39
4.3.3. Evaluación del efecto del glucorafano sobre la germinación de esporas de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> .....	40
4.3.3.1. Bioensayos.....	40
4.3.3.2. Variables y análisis estadísticos.....	41
4.4. Resultados y discusión .....	41
4.5. Conclusiones.....	45
5. Bibliografía Citada .....	46

## Índice de Cuadros.

Cuadro 1. Tratamientos de temperatura y tiempo de exposición en floretes de brócoli. ....	24
Cuadro 2. Valores promedio del parámetro <i>a</i> del sistema de colores Hunter Lab, obtenidos de floretes de brócoli, sometidos a varios métodos de cocción.....	27
Cuadro 3. Efecto de diferentes tratamientos térmicos sobre la textura de floretes de Brócoli..	30
Cuadro 4. Efecto de diferentes tratamientos térmicos sobre la textura de floretes de Brócoli..	31
Cuadro 5. Concentraciones de glucorafano utilizadas para determinar el efecto de esta molécula sobre la germinación de esporas de <i>C.gloeosporioides</i> . ....	40
Cuadro 6. Germinación de esporas de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> en diferentes concentraciones de glucorafano aislado de brócoli. ....	42

## Índice de Figuras

Figura 1. Papel de la respiración en la síntesis de metabolitos secundarios (Hopkins, 1999). ...	2
Figura 2. Estructura química de la molécula de glucorafano (Aldrich, 2008). .....	7
Figura 3. a) Imagen de las placas de sílica gel donde se observa bandas de glucorafano con luz U.V a 256 nm. Los recuadros muestran concentraciones decrecientes de derecha a izquierda. b) Imagen de placas de cromatografía con extracto crudo de Brócoli observadas a la misma longitud de onda. ....	15
Figura 4. Comportamiento del glucorafano en cromatografía en capa fina- densitometría. ....	16
Figura 5. Modelo de regresión ajustado para determinar la concentración de glucorafano por medio de cromatografía en capa fina- densitometría.....	17
Figura 6. Grafico de regresión para determinar la concentración y pureza de glucorafano aislado a partir de extracto crudo de brócoli.....	19
Figura 7 Efecto de la temperatura de cocción sobre el parámetro $a$ . Donde; $y$ = Valor del parámetro $a$ del sistema Hunter Lab; $x$ = Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ). **Diferente de cero a una probabilidad de 0.01. ** $P \leq 0.01$ .....	29
Figura 8. Relación entre textura y contenido de glucorafano.....	33
Figura 9. Efecto de diferentes concentraciones de glucorafano aislado de brócoli sobre la germinación de esporas de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> aislados de frutos de mango. ....	43
Figura 10. Curvas de germinación de esporas de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> a través del tiempo. ABC=Area bajo la curva de germinación de esporas.....	44
Figura 11. Modelo de regresión lineal para estimar la efectividad del glucorafano en contra de esporas de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> .....	45

## **1. Capítulo I. Revisión de Literatura**

### **1.1. Antecedentes históricos**

Todas las células contienen azúcares, fosfatos y aminoácidos, estas moléculas reciben el nombre de metabolitos primarios, sin embargo muchas plantas sintetizan una amplia variedad de compuestos que no pueden ser nombrados como metabolitos primarios puesto que no tienen un papel evidente en el funcionamiento de la célula, estas moléculas son conocidas como metabolitos secundarios. Este término se refiere a una gran variedad de compuestos que se encuentran generalmente en muy bajas concentraciones en las plantas y algunos de ellos pueden estar limitados a unas cuantas familias de plantas (Hopkins, 1999).

El término de metabolito secundario fue inicialmente usado por Bonner (1950), esta publicación fue una de las primeras en las que se sugiere que las moléculas sintetizadas por las plantas sean clasificadas, sin embargo no se propone una definición válida para la gran variedad de compuestos sintetizados. En los inicios de la fisiología vegetal el estudio de los metabolitos secundarios era considerado como una ciencia experimental. Inicialmente se pensaba que los productos secundarios de las plantas eran compuestos que se utilizaban únicamente como productos de reserva y que no eran necesarios para mantener la vida. Los trabajos de Mothies (1979) afirmaban que muchos de estos compuestos, solo tenían un papel ecológico y no podían ser utilizados como moléculas de reserva de la célula, gracias a lo cual el estudio de los metabolitos secundarios y su papel en la relación de la planta con el medio ambiente fue adquiriendo importancia.

Durante los años siguientes se descubrieron muchos compuestos considerados como metabolitos secundarios en cada vez un mayor número y especies de plantas. Sin embargo fue hasta finales de 1950, cuando el interés en los productos naturales se incrementó, en parte por el descubrimiento de las hormonas vegetales, que enfatizó la estrecha relación entre estas y los metabolitos secundarios. Conforme los métodos de separación y purificación se desarrollaron creció el interés de la industria farmacéutica por muchos de estos compuestos (Mothies, 1979). Aun hoy en día la distinción entre metabolismo primario y secundario no siempre es fácil, en el sentido estricto de la palabra, los metabolitos secundarios no forman parte de la estructura básica de la célula. Los metabolitos secundarios solo se encuentran en determinados órganos o en determinadas etapas de desarrollo, aunque este criterio no satisface la gran variedad de

compuestos que las plantas pueden sintetizar, puede utilizarse como punto de partida en la clasificación de los metabolitos de las plantas.

Los metabolitos secundarios han sido utilizados y estudiados por siglos debido a las propiedades medicinales y por consiguiente su valor económico (Hopkins, 1999).

## 1.2. Síntesis de metabolitos secundarios

Además de proporcionar energía en forma de ATP, la respiración celular provee de esqueletos de carbón que se requieren para la síntesis de otros compuestos. Muchos de estos compuestos son formados en intermediarios de la glicolisis y el ciclo del ácido cítrico (Figura 1).

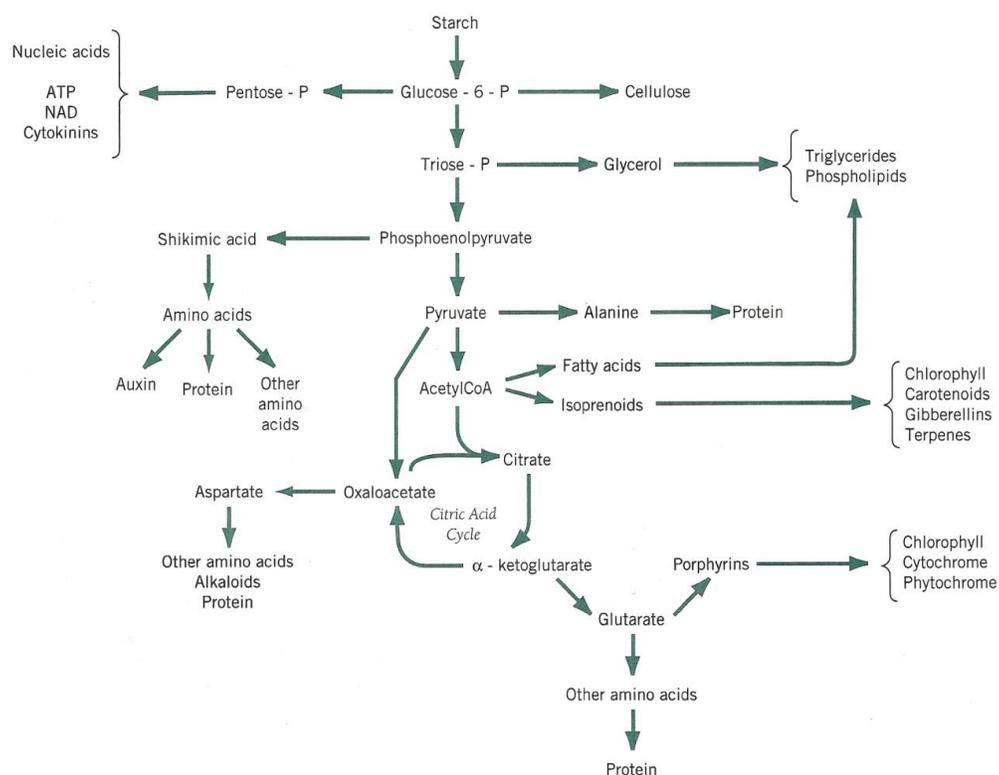


Figura 1. Papel de la respiración en la síntesis de metabolitos secundarios (Hopkins, 1999).

Uno de los principales bloques de construcción de los metabolitos secundarios es la ruta del ácido mevalónico, esta ruta es el origen de los terpenos y terpenoides, que se derivan del isopreno (Figura 1), por lo cual comúnmente se les llama también isoprenoides. Los terpenos más conocidos son las piretrinas que se extraen de las flores de crisantemo y se utilizan ampliamente como insecticidas ya que intervienen en los canales de sodio de la membrana de los nervios de los insectos ocasionándoles hiperexcitación. Los terpenoides son poco tóxicos a los mamíferos y son biodegradables lo cual ha contribuido más a su amplia utilización como plaguicidas (Hopkins, 1999). Los terpenoides son los compuestos que se encuentran en una mayor diversidad de clases dentro de las plantas sin embargo todos tienen un origen biosintético común, la fusión de cinco unidades de carbono para formar una estructura isopentenoide, normalmente todos los terpenoides se encuentran conjugados con otras moléculas como por ejemplo azúcar. Los terpenoides se encuentran distribuidos por todo el reino vegetal debido a la gran diversidad de formas químicas, se conocen alrededor de 15,000 terpenoides en las plantas. Los terpenoides son considerados como metabolitos secundarios ya que no juegan un papel fundamental en el crecimiento y desarrollo de las plantas, sin embargo las funciones ecológicas de estos compuestos son muy importantes para la sobrevivencia de las plantas.

### **1.3. Glucosinolatos**

Los Glucosinolatos, son una serie de compuestos del metabolismo secundario de las plantas, principalmente del orden de los Caparales. Actualmente el estudio de estos compuestos ha cobrado una mayor importancia tanto en la industria farmacéutica como en la nutracéutica debido a que recientemente se ha descubierto la capacidad de estos compuestos para prevenir algunas formas de cáncer de los seres humanos (Sivakumar, *et al.*, 2007). Después de su consumo una enzima endógena, llamada mirosinasa que cataliza la hidrólisis de estos metabolitos, se producen una serie de compuestos incluidos los isotiocinatos (Rangkadilo *et al.*, 2002). Los isotiocinatos son uno de los glucosinolatos implicados en la prevención del cáncer (Botting *et al.*, 2007); (Duncan *et al.*, 2007).

#### **1.4. Síntesis de glucosinolatos**

La síntesis de glucosinolatos se ha estudiado en *Arabidopsis thaliana*, en esta especie se han identificado varios glucosinolatos derivados de formas elongadas del aminoácido metionina. La elongación de la metionina es un proceso análogo a la síntesis de leucina desde el 2-oxo-3-metilbutanoato. La metionina es inicialmente transaminada a un oxo ácido, que sufre una condensación a causa de la acetil coenzima A (CoA) y resulta en un 2-metiltiopropilmalato, después ocurre una isomerización y una descarboxilación oxidativa que resulta en la ganancia neta de un metil en el oxo-ácido. El oxo-ácido elongado puede ser transaminado para entrar en el centro del glucosinolato. En *Arabidopsis thaliana* el glucosinolato que se encuentra con mayor frecuencia, son los derivados de la metionina, que mediante una elongación simple produce un glucosinolato de tres carbonos, como el 3 metilsulfiniopropil, 3 hidroxipropil o 2 propenil glucosinolato, si se presentan dos elongaciones entonces se forman glucosinolatos de cuatro carbonos como el 4-metilsulfinilbutil and 3-butenil glucosinolato (Field *et al.*, 2004).

Aunque aún no se han realizado trabajos específicos para brócoli, se sabe que en mutantes de *Arabidopsis thaliana* la formación de glucosinolatos de tres o cuatro carbonos está regulada por alelos en el locus *Gsl-elong* en el cromosoma cinco, este locus contiene dos genes llamados MAM 1 y MAML. El gen MAM1 afecta la producción de glucosinolatos de cuatro carbonos pero no afecta la producción de glucosinolatos de seis, siete u ocho carbonos (Kroymann *et al.*, 2001), lo cual indica que posiblemente existan más genes involucrados en la síntesis de glucosinolatos de cadenas carbonadas más largas (Field *et al.*, 2004).

Recientemente se ha estudiado el movimiento de los glucosinolatos a través del tejido de las plantas, algunos estudios realizados en *Tropaeolum majus* mostraron una gran cantidad de benzilglucosinolatos que habían sido sintetizados en hojas, en otros tejidos de la planta como por ejemplo semillas en formación. Trabajos similares muestran la misma tendencia en *Brassica napus*. (Sixue *et al.*, 2001)

#### **1.5. Función fisiológica de los glucosinolatos en las plantas**

Los glucosinolatos son hidrolizados inmediatamente después de un daño al tejido de la planta (Duncan *et al.*, 2007). Estos metabolitos son utilizados por las plantas como una estrategia de defensa y juegan un papel importante en las interacciones de las plantas con los herbívoros por ejemplo Martin *et al.* (2007), evaluaron la concentración de glucosinolatos y la actividad de

mirosinasa a través del tiempo, como respuesta al ataque de un insecto. Los resultados mostraron que tras el ataque de un herbívoro se produce en la planta una respuesta local, en el sitio del ataque y una respuesta sistémica en hojas distantes al sitio de ataque, la respuesta local que incluyó un incremento en la actividad de mirosinasa, así como un incremento en la concentración de glucosinolatos, la respuesta se dio casi de manera inmediata al ataque y declinó después de un día. La respuesta a la herbivoría se disparó con una sola larva alimentándose. En otro trabajo similar Mueller *et al.* (2006) encontraron una alta resistencia de *A. rosae* a diferentes concentraciones de glucosinolatos, esta alta resistencia está determinada por la capacidad del insecto de inactivar la enzima mirosinasa, que es la encargada de hidrolizar los glucosinolatos si este proceso no se lleva a cabo entonces, los glucosinolatos permanecen en un estado inactivo.

Por otro lado Ulmer y Dossall (2006) encontraron que algunos tipos de glucosinolatos presentes en las raíces de 19 variedades de nabo mostraron un efecto altamente significativo en la inhibición de *B. Cinerea* lo cual refuerza la idea de que estos compuestos se acumulan en la planta como una defensa, no solo ante insectos, sino que posiblemente pueda estar contribuyendo a la resistencia a algunos hongos.

Otros autores han incluso ensayado los glucosinolatos presentes en semillas, como posibles compuestos herbicidas, por ejemplo Vaughn *et al.* (2006) ensayaron 15 especies de plantas que contienen glucosinolatos y mostraron un efecto fitotóxico en otras especies de plantas consideradas como malezas, estos autores llegaron a la conclusión de que el efecto inhibitorio de los glucosinolatos en la germinación de semillas dependía de la concentración de glucosinolatos presentes en las semillas como los productos de su hidrólisis.

#### **1.6. Efecto en el ser humano.**

Los hábitos alimenticios son un factor determinante de riesgo en el 40-60% de los casos de cáncer de colon. El consumo de frutas y vegetales contienen muchos compuestos no nutritivos como son carotenos, isocianatos, flavonoides, glucosinolatos, índoles, esteroides, terpenos, fenoles entre otros. Además de estos existen muchos componentes aun desconocidos que pueden disminuir el riesgo de cáncer. Numerosos estudios en animales muestran que diferentes grupos químicos que se encuentran en los alimentos pueden prevenir la incidencia de cáncer,

muchos de estos compuestos químicos son antioxidantes. Los modos de acción pueden ser diversos, pero se suelen clasificar en cuatro grupos

- I) Inhibición enzimática o bloqueo de la formación de las células cancerígenas
- II) Inducción de enzimas de detoxificación.
- III) Eliminación de agentes reactivos de ADN potencialmente peligroso
- IV) Modulación hormonal
- V) Reducción de la proliferación de hipercélulas inductoras de cáncer.

Actualmente se han incrementado los casos de cáncer de colon, por lo cual es necesario investigar armas efectivas que disminuyan la incidencia de este tipo específico de cáncer, a pesar de que factores genéticos y del medio ambiente están involucrados como factores que predisponen al cáncer, también se sabe que los alimentos pueden resultar altamente eficientes en la prevención de esta enfermedad (Tanaka *et al.*, 2006).

Durante la cocción la enzima mirosina y sus cofactores son desactivados por descomposición termina sin embargo, los glucosinolatos son hidrolizados en el tracto digestivo por la flora bacteriana, aun si se consumen crudos, las bacterias del tracto digestivo ocasionaran una hidrólisis, sin embargo la absorción de glucosinolatos fue mayor en sujetos que ingirieron glucosinolatos crudos, ya que además de la flora bacteriana la enzima mirosina que contienen los vegetales verdes ayuda a una mayor y más rápida absorción. El destino final de los glucosinolatos depende del tiempo de tránsito por el aparato digestivo, composición de la comida, genotipo de cada persona y diferencias en la microflora del tracto digestivo. Los isotiocinatos son uno de los glucosinolatos implicados en la prevención del cáncer (Botting *et al.*, 2007; Duncan *et al.*, 2007).

También se han efectuado estudios que muestra cual es el mecanismo por los cuales los glucosinolatos son efectivos en la prevención del cáncer y se ha encontrado que su acción de protección se debe gracias a las propiedades antioxidantes de los glucosinolatos (Yu-Bin *et al.*, 2007), estos mismos investigadores indujeron tumores en ratones y utilizaron glucosinolatos para medir la tasa con que estos compuestos inhibían efectivamente el crecimiento de los tumores y encontraron diferencias significativas entre aquellos ratones no tratados en relación con los se les suministraban glucosinolatos del brócoli, por lo que concluyeron que estos compuestos son muy efectivos como preventivos tumorales.

Los compuestos comúnmente identificados son los derivados del 4-metilsulfinilbutil glucosinolato. Este compuesto es el que tiene la actividad anticancerígena, (Hansen, *et al.*, 2007).

La actividad anticancerígena del brócoli se debe principalmente al sulforafano, que es un isotiocinato, derivado del 4-Metilsulfinibutil glucosinolato (Gasper *et al.*, 2007). Este glucosinolato ha mostrado en numerosos estudios epidemiológicos, que tienen un efecto de supresión a algunas moléculas mutagénicas relacionadas con la aparición de diversos tipos de cáncer como la *2-amino-3-metil-3H-imidazol (4-5-f)-quinolina* y *N-nitroso-N-metilurea*. Ambas moléculas mutagénicas fueron inhibidas por el jugo de brócoli 40 días después de su aplicación en ensayos micronucleares *in vivo*.

La estructura química del sulforafano se muestra en la Figura 2;

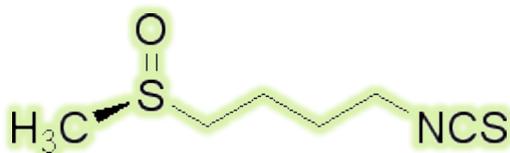


Figura 2. Estructura química de la molécula de sulforafano (Aldrich, 2008).

### 1.8. Degradación de los glucosinolatos durante el procesamiento del brócoli.

Los parámetros para mantener la calidad visual y nutricional de los frutos y hortalizas está siendo objeto de muchos estudios, recientemente la atención se ha enfocado en mantener la concentración de los fitoquímicos en las plantas que tienen algún interés para el ser humano como agentes anticancerígenos o como preventivos de enfermedades cardiovasculares. Algunos de los químicos de interés en las plantas son flavonoides, incluyendo antocianinas y flavonoles, carotenoides como licopeno y compuestos de azufre como glucosinolatos. Sin embargo el conocimiento acerca del efecto de los procedimientos comúnmente usados en postcosecha como atmósferas modificadas o controladas así como las bajas temperaturas sobre estos fitoquímicos es relativamente escaso. Además los efectos de la cocción sobre el contenido de estos compuestos ha sido descuidado, aunque generalmente se asume que la cocción tiene efectos negativos sobre el contenido de fitoquímicos por la pérdida de la integridad celular, sin embargo existen excepciones en las cuales la cocción incrementa la disponibilidad de estos compuestos (Jones, 2007).

Durante la cocción la enzima mirosina, que es la encargada de hidrolizar a los glucosinolatos, se inactiva como consecuencia de un rompimiento térmico, también es posible que se pierdan los cofactores enzimáticos o la pérdida de glucosinolatos por la volatilización de sus compuestos (Duncan *et al.*, 2007).

El cocinado de los vegetales ocasionó pérdidas del 30% de los glucosinolatos totales en crucíferas, en contraste no se encontraron cambios en el contenido de estos compuestos cuando fueron congelados (Cieslik *et al.*, 2007).

Por otra parte Mandelova y Totusek (2007) mencionan que el brócoli tratado a altas presiones (500 Mpa por diez minutos) no solo mantiene las características nutraceuticas del brócoli, sino que además impide el crecimiento de microorganismos patógenos.

## 2. Capítulo II.

### **Cromatografía en capa fina acoplada a densitometría para la cuantificación y aislamiento de glucorafano en extracto crudo de brócoli (*Brassica oleracea L.*)**

#### **2.1 Resumen**

El brócoli es una de las crucíferas de mayor consumo a nivel mundial. Esta planta posee un contenido elevado de glucosinolatos, metabolitos secundarios implicados en la prevención del cáncer. Actualmente se han reportado diferentes técnicas basadas en cromatografía de líquidos de alta resolución para determinar la concentración de estos compuestos. Como alternativa se propone usar la cromatografía en capa fina acoplada a densitometría para determinar la concentración y aislar estos compuestos. Se utilizaron placas precortadas de sílica gel, en la que se colocó una cantidad conocida de estándar de glucorafano. El coeficiente de retención ( $R_f$ ) del glucorafano en este sistema fue de 0.6 y las lecturas del densitómetro indicaron que la máxima absorbancia del compuesto fue a 226 nm. Con los datos de altura y área bajo la curva del estándar fue posible construir modelos estadísticamente significativos, para determinar la concentración de glucorafano en muestras de extracto crudo de brócoli. Además fue posible aislar, a partir de este extracto, glucorafano con una pureza mayor al 90%, utilizando el mismo sistema.

## 2.2. Introducción

El brócoli es una de las crucíferas más consumida por los seres humanos, contiene entre otros metabolitos secundarios, glucosinolatos. Después de su consumo, una enzima endógena cataliza su hidrólisis y produce una serie de compuestos incluidos los isotiocinatos (Rangkadilo *et al.*, 2002). Los isotiocinatos están implicados en la prevención del cáncer (Botting *et al.*, 2007; Duncan *et al.*, 2007). Actualmente el estudio de estos compuestos ha cobrado una mayor importancia tanto en la industria farmacéutica como en la nutracéutica debido a esta propiedad (Sivakumar *et al.*, 2007). El isotiocinato que confiere la actividad anticancerígena al brócoli se debe principalmente al sulforafano, que es un isotiocinato, derivado del 4-Metisulfinibutil glucosinolato (Gasper *et al.*, 2007). Se han reportado diferentes métodos basados en cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), para determinar la naturaleza y concentración de estos compuestos y con frecuencia son los más utilizados en los análisis de los glucosinolatos en las crucíferas (Rangkadilok *et al.*, 2002). Este método ha sido utilizado en muchos otros estudios debido a la repetibilidad, precisión y confiabilidad que ofrece en los resultados (Van *et al.*, 2007; Velasco *et al.*, 2007; Wade *et al.*, 2007). Sin embargo la limitante de este método es el elevado costo de los disolventes (grado HPLC), así como las columnas y las precolumnas necesarias. Como alternativa es posible emplear la cromatografía en capa fina (CCF) acoplada a densitometría, esta técnica permite hacer análisis cuantitativos y cualitativos de diferentes compuestos con una precisión muy similar a la obtenida por medio de HPLC. Además el bajo costo de los insumos, tiempos de análisis y volumen de disolventes hacen de esta técnica altamente competitiva.

La técnica de CCF permite la separación y aislamiento de un gran número de compuestos. Se ha utilizado para aislar glucorafano a partir de brócoli y utilizarlo para demostrar su actividad antioxidante (Panglossi, 2006). En el presente trabajo se utilizó la cromatografía de capa fina acoplada a densitometría para cuantificar y aislar el glucorafano, principal glucosinolato presente en el brócoli.

## **2.3. Materiales y métodos**

### **2.3.1. Cuantificación de glucorafano**

#### **2.3.1.2. Reactivos y materiales**

Para este trabajo se usaron 5 mg de un estándar de glucorafano de Sigma-Aldrich (Alemania) con una pureza mayor o igual al 95%, dicho estándar fue diluido en 1 mL de metanol (grado HPLC, Sigma-Aldrich). El metanol utilizado para hacer los extractos fue marca Fermont (México) grado reactivo. El agua utilizada en la extracción fue bidestilada y las placas de sílica para la cromatografía fueron de Merck (Alemania) de 0.25 mm de grosor en base de aluminio de 20 X 20 cm y con indicador de fluorescencia a 256 nm. Los disolventes obtenidos de Merck (Alemania). Los solventes utilizados para la fase móvil de la cromatografía en capa fina fueron metanol, etanol y ácido acético grado reactivo obtenidos de la misma empresa.

#### **2.3.1.3. Preparación de las muestras**

El material vegetal utilizado para la extracción del glucorafano fue brócoli (*Brassica oleracea* L.) de la variedad experimental PX1229 que es rica en glucorafano, cosechado en la región de El Bajío, México, las plantas crecieron bajo condiciones de temporal de octubre a diciembre. Para hacer la extracción solo se utilizaron floretes sin tallo; inmediatamente después de cosechados, se colocaron en bolsas de plástico a 4 °C para ser transportados durante 4 h hasta el laboratorio para su análisis.

Se utilizaron entre 150 y 200 gramos de floretes que fueron molidos en presencia de 300-400 ml, de una combinación de metanol y agua en proporción 80:20 (v/v) y se dejaron en reposo durante 48 horas. Después de este periodo de tiempo la muestra se pasó a través de papel filtro poro medio en tres ocasiones. El extracto obtenido se concentró en un rotavapor con presión reducida, con un baño maría a 60 °C, hasta un volumen aproximado de 20-30 mL.

#### **2.3.1.4. Método de cromatografía en capa fina**

El extracto crudo fue separado por medio de cromatografía en capa fina, utilizando placas de 100 X 100 mm con líneas de 0.8 cm y un volumen de aplicación en cada banda de 3 µL. La fase móvil que se utilizó en el sistema fue metanol, etanol, ácido acético y agua (30:10:10:10; v/v/v/v).

Para analizar el comportamiento espectral de la molécula de glucorafano a partir del estándar se colocó en una placa de 100 x 100 mm, volúmenes crecientes de una solución de estándar (5 µg/µL). Se utilizaron siete bandas con un volumen de aplicación desde 1 µL hasta 7 µL de solución de estándar. Las placas se observaron en luz UV a 256 nm.

El coeficiente de retención ( $R_f$ ) se calculó por medio de la fórmula.

$$R_f = Z(x)/Z(f) * 100$$

Donde;

Z(x)= Distancia del punto de aplicación a la molécula.

Z(f)= Distancia del punto de aplicación al frente del disolvente.

La resolución se calculó por medio de la fórmula;

$$R_s = 2(Z_2 - Z_1) / (W_1 + W_2)$$

Donde;

Z<sub>2</sub>= Distancia del punto de aplicación a la molécula uno;

Z<sub>1</sub>= Distancia del punto de aplicación a la molécula dos;

W<sub>1</sub>= Ancho de la base de la curva de la molécula uno;

W<sub>2</sub>= Ancho de la base de la curva de la molécula dos;

#### **2.3.1.5. Análisis por densitometría**

Las placas de aluminio fueron montadas sobre una placa de vidrio de 200 x 200 mm para que pudieran colocarse físicamente en la posición adecuada dentro de un densitómetro Modelo CD-60 Desaga (Alemania). Se analizaron concentraciones crecientes desde 1 µL hasta 7 µL del estándar de glucorafano. Para el análisis del estándar se utilizaron placas de sílica gel de 100 x 100 mm y la muestra se colocó en un ancho de banda de 80 mm con 30 mm de separación entre bandas. Se realizó un barrido preliminar de las muestras desde 200-260 nm para caracterizar el comportamiento espectral de la molécula de glucorafano. En este análisis

el densitómetro mostro la absorbancia del glucorafano y el área bajo la curva correspondiente a cada punto del espectro.

Para el caso de las muestras de extracto crudo se utilizó un volumen de aplicación de 5 - 3  $\mu$ L en un espacio de aplicación de 80 mm. En cada extremo de la placa, en la primera y en la última banda se colocaron concentraciones conocidas del estándar que sirvió como punto de referencia para calcular la concentración de la muestra analizada.

#### **2.3.1.6. Análisis estadístico de los datos**

Los datos obtenidos del densitómetro fueron el área bajo la curva y la altura del pico. Con la ayuda del programa Microsoft Excel 2007, se construyeron modelos de regresión lineal con la finalidad de poder predecir la concentración de las muestras a partir de la concentración del estándar. Se eligieron los modelos que resultaron estadísticamente significativos y con un coeficiente de determinación ( $r^2$ ) mayor a 0.95.

### **2.4. Aislamiento de glucorafano**

#### **2.4.1. Reactivos y materiales.**

Para este trabajo se usaron 5 mg de un estándar de glucorafano Sigma, (Alemania) con una pureza mayor o igual al 95 %, dicho estándar fue diluido en 1 ml de metanol ( grado HPLC, Sigma Aldrich). Se utilizó metanol grado reactivo (Fermont, México) para hacer los extractos. El agua utilizada en la extracción fue bidestilada. Para la separación se utilizaron placas de sílica gel a escala semipreparativa. Se utilizaron placas de vidrio de 30 mm de grosor y de 200 X 200 mm de cada lado. Se utilizó sílica gel 60 F254 obtenida de Merck (Alemania). Los disolventes utilizados para la fase móvil de la cromatografía en capa fina fueron metanol, etanol y acido acético grado reactivo obtenidos de la misma empresa. Para preparar las placas, sobre el vidrio limpio se colocó una suspensión de sílica gel en agua (90 mL de agua con 15 g de sílica) y se aplicó sobre la base de vidrio utilizando un aplicador de sílica (Yazawa), el grosor de la sílica fue de 0.5 mm.

#### **2.4.2. Preparación de las muestras**

De la misma forma que para la extracción se utilizaron entre 150 y 200 g de floretes de brócoli de la misma variedad, que fueron molidos en presencia de 300-400 mL de una combinación de metanol y agua (80:20 v/v) y se dejaron en reposo durante 48 h. Después de este periodo de tiempo la muestra se paso a través de papel filtro poro medio en tres ocasiones. El extracto obtenido se concentró en un rotavapor con presión reducida, con un baño maría a 60 °C, hasta un volumen aproximado de 20-30 mL.

#### **2.4.2. Método de Cromatografía en capa fina**

El extracto crudo de brócoli fue separado por medio de cromatografía en capa fina, utilizando placas de 100 x 100 mm con líneas de 80 mm y un volumen de aplicación en cada banda de 3  $\mu$ L. La fase móvil que se utilizó en el sistema fue metanol, etanol, ácido acético y agua (30:10:10:10 v/v/v/v). Posteriormente se colectó la fracción de sílica correspondiente con el  $R_f$  del estándar y se diluyó en metanol para después centrifugarse por 15 minutos a 5000 g. Posteriormente se colectó el sobrenadante y se colocó en un vaso de precipitado por 10 min en una plancha a 50 °C. Además se hizo pasar gas nitrógeno por el vaso de precipitado con la finalidad de concentrar la muestra. Una vez concentrada la muestra, se resuspendió en un mililitro de metanol grado HPLC. Se colocaron 3  $\mu$ L de la solución resuspendida sobre placas de cromatografía de 100 mm X 100 mm y se desarrollaron según el procedimiento antes descrito. Las placas se observaron en luz U.V a 256 nm y los valores de  $R_f$  fueron calculadas según las formulas descritas anteriormente

#### **2.4.3. Análisis por densitometría**

Una vez que se aisló el glucorafano, las placas de cromatografía se colocaron sobre una placa de vidrio de 200 X 200 mm, con la finalidad de inmovilizarlas y así evitar falsas lecturas del densitómetro. El densitómetro utilizado fue marca Desaga modelo CD-60 (Alemania). Se utilizó un volumen de aplicación de 5-3  $\mu$ L en un espacio de aplicación de 80 mm. En cada extremo de la placa, en la primera y en la última banda se colocaron dos concentraciones conocidas de estándar que sirvió como punto de referencia para calcular la concentración de la muestra.

#### 2.4.4. Análisis estadístico

Los datos obtenidos del densitómetro fueron el área bajo la curva y la altura del pico. Con la ayuda del programa Microsoft Excel 2007®, se construyeron modelos de regresión lineal con la finalidad de poder predecir la concentración de las muestras a partir de la concentración del estándar. Se eligieron los modelos que resultaron estadísticamente significativos y con un coeficiente de determinación ( $r^2$ ) mayor a 0.95.

#### 2.5. Resultados y discusión

##### 2.5.1. Desarrollo de las placas de cromatografía para la determinación de la concentración de glucorafano

El sistema de cromatografía utilizado, resulto adecuado para separar las moléculas de glucorafano del resto de los compuestos presentes en el extracto crudo. El coeficiente de retención de los estándares comerciales, mostró un valor de 0.60, este valor coincidió con el mostrado por una fracción del extracto crudo de brócoli, gracias a lo cual fue posible detectar la presencia de dicho compuesto. En las placas cromatograficas de extracto crudo, el sistema permitió discriminar el glucorafano, de otros compuestos presentes en dicho extracto, el coeficiente de resolución de estas placas fue de 0.8 (Figura 3).

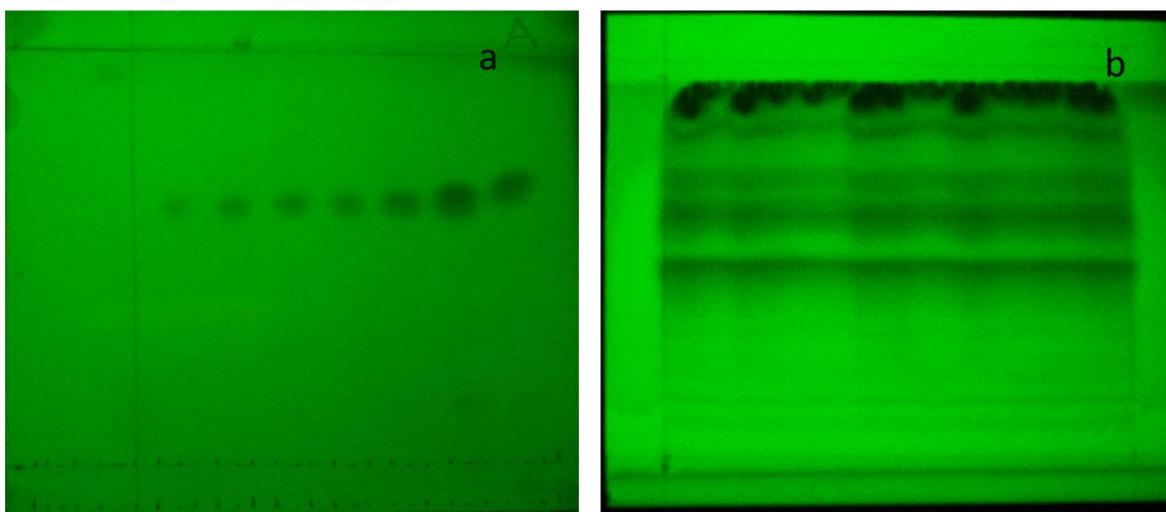


Figura 3. a) Imagen de las placas de sílica gel donde se observa bandas de glucorafano con luz U.V a 256 nm. Los recuadros muestran concentraciones decrecientes de derecha a izquierda. b) Imagen de placas de cromatografía con extracto crudo de Brócoli observadas a la misma longitud de onda.

El mismo sistema de cromatografía en capa fina se ha utilizado con éxito para demostrar la actividad anticancerígena de la molécula de sulforafano (Fimognari & Patrizia, 2007). Estos autores pudieron, gracias a esta técnica, aislar sulforafano puro a partir de extracto crudo y comprobar su efecto anticancerígeno realizando ensayos con linfocitos humanos.

El análisis por densitometría de las placas cromatográficas del estándar de glucorafano mostró que la mayor zona de absorción se encontró entre los 226 y los 230 nm (Figura 4). Esta zona de lectura resulto ser la más adecuada, muestra la máxima absorción y área bajo la curva. Resultados similares (Cheng-Guo J, 2009), indicaron que la máxima zona de absorción para los glucosinolatos en un sistema de cromatografía de líquidos de alta resolución se encontraba entre 226 y 280 nm. Estos autores utilizaron esta longitud de onda para determinar el efecto de atmosferas modificadas sobre la concentración de diferentes glucosinolatos. Por lo anterior se decidió usar una longitud de onda de 226 nm para la lectura de las placas en las cuales se colocó extracto crudo. Debido a que el sistema mostro una resolución adecuada y además se determino la zona de máxima absorción de luz U.V, fue posible la utilización de estos datos para la construcción de modelos que permitieran predecir con confiabilidad la concentración del glucorafano del extracto crudo de brócoli.

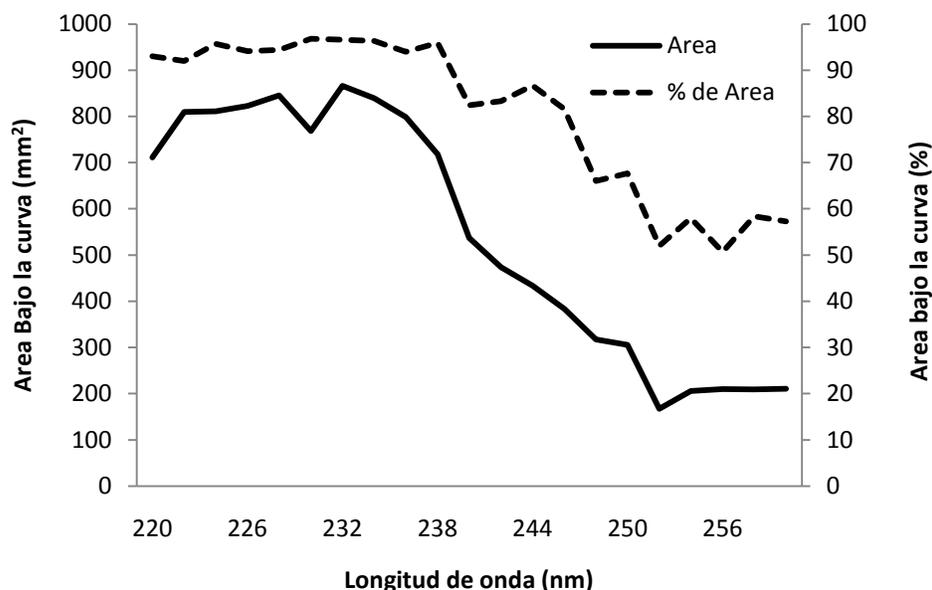


Figura 4. Comportamiento del glucorafano en cromatografía en capa fina- densitometría.

El modelo que mostró un coeficiente de determinación más alto así como significancia estadística fue:

$$y = -0.817074 + \text{Altura} (0.085984) + \text{Area}(-0.033402) + (\text{Area} \times \text{Altura})(0.000213) + (\text{Area} \times \text{Altura})^2(-1.555834 \times 10^{-10} X_4)$$

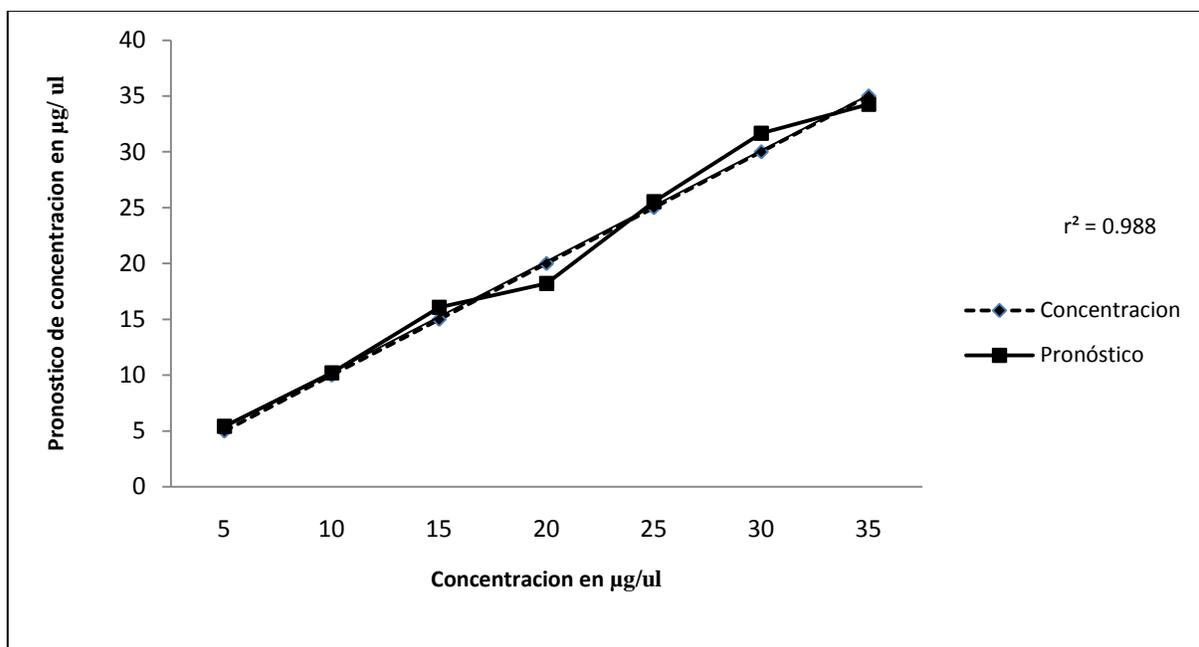
Donde:

Y= Concentración de glucorafano en el extracto crudo de brócoli.

Altura = Altura del pico de glucorafano del estándar que reporto el densitómetro.

Área= Área bajo la curva del pico de glucorafano que reporto el densitómetro.

El modelo de regresión obtenido mostró una probabilidad de  $8.82 \times 10^{-09}$  y un coeficiente de determinación de 0.988 (Figura 5), lo cual muestra que fue adecuado para predecir la concentración del estándar de glucorafano que se colocó sobre las placas cromatográficas.



**Figura 5. Modelo de regresión ajustado para determinar la concentración de glucorafano por medio de cromatografía en capa fina- densitometría.**

La combinación de técnicas de cromatografía en capa fina con densitometría ha sido utilizada con éxito en los análisis de otras moléculas (Mulinacci et al., 1999), por ejemplo, se ha acoplado la técnica de cromatografía en capa fina (CCF) con densitometría y utilizando

modelos de regresión lineal se ha encontrado la relación entre el área del pico y la cantidad de hipericina colocada en el plato de cromatografía, con un coeficiente de determinación de 0.99. La combinación de estas técnicas resulta en una disminución del costo de análisis por muestra, ya que se utiliza una menor cantidad de disolventes en comparación con otros métodos como por ejemplo la cromatografía de líquidos de alta resolución. Además es posible analizar varias muestras en la misma placa, lo cual disminuye el tiempo de análisis de las muestras.

### **2.5.2. Análisis del extracto crudo de brócoli por medio de cromatografía en capa fina-densitometría.**

El modelo de regresión lineal obtenido a partir de los datos del densitómetro mostró coeficientes de determinación altos y significancia estadística. El modelo utilizado para pronosticar la concentración de la muestra fue:

$$y = 2.90 + (0.049 X \textit{Altura})^2$$

Donde

Altura = Altura del pico de glucorafano obtenido del densitómetro.

El coeficiente de determinación del modelo fue de 0.96 y la probabilidad estadística de la regresión fue de 0.0004.

Para cada placa cromatográfica se ajustó un modelo de regresión lineal debido a que hay factores que afectan la reproducibilidad, tales como el grosor de la capa de sílica, el contenido de agua y el tamaño de partícula del adsorbente (Touchstone, 1992).

El método de cromatografía en capa fina acoplado a densitometría ha sido comparado en otros trabajos contra el método de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), encontrándose que ambos métodos resultaban eficaces para determinar la concentración de hipericina y pseudohipericina (Mulinacci et al., 1999), sin embargo esos autores encontraron que el principal problema que afectaba la sensibilidad de la cromatografía en capa fina acoplada a la densitometría era la homogeneidad de la capa de sílica sobre el plato de vidrio. En el presente trabajo este detalle se solucionó ajustando un modelo de regresión para cada placa de sílica.

### 2.5.3. Aislamiento de glucorafano

La fracción correspondiente con el  $R_f$  del glucorafano fue colectada de las placas de sílica gel y se obtuvo la concentración y la pureza del compuesto. Se logró obtener una solución de glucorafano a una concentración de  $6.15 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$  y con una pureza del 91.36%.

Con los datos obtenidos del densitómetro se construyó un modelo de regresión para determinar la concentración del glucorafano aislado con los siguientes coeficientes: }

$$Y = 6.1436383 + (A \times H)^3 11.19 \times 10^{-15}$$

Donde;

Y= Concentracion de glucorafano en  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$

A= Área debajo de la curva.

H= Altura de la curva.

El coeficiente de determinación fue de 0.92 con una probabilidad de 0.007 (Figura 6).

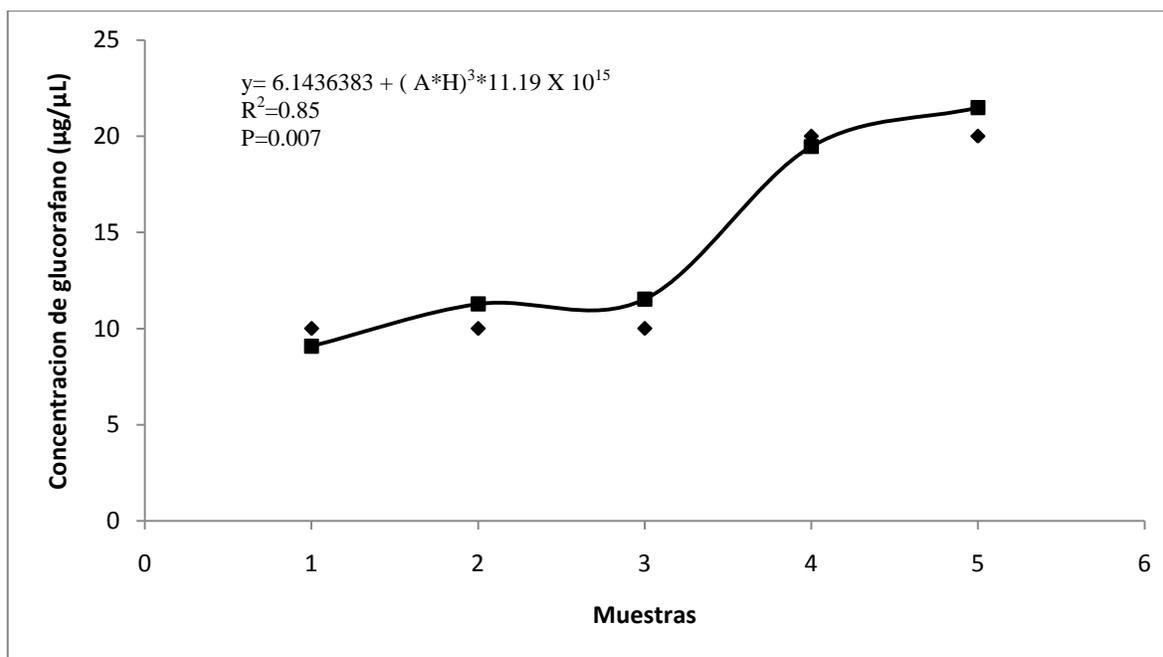


Figura 6. Grafico de regresión para determinar la concentración y pureza de glucorafano aislado a partir de extracto crudo de brócoli.

## **2.6. Conclusiones**

El método de cromatografía en capa fina acoplado a densitometría fue adecuado para lograr detectar la presencia del glucorafano en el extracto crudo de brócoli. El método permitió poder determinar y ajustar modelos de predicción para la concentración de glucorafano en el extracto crudo de brócoli. El método permitió detectar la presencia del compuesto de manera cualitativa y cuantitativamente, además fue posible aislar el compuesto con una pureza alta.

### 3. Capítulo III.

#### **Efecto de tratamientos de precocción sobre color, textura y contenido de glucorafano en brócoli.**

##### **3.1. Resumen**

El brócoli contiene glucorafano, este compuesto ha mostrado actividad anticancerígena. El contenido del glucorafano, al igual que otros parámetros de calidad, pueden ser afectados por la precocción a la cual son sometidos los floretes de brócoli para comercializarlos. El presente trabajo tuvo como objeto determinar el efecto de tratamientos de precocción sobre el color, textura y contenido de glucorafano. Los tratamientos ensayados fueron: inmersión en agua a 40, 50, 60 °C durante 20, 40 y 60 min; inmersión en agua a 100 °C durante 0.5, 1 y 2 min y vapor de agua a 86 °C durante 60 y 120 min. El análisis de varianza mostró que los tratamientos tuvieron un efecto estadísticamente significativo ( $P \leq 0.05$ ) en el color de los floretes, medido con el canal *a* del espacio de color Hunter-Lab. Los tratamientos con vapor de agua y agua hirviendo por 2 min produjeron valores negativos menores (-8.6 a -8.4), lo cual indica un color verde más oscuro. De manera similar, todos los tratamientos provocaron una pérdida en la textura, siendo 60 °C por 60 min y 100 °C por 0.5 min los tratamientos que tuvieron mayor efecto negativo. El contenido de glucorafano en el testigo fue 26.50  $\mu\text{mol } 100 \text{ g}^{-1}$  de M.F., disminuyendo en por lo menos 79 % con los tratamientos térmicos utilizados. La pérdida textura y contenido de glucorafano podrían explicarse por la degradación de las paredes celulares del florete, lo cual ocasiona una descompartimentación del glucorafano. Ambas variables mostraron entre ellas una relación cuadrática ( $R^2 = 0.93$ ). Debido a que los tratamientos ensayados provocaron variaciones significativas en las variables medidas, es necesario encontrar procedimientos de postcosecha que reduzcan las pérdidas de la calidad.

**Palabras clave:** *Brassica oleracea* cv. italiana, glucorafano, cocción, imágenes digitales

### 3.2. Introducción

El brócoli es una de las crucíferas más consumida por los seres humanos. De acuerdo con datos preliminares, el valor de la producción de brócoli en México en el año 2006 fue de 1740 millones de pesos, mientras que en el año 2008 se incremento a 2350 millones de pesos (INEGI, 2010). El principal productor de brócoli es el estado de Guanajuato, donde principalmente se comercializan los floretes congelados (60 % de la producción), y en fresco representa el restante 40% restante de la producción. Los principales actores de la cadena productiva son las empresas congeladoras y los productores asociados con el subministro de brócoli a dichas empresas (Produce, 2003).

Esta planta contiene metabolitos secundarios derivados de aminoácidos. Después de su consumo una enzima endógena, llamada mirosinasa que cataliza la hidrólisis de estos metabolitos, produce una serie de compuestos incluidos los isotiocinatos (Rangkadilo *et al.*, 2002). Los isotiocinatos son uno de los glucosinolatos implicados en la prevención del cáncer (Duncan *et al.*, 2007; Botting *et al.*, 2007). La actividad anticancerígena del brócoli se debe principalmente al sulforafano, que es un isotiocinato, derivado del 4-Metisulfinibutil glucosinolato (Gasper *et al.*, 2007). Actualmente el estudio de estos compuestos ha cobrado mayor importancia tanto en la industria farmacéutica como en la nutracéutica debido a esta propiedad (Sivakumar *et al.*, 2007).

Los procesos en postcosecha a los que son sometidos las hortalizas exponen a las sustancias que contienen, a factores que condicionan su disminución o alteración además los productos pueden sufrir una disminución de la propiedades biológicas que son deseables para el ser humano (Clifford y Brown, 2006). Además una vez que las hortalizas llegan a su consumidor final, son sometidas a diversos procesos como el almacenamiento o preparación, estos procesos también pueden alterar algunas características nutracéuticas de los alimentos (Rungapamestry *et al.*, 2007). En el caso del brócoli, hay estudios que muestran que los floretes almacenados durante tres días en bolsas poliméricas perforadas, pierden hasta un 56 % del contenido de glucorafanina en comparación con floretes recién cosechados (Rangkadilok *et al.*, 2002), sin embargo, cuando los floretes de brócoli se refrigeran, se mantiene la concentración de glucosinolatos, en comparación con aquellos floretes que se mantuvieron a temperatura ambiente (Rodrigues y Rosa, 1999).

Actualmente se utilizan varios procesos de preparación de los floretes de brócoli, que incluyen congelado, precocción y cocción por diferentes métodos. Estos procedimientos se utilizan regularmente tanto en las empacadoras de brócoli, como por el consumidor final. La cocción tradicionalmente se ha considerado como un proceso que consiste en la inmersión del vegetal a una temperatura de ebullición durante un tiempo breve con la finalidad de inactivar enzimas indeseables (Aguilar *et al.*, 1999). Cuando un florete de brócoli es sometido a cocción, la enzima mirosinasa es inactivada, por la acción de las altas temperaturas, además los glucosinolatos se transfieren al agua de cocción, después de la lisis celular o bien se transforman en compuestos volátiles o se degradan por la acción de la temperatura (Dekker *et al.*, 2000) por ello algunos autores como por ejemplo Aguilar *et al.* (1999) han propuesto métodos de cocción alternativos que permiten mantener algunas características de calidad y nutraceuticas aun después de sufrir diversos procesos previos al consumo. Uno de estos métodos es la cocción temperatura baja-tiempo largo (TB-TL), este método consiste básicamente en la inmersión del vegetal a temperaturas menores a la ebullición, pero durante un tiempo mayor al empleado en la cocción ordinaria, este método produce una menor solubilización de las sustancias pépticas, debido a que se activa la enzima pectinesterasa, esta enzima cataliza la formación de pectatos impidiendo la lisis celular y por lo tanto impidiendo la pérdida de textura y de fitonutrientes al agua de cocción.

En la literatura se encuentran numerosos reportes acerca del contenido de glucorafano en el brócoli y además, hay muchos estudios relacionados con los efectos benéficos a la salud de este compuesto, sin embargo no hay muchos trabajos que muestren el efecto de los procesos a los que los floretes de brócoli son sometidos después de la cosecha (Rungapamestry *et al.*, 2007).

El objetivo del presente trabajo fue determinar el impacto de la temperatura y del tiempo de cocción de los floretes de brócoli sobre parámetros de calidad, como el color, textura, y contenido de glucorafano.

### 3.3. Materiales y Métodos

#### 3.3.1. Material vegetal

Se utilizaron floretes de brócoli (*Brassica oleracea* cv. *italica*) var *maximo*, cosechados durante el mes de enero de 2008, en Celaya Guanajuato México. Los floretes se transportaron en hielo a una temperatura aproximada de 4 °C, durante cinco horas, hasta su procesamiento.

#### 3.1.2. Tratamientos

Se utilizaron tratamientos que combinaron la temperatura de inmersión en agua y el tiempo de exposición de los floretes; en otros tratamientos se uso vapor de agua en dos diferentes tiempos de exposición (Cuadro 1). Para los tratamientos de vapor, los floretes se colocaron sobre una rejilla dentro de una olla de 20 L con 6 L de agua hirviendo sin tocar la rejilla; la temperatura alcanzada sobre la rejilla donde se colocaron los floretes de brócoli fue de 86°C. Cada uno de los tratamientos se realizaron con tres repeticiones bajo un diseño completamente al azar y la unidad experimental fue un florete de peso conocido.

Cuadro 1. Tratamientos de temperatura y tiempo de exposición en floretes de brócoli.

Tratamiento	Medio de cocción	Temperatura (°C)	Tiempo (Minutos)
1	Agua	60	60.0
2	Agua	60	40.0
3	Agua	60	20.0
4	Agua	50	40.0
5	Agua	40	20.0
6	Agua	40	60.0
7	Agua	100	0.5
8	Agua	100	1.0
9	Agua	100	2.0
10	Vapor de agua	60	60.0
11	Vapor de agua	120	120.0
12	Testigo	-	-

### 3.1.3. Variables analizadas

Después de la aplicación de los tratamientos de cocción a los floretes de brócoli, se midieron las siguientes variables.

#### Color

Las muestras se colocaron sobre una superficie blanca, y se tomaron imágenes con una cámara digital Kodak modelo Z712 IS<sup>®</sup>, de 7.1 megapíxeles. Las fotografías se tomaron con un tamaño de 1024 X 768 píxeles, a una distancia de 1 m, iluminadas con una lámpara fluorescente de 20 watts. La apertura del diafragma utilizada fue de  $f/2.8$  y la velocidad del obturador fue  $1/30$  s. Las imágenes se guardaron en un formato tipo *jpeg*. El ángulo entre el lente de la cámara y la fuente de iluminación fue de aproximadamente  $45^\circ$ . Con un programa en Visual Basic v. 6.0<sup>®</sup> se obtuvieron los valores *RGB* de tres fragmentos de 40 x 40 píxeles por cada tratamiento de inflorescencias de brócoli. Los valores *RGB* se convirtieron al modelo de color estándar *sRGB* (lineales) definido por la Commission Internationale de l'Éclairage (Mendoza *et al.*, 2006). A partir de este modelo se convirtieron al modelo *CIE XYZ*, requerido para obtener el espacio de color *CIE-Lab* (Poyton, 1996). Éste espacio de color tiene tres canales: *L* representa la luminosidad con valores 0 a 100, *a* toma valores de verde a rojo y *b* de azul a amarillo; estos dos últimos componentes cromáticos varían de 120 a -120 (Papadakis *et al.*, 2000).

#### Textura

En el presente trabajo se utilizó el concepto de Surmacka (2002) quien precisa que la textura es una propiedad sensorial; se utilizó una escala inversa, basada en una percepción sensorial de floretes flexionados con ambas manos por la misma persona hasta partirse. La escala utilizada fue del uno al cinco, en donde el valor uno se refiere a floretes de brócoli recién cortados sin ser sometidos a ningún tratamiento térmico y con una textura muy alta, el dos con una textura alta, el tres con una textura media, el cuatro con una textura baja y el cinco con una textura muy baja.

### **Contenido de glucorafano**

Los floretes de brócoli se maceraron en presencia de una mezcla de metanol y agua en proporción 80:20 v/v, en cantidad suficiente para cubrir la muestra. Después de 48 h el contenido se pasó a través de papel filtro de poro medio, la parte sólida retenida en el filtro se volvió a colocar en una mezcla de metanol y agua en la proporción antes mencionada, y la parte líquida filtrada se conservó en un recipiente ámbar, esta operación se repitió en tres ocasiones.

El extracto crudo así obtenido, se concentró en un rotavapor con presión reducida a una temperatura de 60 °C, obteniendo así un volumen conocido de muestra.

Con la finalidad de separar el glucorafano del extracto crudo de Brócoli, se utilizó un sistema de cromatografía en capa fina cuya fase móvil consistió en una mezcla de metanol, etanol, ácido acético y agua (30:10:10:10; v/v/v/v). Las placas utilizadas fueron de sílica gel 60F256 con indicador de fluorescencia (Merck®), recortadas a 20 X 10 cm. En cada extremo de la placa se colocaron 2µL de un estándar comercial de glucorafano (Sigma®) con una concentración conocida, sobre la misma placa se colocaron 2 µL de la muestra.

Las placas, se analizaron por medio de un densitómetro marca Desaga® modelo CD-60. El análisis se realizó a 226 nm, que es la longitud de onda a la cual el estándar de glucorafano presentó un máximo de absorción.

### **3.1.3. Análisis estadísticos**

Los datos se sometieron a un análisis de varianza y pruebas de separación de medias (Tukey,  $P \geq 0.05$ ) por medio del programa estadístico SAS® V.9 (SAS institute). Previo al análisis de varianza, los parámetros del color ( $L$ ,  $a$ ,  $b$ ), se sometieron a la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk (Bautista-Martínez *et al.*, 2009), resultando que los datos tuvieron un comportamiento normal ( $P \geq 0.05$ ). Además, se comprobó la homostadidad de dichos parámetros por medio de la prueba de Barret (Bautista-Martínez *et al.*, 2009). Los valores de textura, no paramétricos, fueron transformados por medio de la ecuación  $Y = X^{0.5}$ ; donde  $X$  = textura en la escala de uno a cinco. Una vez que los datos fueron transformados se comprobaron los supuestos de normalidad y homostadidad con las mismas pruebas indicadas anteriormente. La comparación de medias se presenta, en todos los casos, con los datos sin transformar para facilitar la interpretación de los mismos.

Utilizando el mismo programa estadístico se realizaron modelos de regresión lineal, en los cuales no se incluyeron los tratamientos de cocción utilizando vapor por considerarse no comparables al resto de tratamientos que utilizan agua como medio de cocción.

### 3.4. Resultados y discusión

#### 3.4.1. Color

El análisis de varianza mostró que los tratamientos tuvieron un efecto estadísticamente significativo ( $P \leq 0.05$ ) en el color de los floretes. Los componentes del modelo de color del sistema Hunter-Lab que mejor explicaron los cambios del color de los floretes fueron  $a$  y  $b$ . En contraste la luminosidad ( $L$ ) no mostró significancia estadística ( $P \leq 0.05$ ). El componente  $b$ , aunque resultó ser significativo, mostró un coeficiente de determinación bajo ( $r^2 = 0.57$ ), en relación con el componente  $a$  ( $r^2 = 0.78$ ); por lo cual, el análisis se hizo para este componente. Valores negativos de  $a$ , indican matices verdes, y conforme se incrementa el valor tiende a amarillo y rojo (Yam y Papadakis, 2004). El color verde del brócoli se considera como un factor de calidad crítico para la comercialización de los floretes (DAVIS, 2010). En la presente investigación los promedios de todos los tratamientos (Cuadro 2) resultaron ser negativos, lo cual indica que los floretes estuvieron en la gamma del verde (Papadakis *et al.*, 2000) y por lo tanto se considera que los floretes no pierden calidad, al menos en lo que respecta al color.

Cuadro 2. Valores promedio del parámetro  $a$  del sistema de colores Hunter Lab, obtenidos de floretes de brócoli, sometidos a varios métodos de cocción.

Temperatura (°C)	Tiempo de Exposición (Minutos)	Promedio del parámetro $a^{\dagger}$
60	60	-2.92 a
40	20	-4.66 ab
Testigo	--	-5.65 abc
50	40	-6.15 abc
40	60	-6.87 bc
100	0.5	-6.96 bc

60	20	-7.04 bc
60	40	-7.07 bc
100	1	-7.32 bc
Vapor	120	-8.44 c
Vapor	60	-8.63 c
100	2	-8.64 c
<b>Media</b>		-6.45
<b>DMS</b>		3.3418

---

†Medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05).

Los tratamientos con vapor de agua y con agua hirviendo por dos minutos, ocasionaron valores negativos más grandes, lo cual indica que los floretes sometidos a estos tratamientos adquieren un color verde más oscuro, mientras que los tratamientos basados en tiempos largos y temperaturas altas ocasionaron una tendencia a un color verde claro (Cuadro 2). Los cambios de color en los cuales el verde se hace más intenso han sido observado por otros autores, por ejemplo Tijskens *et al.* (2001) encontraron en brócoli y ejote, que durante los tratamientos térmicos, utilizando agua a diferentes temperaturas, se observa, inicialmente, un incremento en el color verde, seguido después por un decremento. Resultados similares fueron reportados por Lau *et al.* (2000) que encontraron un incremento en el color verde de espárragos sometidos a tratamientos térmicos de entre 70 y 98 °C. Una posible explicación a este fenómeno, es propuesta por MacKinney y Weast (1940) que mencionan que el incremento inicial en el color verde puede ocasionarse por la expulsión del aire que se encuentra entre las células, estos autores asumen que este proceso podría alterar las propiedades reflejantes de la superficie, lo cual explicaría el cambio de color inicial. Según Tijskens *et al.* (2001), los tratamientos termicos ocasionan un incremento inicial del color verde, sin embargo, si estos tratamientos continúan por cierto periodo de tiempo, ocasionan un decremento de dicho color debido a la degradación de las clorofilas presentes.

El componente *a* disminuyó linealmente, en función del aumento de la temperatura del agua de cocción (Figura 7). La temperatura explica un 94 % de los cambios de color observados.

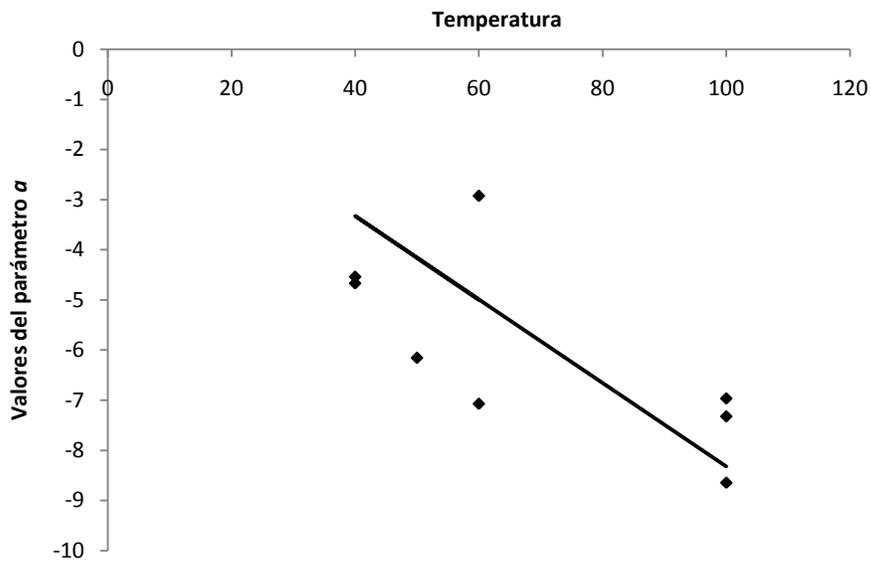


Figura 7 Efecto de la temperatura de cocción sobre el parámetro  $a$ . Donde;  $y$  = Valor del parámetro  $a$  del sistema Hunter Lab;  $x$  = Temperatura (°C). \*\*Diferente de cero a una probabilidad de 0.01.  $**P \leq 0.01$ .

### 3.4.2. Textura

En cuanto a la textura el análisis de varianza mostró diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos ( $P \leq 0.01$ ). Los tratamientos en los que no se modificó la textura fueron vapor de agua durante 60 min y agua a 40 °C durante 20 min que fueron estadísticamente iguales al valor inicial de la textura (testigo). Por otro lado los tratamientos de agua a 60 °C durante 60 min y agua a 100 °C durante 0.5 min, ocasionaron el valor máximo de la textura (Cuadro 3), lo cual en el presente trabajo indica una pérdida de la firmeza.

Cuadro 3. Efecto de diferentes tratamientos térmicos sobre la textura de floretes de Brócoli.

Temperatura (°C)	Tiempo de Exposición (Minutos)	Textura <sup>††</sup>
60	60	5.00 <sup>†</sup> a
100	0.5	5.00 a
100	1	4.00 b
100	2	4.00 b
60	40	3.66 b
40	60	2.66 c
50	40	2.66 c
60	20	2.5 dc
Vapor	120	2.0 cde
Vapor	60	1.6 def
40	20	1.3 ef
Testigo	-	1.00 f
<b>Media</b>	-	2.93
<b>DMS</b>	-	0.9201

<sup>†</sup> Medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05).

<sup>††</sup> Un valor de uno corresponde uno se refiere a floretes de brócoli recién cortados sin ser sometidos a ningún tratamiento térmico y con una textura muy alta, el dos con una textura alta, el tres con una textura media, el cuatro con una textura baja y el cinco con una textura muy baja.

Otros autores han obtenido resultados comparables, por ejemplo Chun-Hsien y Chi-Yue, (2005), sometieron a floretes de brócoli a diferentes temperaturas de cocción y encontraron que con un incremento de temperatura de 80 a 100 °C, la firmeza, medida con un penetrómetro, disminuyó rápidamente conforme se incrementó el tiempo de cocción. En contraste, este mismo trabajo menciona que cuando las muestras fueron cocinadas a temperaturas de entre 50 y 70 °C, la firmeza no solo se mantuvo sino que se incrementó. Este fenómeno ha sido observado por otros autores como Aguilar y Reyes (1999) que mencionan que el escaldado a temperaturas bajas por tiempos largos (escaldado TB-TL) conserva la

firmeza del vegetal debido a la activación de la enzima pectinesterasa (PE), lo cual ocasiona una serie de cambios bioquímicos cuyo resultado es la formación de estructuras moleculares insolubles que permiten obtener un producto firme, en el presente trabajo este hecho no pudo ser observado posiblemente por que las diferencias en la firmeza son muy pequeñas como para ser detectadas por el método sensorial, sin embargo este método ofrece otras ventajas. De acuerdo con Surmacka (2002) la firmeza es tan solo un parametro físico que forma parte de la textura, sin embargo, esta solo puede ser determinada por los sentidos, por lo cual es posible que pequeños cambios en la firmeza no sean detectados sensorialmente y debido a esto, no ocasionen una diferencia, que se pueda percibir en la escala utilizada en la presente investigación.

### 3.4.3. Contenido de Glucorafano

El análisis de varianza mostró diferencias altamente significativas entre tratamientos ( $P \leq 0.01$ ). Los floretes que no fueron sometidos a ningún proceso de cocción, mostraron valores de glucorafano más altos en comparación con los demás tratamientos (Cuadro 4) y cualquier tipo de cocción disminuye al menos un 77 % del contenido de glucorafano en relación con el testigo.

Cuadro 4. Efecto de diferentes tratamientos térmicos sobre la textura de floretes de Brócoli.

Temperatura (°C)	Tiempo de Exposición (Minutos)	Glucorafano ( $\mu\text{mol}/100 \text{ g de M.F}$ ) <sup>†</sup>
Testigo	-	26.50 a
60	40	6.09 b
40	60	6.02 b
50	40	5.57 bc
60	20	4.50 bcd
Vapor	60	4.27 bcd
Vapor	120	2.74 bcde
40	20	2.58 bcde
60	60	2.46 bcde

100	0.5	1.84 cde
100	2	0.0 e
100	1	0.0 e
<b>Media</b>	-	5.07
<b>DMS</b>	-	3.8239

†Medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05).

El contenido de glucorafano en los tratamientos en los cuales se utilizó agua hirviendo fue prácticamente indetectable, estos resultados contrastan con lo encontrado por Volden *et al.* (2009), quienes sometieron a floretes de coliflor a diferentes tratamientos térmicos y encontraron que aquellos tratamientos que utilizaron agua hirviendo por 3 min ocasionaron una reducción de 62% en los glucosinatos indólicos y alifáticos. En el presente trabajo las pérdidas en los floretes de brócoli fueron mucho mayores, aun cuando los tiempos de exposición al agua hirviendo fueron menores (0.5, 1 y 2 min), lo cual podría mostrar diferencias físicas entre floretes de coliflor y brócoli.

Volden *et al.* (2009) utilizaron igualmente tratamientos de precocción con vapor por solo 10 min, encontrando pérdidas de 22 %. Lo que podría ser comparable con el presente trabajo, ya que el tratamiento con vapor durante 60 min tuvo pérdida de 84 % y en vapor durante 120 min, la pérdida ascendió a 90 %. Sin embargo, Glyszczynska-Swiglo *et al.* (2006) en floretes de brócoli precocidos en vapor durante 10 minutos encontraron un incremento en el contenido de glucosinatos de hasta de 43%, debido principalmente a una síntesis como respuesta al estrés provocado por el tratamiento, además de que se incrementa la fuerza de las paredes celulares lo que impide la pérdida de estos compuestos.

La disminución del contenido de glucorafano observadas en este experimento muy probablemente no involucren una degradación del glucosinolato, sino que este pasa del tejido vegetal hacia el agua que se utilizó en la cocción debido a una posible ruptura de las membranas y paredes celulares, como lo ha demostrado Volden *et al.* (2009). Así, la evolución en el contenido de glucorafano podría tener los mismos orígenes que la evolución de la variable textura, que ya fueron mencionados.

Cuando se relaciona el contenido de glucorafano con los valores de textura, se obtiene un coeficiente de correlación de -0.97, lo cual indica que conforme el valor de la textura se incrementa (pérdida de firmeza), el contenido de glucorafano desciende. Con los datos de

textura fue posible construir un modelo de regresión lineal que permitió predecir el comportamiento del contenido de glucorafano (Figura 8)

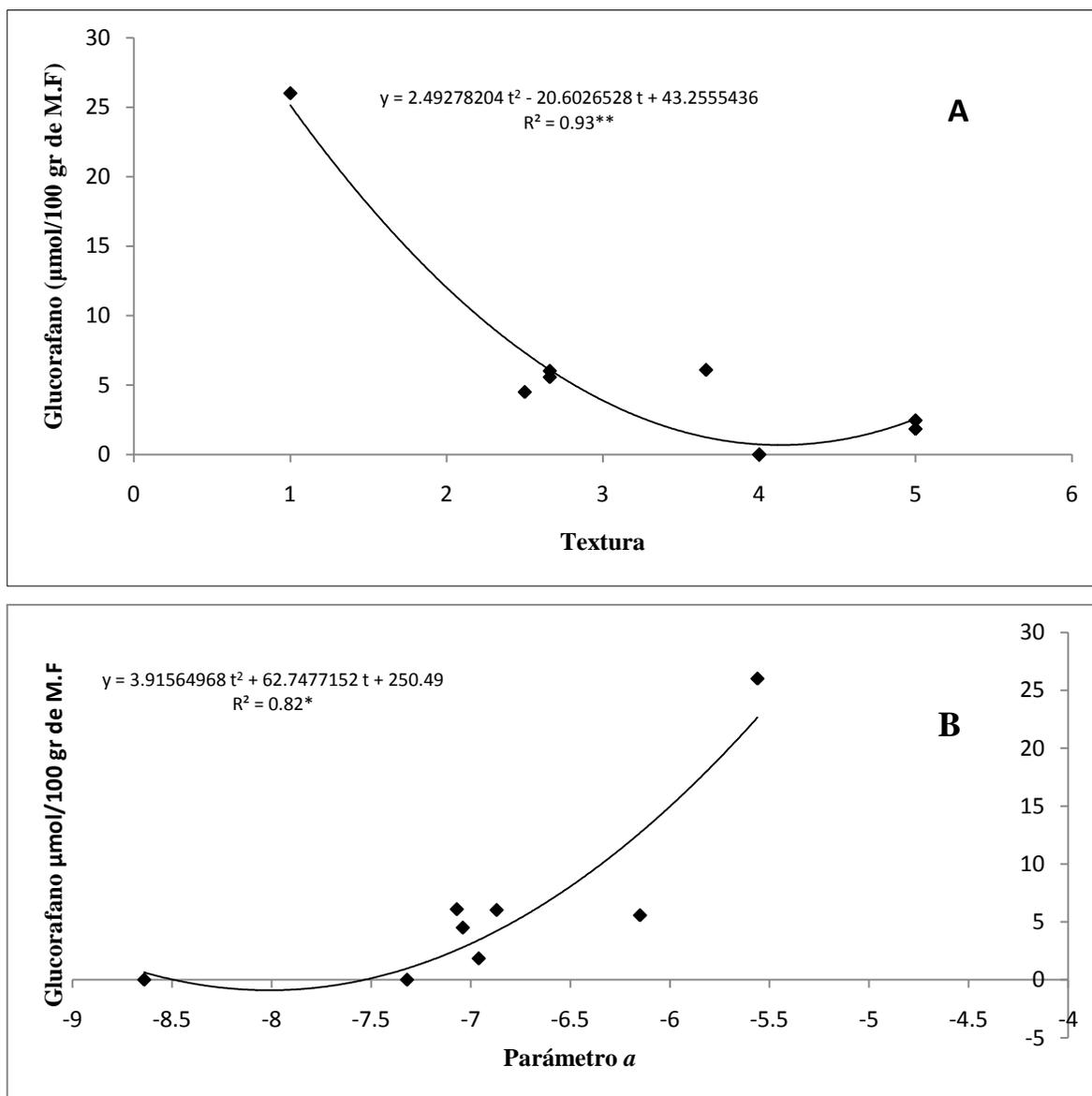


Figura 8. Relación entre textura y contenido de glucorafano (A) y parámetro  $a$  (color) y contenido de glucorafano (B) en floretes de brócoli: Donde:  $y$  = Contenido de glucorafano ( $\mu\text{mol}/100 \text{ g de M.F.}$ ),  $a$  = Valor del parámetro  $a$  del sistema de identificación de colores Hunter Lab.  $t$  = Valor de la textura en una escala de 1 a 5. \* y \*\*  $P \leq 0.05$  y  $0.01$  respectivamente.

Una situación similar ocurrió entre el contenido de glucorafano y el valor del parámetro  $a$  del sistema de identificación de colores Hunter Lab, ambos valores presentaron una correlación positiva (0.82), lo que significaría que una aproximación hacia el color del brócoli fresco (con valores promedio de  $a = -5.65$ ), tendría un mayor contenido de glucorafano.

Cambios tanto en el color como en la textura, indicarían cambios importantes en el contenido de glucorafano. Por un lado, después de un factor de estrés, como podrían ser los tratamientos térmicos, se inicia un proceso de descompartimentación del contenido celular (Marangoni *et al.*, 1996) existiendo una pérdida de dicha molécula. Por otro lado, el inicio de degradación de los pigmentos fotosintéticos debido al calor de los tratamientos provocaría un cambio en la intensidad del verde.

### **3.5. Conclusiones**

Los tratamientos térmicos provocaron modificaciones del color dentro de la gama del verde, medido por el componente  $a$  del Sistema Hunter Lab, los tratamientos con vapor de agua y agua hirviendo por 2 min, ocasionaron valores negativos más grandes (entre -8.4 y -8.6), lo cual indica un color verde más oscuro. De manera similar, todos los tratamientos provocaron una disminución de la textura, en especial los tratamientos con agua a 100 °C por 0.5 min y agua a 60 °C por 60 min. Por otro lado, el contenido de glucorafano, disminuyó en al menos 79 % respecto al testigo sin importar los tratamientos térmicos utilizados. La pérdida de textura y contenido de glucorafano podrían explicarse por la degradación de las paredes celulares del florete, lo cual ocasiona una descompartimentación del glucorafano. Ambas variables mostraron una relación cuadrática ( $R^2 = 0.93$ ). Igualmente el parámetro  $a$  del color y el contenido de glucorafano se correlacionaron ( $R^2 = 0.82$ ). Debido a que los tratamientos ensayados provocaron variaciones significativas en las variables medidas, es necesario encontrar procedimientos de postcosecha que reduzcan las pérdidas de la calidad.

## 4. Capítulo IV.

### **Efecto del glucorafano aislado de floretes de brócoli (*Brassica oleracea*) sobre la germinación de esporas de *Colletotrichum gloeosporioides*.**

#### **4.1. Resumen**

La antracnosis provocada por *Colletotrichum gloeosporioides*, es la enfermedad postcosecha más importante en las áreas productoras de mango en todo el mundo, la estrategia más empleada para el control de la enfermedad, es el tratamiento en precosecha y postcosecha con fungicidas, sin embargo su uso está cada vez más restringido debido al conocimiento público de los residuos potencialmente peligrosos en los frutos. Los glucosinolatos, son productos naturales que contienen nitrógeno y azufre. Estos se encuentran principalmente en las plantas del orden de los Caparales y se ha comprobado su actividad antimicrobiana en otras investigaciones. Para el presente trabajo, se colectaron frutos de mango, con síntomas de antracnosis de los cuales se aisló e identificó el hongo *Colletotrichum gloeosporioides*. Las esporas del patógeno fueron colocadas en PDA, con diferentes concentraciones de glucorafano (1.54, 0.92, 0.46, 0.15, 0.02 y 0  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) aislado de floretes de brócoli. Se midió la germinación de las esporas hasta que el testigo alcanzó el máximo porcentaje de germinación. Las concentraciones de 1.54 y 0.92  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , ocasionaron la inhibición total de la germinación de esporas de *Colletotrichum gloeosporioides* después de 10 horas de evaluación. La concentración letal media ( $CL_{50}$ ) fue de 0.65  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  y la concentración que inhibió por completo la germinación de las esporas fue 0.97  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ . El glucorafano representa una alternativa ecológica para el control de la enfermedad.

**Palabras clave: Glucorafano, Colletotrichum, Postcosecha, Germinación, Mango.**

## 4.2. Introducción

Los hongos patógenos de los frutos en postcosecha causan considerables pérdidas en la producción (Tripathi y Dubey, 2004), esto se debe en gran medida a que los frutos contienen un pH adecuado para el crecimiento de hongos, además de un alto contenido de nutrimentos esenciales para los patógenos (Moss, 2002).

La antracnosis provocada por *Colletotrichum gloeosporioides*, es la enfermedad postcosecha más importante en las áreas productoras de mango en todo el mundo (Dodd y Jeffries, 1997). Esta enfermedad se caracteriza por permanecer en estado quiescente en frutos inmaduros e inducir importantes daños en postcosecha. Actualmente la estrategia más empleada para el control de la enfermedad, es el tratamiento en precosecha y postcosecha con fungicidas, sin embargo su uso está cada vez más restringido debido al conocimiento público de residuos potencialmente peligrosos en los frutos (Yonas y Amare, 2008). Sin embargo los tratamientos con fungicidas químicos se han venido utilizando desde hace varios años en muchos países del mundo (Dodd, Jeffries y Jeger, Management strategies to control latent infection in tropical fruits 1989) y es debido a esto, que existe una alta probabilidad de que los seres humanos, estén expuestos a estos compuestos químicos y a los riesgos que esto implica (Tripathi y Dubey, 2004). Una de las sustancias más comúnmente utilizadas en el control de esta enfermedad es el benomyl, por lo cual el patógeno está sometido a una alta presión de selección por lo cual es posible que aparezcan cepas resistentes a esta molécula (Punnawich Yenjita, 2010). Debido a esto es necesario contar con alternativas inocuas al control químico que puedan incluirse en un manejo integrado de *Colletotrichum gloeosporioides*.

En años recientes hay un creciente interés en encontrar alternativas a los fungicidas químicos que sean seguras para el ambiente y con un riesgo insignificante para la salud del ser humano (Martínez-Romero, *et al.*, 2008). Entre las estrategias que más comúnmente se utilizan está el uso de compuestos naturales obtenidos de plantas como, jasmonatos, aceites esenciales o Glucosinolatos (Tripathi y Dubey, 2004). Los glucosinolatos, son productos naturales que contienen nitrógeno y azufre. Los glucosinolatos se encuentran principalmente en las plantas del orden de los Caparales, que incluyen plantas que son importantes desde el punto de vista agrícola como, las brassicáceas incluyendo el brócoli (Wittstock y Halkier, 2002). Actualmente se conocen cerca de 120 glucosinolatos diferentes que, tienen una estructura básica que incluye una cadena de carbono de tamaño variable derivada de aminoácidos. De

acuerdo con el tamaño de esta cadena, los glucosinolatos se dividen en alifáticos, indólicos y aromáticos. En brócoli se ha encontrado que el glucosinolato, presente en una mayor concentración es el glucorafano, que es un glucosinolato alifático (Van-Eylen *et al.*, 2009). Una vez que este compuesto es hidrolizado, se forma un isotiocinato llamado glucorafanina que ha mostrado un efecto en contra de patógenos que portan los alimentos (Brandi *et al.*, 2006). Este compuesto ha sido probado en contra de patógenos de plantas como *Monilinia laxa* en peras (Mari *et al.*, 1996) y *Penicillium expansum* en el mismo cultivo (Mari *et al.*, 2002), en ambos trabajos los resultados en el control de estos patógenos fue bueno. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto del glucorafano, sobre la germinación de esporas de *Colletotrichum gloeosporioides* aislado de frutos de mango en postcosecha.

### **4.3. Materiales y métodos.**

#### **4.3.1. Aislamiento y pruebas de patogenicidad.**

El aislamiento de *Colletotrichum gloeosporioides* se obtuvo de frutos de mango cv. Manila con síntomas de antracnosis, los cuales se colectaron en madurez de consumo, procedentes del estado de Guerrero.

De los síntomas se tomaron cortes de tejido de la parte terminal de la lesión 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 estéril.

Cada tejido se sembró en medio Papa Dextrosa Agar (PDA). El hongo se purificó mediante un cultivo monosporico en medio Agua Agar (AA) y se incrementó en PDA. Se identificó la especie por medio de las claves morfológicas (Sutton, 1980),(Bailey y Jerger, 1992).

Para comprobar la patogenicidad del hongo, se inocularon frutos de mango cv Manila en madurez de consumo. Los frutos se desinfectaron por inmersión en una solución de hipoclorito de sodio al 2% durante 5 minutos y se enjuagaron con agua destilada estéril dos veces. Del hongo aislado en PDA y de seis días de edad, se preparó con ayuda de un hematocitómetro una suspensión a una concentración de  $1 \times 10^6$  conidios/mL.

La inoculación, se realizó sobre el pericarpio (cáscara), colocando 20  $\mu$ L de la solución de conidios con una micropipeta, sobre heridas realizadas con un palillo de madera estéril. Al testigo, solo se le adicionó agua destilada estéril sobre las heridas. Los frutos inoculados se mantuvieron en cámara húmeda a temperatura ambiente ( $24 \pm 2$  °C) durante 10 días. Al concluir este periodo, se observó la presencia de síntomas y se compararon con los iniciales de

los cuales se realizó el aislamiento, así mismo se realizó el aislamiento del hongo y se corroboró que fuera el mismo que se inoculó. Finalmente el hongo se identificó por medio de claves morfológicas (Sutton, 1980); (Bailey y Jerger, 1992).

#### **4.3.2. Aislamiento de Glucorafano.**

##### **4.3.2.1. Material Vegetal**

Se utilizaron floretes de Brócoli (*Brassica oleracea* cv itálica), cosechados durante el mes de Enero del año 2008, en la ciudad de Celaya Guanajuato México. Los floretes se transportaron en hielo a una temperatura aproximada de 4 °C, hasta el laboratorio de postcosecha del Colegio de Postgraduados Campus Montecillos, en donde fueron procesados inmediatamente después de su llegada.

##### **4.3.2.2. Procesamiento del material vegetal**

Aproximadamente 200 g de floretes de brócoli fueron maceraron en presencia de una mezcla de metanol y agua en proporción 80:20 v/v, en cantidad suficiente para cubrir la muestra. Después de 48 h el contenido se pasó a través de papel filtro de poro medio, la parte sólida retenida en el filtro se volvió a colocar en la mezcla de metanol y agua antes mencionada y la parte líquida filtrada se conservó en un recipiente ámbar, esta operación se repitió en tres ocasiones.

El extracto crudo así obtenido, se concentró en un rotavapor con presión reducida a una temperatura de 60 °C, obteniendo así un volumen conocido de muestra.

##### **4.3.2.3. Separación y aislamiento del glucorafano**

Con la finalidad de separar el glucorafano del extracto crudo de Brócoli, se utilizó un sistema de cromatografía en capa fina cuya fase móvil consistió en una mezcla de metanol, etanol, ácido acético y agua (30:10:10:10; v/v/v/v). Las placas utilizadas fueron de sílica gel 60F256 con indicador de fluorescencia marca Merck®, recortadas a 100 X 100 mm. En cada extremo de la placa se colocaron 2µL de un estándar comercial de glucorafano SIGMA® y en el espacio entre ambos extremos se colocó extracto crudo de brócoli obtenido mediante el procedimiento antes descrito. Una vez que la placa se desarrolló, se calculó la posición del estándar en la placa por medio del coeficiente de retención ( $R_f$ ) por la fórmula:

$$R_f = Z(x)/Z(f) * 100$$

Donde;

Z(x)= Distancia del punto de aplicación a la molécula.

Z(f)= Distancia del punto de aplicación al frente del disolvente.

El valor del  $R_f$  para el estándar comercial del glucorafano fue de 60 y toda la fracción de sílica que tuvo este mismo valor de coeficiente de retención se colectó y se resuspendió en metanol para después centrifugarse por 15 minutos a 5000 g. Posteriormente se colectó el sobrenadante y se colocó en un vaso de precipitado por 10 min en una plancha a 50 °C. Además se hizo pasar gas nitrógeno por el vaso de precipitado con la finalidad de concentrar la muestra. Una vez concentrada la muestra, se resuspendió en un mililitro de metanol grado HPLC.

#### **4.3.2.4. Método para determinar la concentración del glucorafano aislado.**

Se colocaron en una placa de cromatografía de 50 X 50 mm dos volúmenes (2 y 4  $\mu$ L) del estándar de glucorafano, además se colocaron sobre la misma placa 3  $\mu$ L del glucorafano aislado a partir del extracto crudo de brócoli. Una vez que la placa desarrolló, se obtuvieron los valores de altura y área bajo la curva que generó la molécula de glucorafano, por medio de un densitómetro marca Desaga modelo CD-60. Se realizaron tres repeticiones de cada placa. La lectura se realizó a 224 nm, que fue la longitud de onda a la cual el estándar de glucorafano mostró un pico máximo de absorción y un mayor porcentaje de área bajo la curva.

Con los datos de altura y área bajo la curva que generó el densitómetro se ajustó un modelo de regresión, para determinar la concentración del glucorafano aislado del extracto crudo de brócoli a partir de la concentración conocida del estándar de glucorafano.

El modelo encontrado mostró significancia estadística ( $P=0.007$ ) y un coeficiente de determinación de 0.92, el modelo utilizado fue:

$$6.1436383 + (1.119 \times 10^{-15}) (a \times h)^3$$

Donde:

a= área bajo la curva de la molécula de glucorafano.

h= Altura del pico de la molécula de glucorafano.

El modelo resultó adecuado para predecir la concentración del glucorafano aislado del extracto crudo de brócoli, a partir de la concentración del estándar comercial de glucorafano (Capítulo 2 Figura 6).

La concentración del glucorafano aislado de brócoli, calculado por medio del modelo de regresión lineal fue de 6.15  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , con una pureza del 91.36%.

### 4.3.3. Evaluación del efecto del glucorafano sobre la germinación de esporas de *Colletotrichum gloeosporioides*.

#### 4.3.3.1. Bioensayos

En recipientes translucidos con una capacidad de 300  $\mu\text{L}$  se colocaron 150  $\mu\text{L}$  de medio de cultivo PDA. Antes de que el medio de cultivo solidificara se mezcló con 50  $\mu\text{L}$  de glucorafano aislado de brócoli, diluido en metanol de tal manera que se alcanzaran las concentraciones utilizadas en los bioensayos (Cuadro 5).

Cuadro 5. Concentraciones de glucorafano utilizadas para determinar el efecto de esta molécula sobre la germinación de esporas de *C.gloeosporioides*.

Tratamiento	Cantidad de Metanol ( $\mu\text{L}$ )	Cantidad de Glucorafano aislado de Brócoli ( $\mu\text{L}$ )	Concentración Final de glucorafano en un volumen de 50 $\mu\text{L}$	Concentración Final de Glucorafano en un volumen de 150 $\mu\text{L}$ de PDA + 50 $\mu\text{L}$ de la solución de glucorafano
1	0	50	6.15 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	1.54 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
2	20	30	3.69 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	0.92 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
3	35	15	1.84 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	0.46 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
4	45	5	0.61 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	0.15 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
5	49.5	0.5	0.06 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	0.02 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
6	50	0	0	0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$

Después se colocó una solución de esporas de *C. Gloeosporioides*, sobre cada uno de los recipientes. Los recipientes se colocaron en cámara húmeda donde fueron encubados por 5, 7 y 10 horas a  $28\pm 3^{\circ}\text{C}$ . De cada concentración de glucorafano se realizaron tres repeticiones.

#### **4.3.3.2. Variables y análisis estadísticos.**

Se cuantificó el número de esporas germinadas de *C. Gloeosporioides* a las 5, 7 y 10 horas después de que la solución de esporas se colocó en los recipientes de PDA conteniendo la concentración de glucorafano ensayada. A los porcentajes de germinación obtenidos se les realizaron pruebas de normalidad y de homostadidad por medio del programa estadístico SAS V.9 para Windows, una vez verificado, que los datos se comportaron normales se realizaron análisis de varianza y pruebas múltiples de medias de Tukey ( $P=0.05$ ). El área bajo la curva que generó la germinación de las esporas, fue calculado para cada una de las repeticiones por el método de los trapezoides (Liengme, 2002) y fue sometido a análisis de varianzas y pruebas múltiples de medias de Tukey ( $P=0.05$ ) y con estos datos se calculó la efectividad del glucorafano por medio de la fórmula  $y=(t_t-t_x/t_t)(100)$ ; Donde  $y$ =efectividad expresada en porcentaje,  $t_t$ =Área bajo la curva promedio del tratamiento testigo y  $t_x$ = Área bajo la curva del tratamiento a evaluar . Además se realizaron modelos de regresión lineal y se utilizó el comando solver de Microsoft Excel 2007® para determinar la efectividad media ( $CL_{50}$ ).

#### **4.4. Resultados y discusión**

El análisis de varianza mostró diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de germinación de las esporas en función de las concentraciones de glucorafano ensayadas a lo largo del tiempo (Cuadro 6).

Cuadro 6. Germinación de esporas de *Colletotrichum gloeosporioides* en diferentes concentraciones de glucorafano aislado de brócoli.

Dosis	Germinación <sup>†</sup> (%) 5 h	Germinación <sup>†</sup> (%) 7 h	Germinación <sup>†</sup> (%) 10 h
1.54 µg/µL	0 a	0 a	0 b
0.92 µg/µL	0 a	2.5 a	8 b
0.46 µg/µL	1.5 a	4.5 a	60 a
0.15 µg/µL	2 a	9.5 a	82.5 a
0.02 µg/µL	1.5 a	11 a	77 a
0 µg/µL	2.5 a	11 a	85.5 a
Probabilidad	0.14	0.08	0.0001
r <sup>2</sup>	0.67	0.74	0.98

<sup>†</sup>Letras iguales no indican diferencias significativas Tukey (P=0.05). Las comparaciones entre medias se realizaron por columnas.

El porcentaje de germinación más alto en el testigo se presentó a las diez horas después de que las esporas se colocaron en los recipientes con PDA, este porcentaje de germinación para esporas de *C. Gloeosporioides*, es similar al encontrado por otros autores (Gutiérrez-Alonso, *et al.*, 2001) quienes reportan un porcentaje de germinación que oscila del 81.9% al 83.2%. A las 10 h, se observó una diferencia estadísticamente significativa en el porcentaje de esporas germinadas en función de la dosis de glucorafano utilizada (Figura 9).

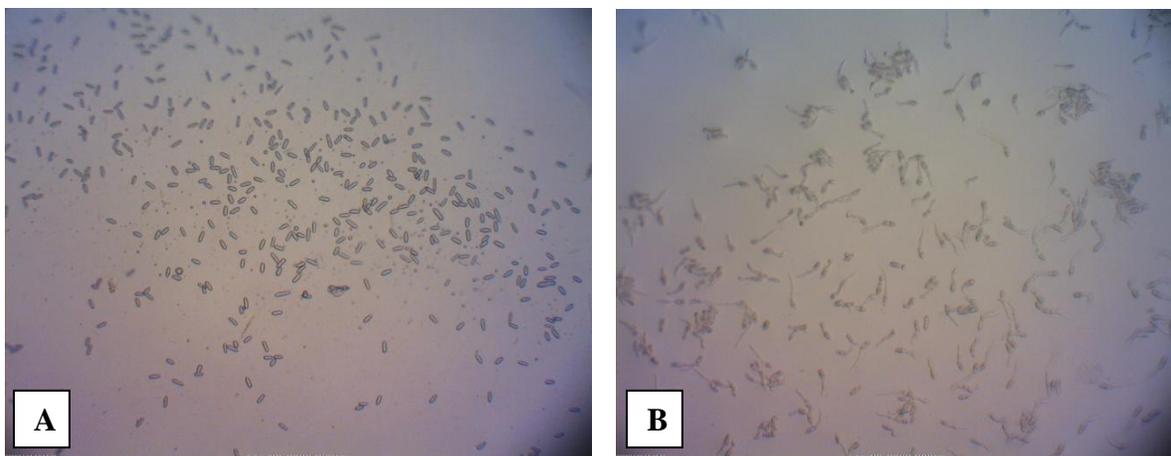


Figura 9. Efecto de diferentes concentraciones de glucorafano aislado de brócoli sobre la germinación de esporas de *Colletotrichum gloeosporioides* aislados de frutos de mango. A) Esporas de *Colletotrichum gloeosporioides* en PDA durante 10 horas con una concentración de glucorafano de 1.54  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  (tratamiento testigo). B) Esporas de *Colletotrichum gloeosporioides* en PDA durante 10 horas con una concentración de glucorafano de 0  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ .

En las concentraciones de 1.54 y 0.92  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , se observó un porcentaje de germinación de cero y ocho respectivamente, mientras que el tratamiento testigo se observó un porcentaje de germinación superior al 80%. El efecto de los glucosinolatos en contra de algunos patógenos ha sido observado por otros autores. Por ejemplo (Lazzeri *et al.*, 1993), encontraron una actividad de algunos de estos compuestos en contra de nematodos del género *Heterodera*, mientras que (Manici, *et al.*, 1997) encontraron que algunos glucosinolatos tienen actividad en contra de hongos fitopatógenos.

El área bajo la curva de germinación de esporas, mostró diferencias significativas entre tratamientos ( $P \geq 0.001$ ). Las concentraciones más altas resultaron en un menor porcentaje de germinación lo cual generó curvas de área menor (Figura 10).

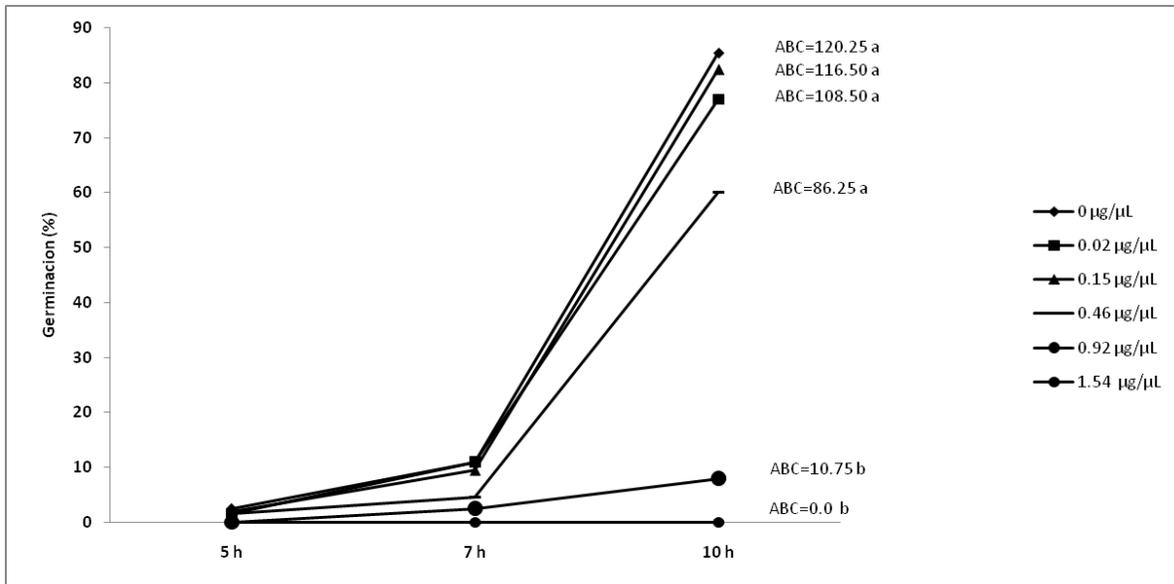


Figura 10. Curvas de germinación de esporas de *Colletotrichum gloeosporioides* a través del tiempo. ABC=Area bajo la curva de germinación de esporas.

Por otro lado el modelo de regresión lineal permitió estimar el porcentaje de efectividad del glucorafano en contra de las esporas de *Colletotrichum gloeosporioides*, con significancia estadística y coeficiente de determinación alto ( $P=0.001$  y  $r^2=0.99$ ). El modelo utilizado fue.

$$Y = -8.07085022 \text{ Con} + 119.648813 \text{ Con}^2 - 13.259505 \text{ Con}^3 + 5.52744929$$

Donde:

Y= Efectividad en porcentaje.

Con= Concentración de glucorafano aislado de brócoli en µg/µL.

El modelo mostró que la efectividad media ( $CL_{50}$ ) fue de 0.65 µg/µL, mientras que la concentración mostró una efectividad del 100% ( $CL_{100}$ ) fue de 0.97 µg/µL (Figura 11).

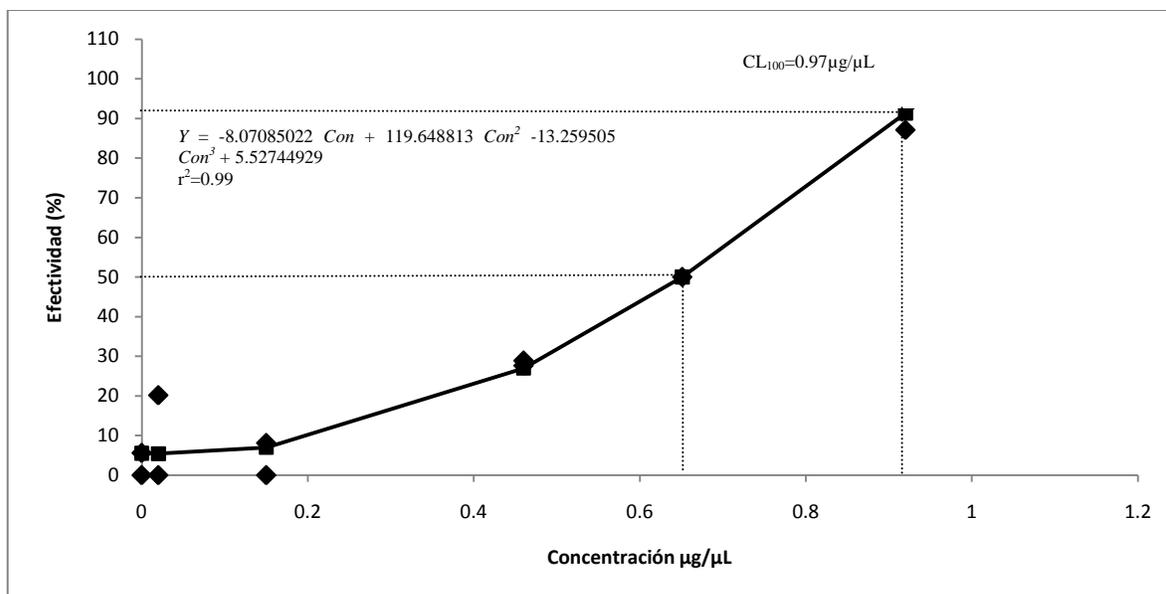


Figura 11. Modelo de regresión lineal para estimar la efectividad del glucorafano en contra de esporas de *Colletotrichum gloeosporioides*.

El efecto inhibitorio sobre la germinación de esporas de hongos fitopatógenos, ha sido observado en otros glucosinolatos, por ejemplo (Maria, *et al.*, 2008), encontraron un efecto inhibitorio del 50% en la germinación de esporas de *M. laxa*, cuando estas fueron sometidas a vapores de diferentes isotiocinatos en concentraciones de 0.04 hasta 0.27 mg L<sup>-1</sup>.

Debido a la actividad antifúngica del glucorafano, podría ser utilizado como un tratamiento en postcosecha, con el fin de disminuir la incidencia de antracnosis provocada por *Colletotrichum gloeosporioides* en frutos de mango en postcosecha.

#### 4.5. Conclusiones

El glucorafano aislado del brócoli mostró un fuerte efecto inhibitorio sobre la germinación de esporas de *Colletotrichum gloeosporioides*. La concentración letal media fue de 0.65 µg/µL, mientras que la CL<sub>100</sub> fue de 0.97 µg/µL. Este efecto se ha comprobado sobre otros hongos fitopatógenos en diferentes trabajos de investigación. El conocimiento acerca del efecto de metabolitos secundarios de plantas, sobre las esporas de los hongos podría contribuir a encontrar nuevas alternativas en el manejo de *Colletotrichum gloeosporioides* en postcosecha de mango.

## 5. Bibliografía Citada

**Aguilar CN, ML Reyes, H De la Garza, JC Contreras (1999)** Aspectos bioquímicos de la relación entre el escaldado TB-TL y la textura de vegetales procesados. Revista de la sociedad quimica de México. 43:54-62.

**Aldrich S (2008)** SIGMA-Aldrich México. Catalogo de productos. Disponible en <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search/ProductDetail/SIGMA/S6317> (23 de Abril de 2008).

**Andersen M, KR Markham (2006)** Flavonoids chemistry, biochemistry and applications CRC press. Florida, USA. 319-370 pp.

**Bailey JA, MJ Jerger (1992)** Colletotrichum; Biology, Pathology and Control . C.A.B. International.

**Bautista-Martínez N, L Soto-Rojas, R Pérez-Pacheco (2009)** Tópicos Selectos de Estadística Aplicados a la Fitosanidad. Colegio de Postgraduados. México.

**Bonner J. (1950)** Plant biochemistry. New york: Academic Press. New York, USA. 537 p.

**Botting N P, A A Robertson, J J Morrison (2007)** The synthesis of isotopically labelled glucosinolates for analysis and metabolic studies. Journal of labelled compounds & radiopharmaceuticals 56:260-263.

**Botting NP, AA Robertson, JJ Morrison (2007)** The synthesis of isotopically labelled glucosinolates for analysis and metabolic studies. Journal of labelled compounds & radiopharmaceuticals 56: 260-263.

**Bourne M C (1989)** Quality factors of fruits and vegetables. Chemistry and technology. in A. C. Society, Applications of chemical kinetics theory to the rate of thermal softening of vegetable tissue.

**Brandi G, G Amagliani, GF Schiavano, M De Santi, M Sisti (2006)** Activity of Brassica oleracea leaf juice on foodborne pathogenic bacteria. Journal of Food Protection. 9:2274–2279.

**Breme K, X Fernandez, U J Meierhenrich, H Brevard, D Joulain (2007)** Identification of new, odor-active thiocarbamates in cress extracts and structure activity studies on synthesized homologues. *Journal of agricultural and food chemistry* 55:1932-1938.

**Cheng-Guo J, Chiao-Jion X, Jia W, Jing G, Gao-Feng Y, Bing-Liang W, Qiao-Mei W (2009)** Effect of modified atmosphere packaging on visual quality and glucosinolates. *Food Chemistry* 114: 28-37.

**Chun-Hsien L, C Chi-Yue (2005).** Textural change and antioxidant properties of broccoli under different cooking treatments. *Food Chemistry* 90:9-15.

**Chun-Hsien L, C Chi-Yue (2005)** Textural change and antioxidant properties of broccoli under different cooking treatments. *Food Chemistry* 90: 9-15.

**Cieslik E, T Leszczynska, A Filipiak-Florkiewicz, E Sikora, P M Pisulewski (2007)** Effects of some technological processes on glucosinolate contents in cruciferous vegetables. *Food chemistry* 105:976-981.

**Clifford M N, J E Brown (2006)** Dietary flavonoids and health- broadening the perspective. *In* *Flavonoids chemistry, biochemistry and applications*. Andersen, & K. R. Markham (eds), CRC press. 319-370 pp.

**DAVIS (2010)** UC DAVIS. Postharvest technology research and information center. Disponible en <http://postharvest.ucdavis.edu/Produce/ProduceFacts/Espanol/Brocoli.shtml> (Mayo del 2010).

**Dekker MR, Verkerk, WM Jongen (2000)** Predictive modeling of health aspects in the food production chain: a case study on glucosinolates on cabbage. *Trends in Food Science and Technology* 11: 174-181.

**Dekker M, R Verkerk, WM Jongen (2000)** Predictive modeling of health aspects in the food production chain: a case study on glucosinolates on cabbage. *Trends in Food Science and Technology* 11:174-181.

**Dodd JC, P Jeffries (1997)** Fruit diseases. *In* Litz RE. The Mango: Botany, production and uses. UK: CAB International. pp. 257-280.

**Dodd JC, P Jeffries, MJ Jeger (1989)** Management strategies to control latent infection in tropical fruits. *Asp. Appl. Biol*, 20:49-56.

**Duncan A Z Fuller, B Ratcliffe (2007)** Effect of cooking vegetables on the subsequent hydrolysis and metabolic fate of glucosinolates. *Proceedings of the nutrition society*, 66:69-81.

**Field B G Cardon, M Traka, J Botterman, G Vancanneyt, R Mithen (2004)** Glucosinolates and amino acid biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 135: 828-839.

**Fimognari C, H Patrizia (2007)** Sulforaphane as a promising molecule for fighting cancer. *Mutation Research* 90-104.

**Force L E, T J O'Hare, L S Wong, D E Irving (2007)** Impact of cold storage on glucosinolate levels in seed-sprouts of broccoli, rocket, white radish and kohlrabi. *Postharvest biology and technology* 44:175-178.

**Fuller Z, P Louis, A Mihajlovski, V Rungaparnestry, B Ratcliffe, A J Duncan (2007)** Influence of cabbage processing methods and prebiotic manipulation of colonic microflora on glucosinolate breakdown in man. *British journal of nutrition* 98:364-372.

**Gasper A V, M Traka, J R Bacon, D A Barrett, R F Mithen (2007)** Consuming does not induce genes associated with xenobiotic metabolism and cell cycle control in human gastric mucosa. *Journal of nutrition* 137:1718-1724.

**Gasper A V, M Traka, JR Bacon, DA Barrett, RF Mithen (2007)** Consuming does not induce genes associated with xenobiotic metabolism and cell cycle control in human gastric mucosa. *Journal of nutrition* 137:1718-1724.

**Glyszczynska-Swiglo A, E Ciska, K Pawlak-Lemanska, J Chmielewski, T Borkowski, B Tyrakowska (2006)** Changes content of health-promoting compounds and antioxidant activity of broccoli after domestic processing. *Food additives and contaminants* 11:1088-1098.

**Glyszczynska-Swiglo A, E Ciska, K Pawlak-Lemanska, J Chmielewski, T Borkowski, B Tyrakowska (2006)** Changes content of health-promoting compounds and antioxidant activity of broccoli after domestic processing. . Food additives and contaminants. 11:1088-1098.

**Gutiérrez-Alonso JG, D Nieto-Angel, D Téliz-Ortiz, E Zavaleta-Mejia, H Vaquera-Huerta, T Martínez-Damían, F Delgadillo-Sanchez (2001)** Características de crecimiento, germinación, esporulación y patogenicidad de aislamientos de *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. obtenidos de frutos de mango (*mangifera indica* L). Revista Mexicana de Fitopatología. 1:90-93.

**Hansen B G, D J Kliebenstein, B A Halkier (2007)** Identification of flavin-monooxygenase as the S-oxygenating enzyme in aliphatic glucosinolate biosynthesis in *Arabidopsis*. Plant Journal 50:902-910.

**Hopkins W G (1999)** Introduction to plant physiology. John Wiley & Sons, Inc.

**INEGI (2010)** Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática. Banco de información económica de México. Disponible en <http://dgcnesyp.inegi.org.mx/cgi-win/bdieintsi.exe/CONTN> (Enero del 2010).

**Jones RB (2007)** Effects of postharvest handling conditions and cooking on anthocyanin, lycopene and glucosinolate content and bioavailability in fruits and vegetables. New Zealand journal of crop and horticultural science 35:219-227.

**Kroymann J, S Textor, J Tokuhsa, K Falk, S Bartram, J Gershenzon, T Mitchell-Olds (2001)** Glucosinolate composition is part of the methionine chain elongation pathway. Plant Physiology 127:1077-1088.

**Lau M H, J Tang, B G Swanson (2000)** Kinetics of textural and color changes in green asparagus during thermal treatments. Journal of Food Engineering 45:231-236.

**Lau MH, J Tang, BG Swanson (2000)** Kinetics of textural and color changes in green asparagus during thermal treatments. Journal of Food Engineering. 45:231-236.

**Lazzeri L, R Tacconi, S Palmieri (1993)** In vitro activity of some glucosinolates and their reaction products toward a population of the nematode *Heterodera schachtii*. *Journal Agriculture and food chemistry* 41:825-829.

**Liengme BV (2002)** A guide to Microsoft Excel for scientists and engineers. (2 ed.). Butterworth-Heinemann.

**Lúquez B, V Claudia, JM Aguilera-Radic (2005)** Medida digitalizada de la evolución del color en aceitunas según el grado de madurez del fruto. *FCA UNCuyo*. 2:33-40.

**MacKinney G, CA Weast (1940)** Color changes in green vegetables. *Industrial and Engineering Chemistry*. 3:392-395.

**Mandelova L, J Totusek (2007)** Brócoli juice treated by high pressure: chemioprotective effects of sulforaphane and indole-3-carabinol. *High pressure research* 27:151-156.

**Manici M, L Lazzeri, S Palmieri (1997)** In vitro fungitoxic activity of some glucosinolates and their enzyme-derived products toward plant pathogenic fungi. *Journal Agriculture and food chemistry*. 45: 2768-2773.

**Marangoni AG, T Palma, TW Stanley (1996)** Membrane effects in postharvest physiology. *Postharvest biology and technology*. 7:193-217.

**Mari M, Leoni O, R Lori, T Cembali (2002)** Antifungal vapour-phase activity of allyl isothiocyanate against *Penicillium expansum* on pears. *Plant Pathology*.51:231–236.

**Mari M, O Leoni, R Lori, A Marchi (1996)** Bioassay of glucosinolate derived isothiocyanates against post harvest pear pathogens. *Plant Pathology*. 45:753–760.

**Maria M, O Leoni, R Bernardi, F Neri, S Palmieri (2008)** Control of brown rot on stonefruit by synthetic and glucosinolate-derived isothiocyanates. *Postharvest Biology and Technology*. 47:61-67.

**Martin N, C Muller (2007)** Induction of plant responses by sequestering insect: Relation ship of glucosinolate concentration and mirosinase activity. *Basic and applied ecology* 8:13-25.

**Martínez-Romero D, M Serrano, G Bailén, F Guillén, PJ Zapata, JM Valverde, S Castillo, MD Fuentes (2008)** The use of a natural fungicide as an alternative to preharvest synthetic fungicide treatments to control lettuce deterioration during postharvest storage. *Postharvest Biology and Technology*. 47:54–60.

**Mendoza F, P Dejmek, JM Aguilera (2006)** Calibrated color measurement of agricultural foods using image analysis. *Postharvest Biology and Tecnology* 41:285-295.

**Moss M O (2002)** Mycotoxin review 1. *Aspergillus and penicillium. mycologist.* 16:116-119.

**Mothies, K. (1979).** Historical Introduccion. *In Encyclopedia of plant physiology new series* Vol 8. E. A. Bell, y B. V. Charlwood (eds), 1-10 pp.

**Mueller C, N Sieling (2006)** Effects of glucosinolate and mirosinase levels in *Brassica juncea* on a glucosinolate-sequestering hervivore-and vice versa. *Chemoecology* 16:191-201.

**Mulinacci N, C Bardazzi, A Romani, P Pinelli, F Vincieri, A Costantini (1999)** HPLC-DAD and TLC-Densitometry for quantification of hypericum perforatum L. extracts. *Chromatographia.* 3: 197-201.

**Noé-Aguilar C, M Reyes, H De la Garza, JC Contreras (1999)** Aspectos bioquímicos de la relación entre el escaldado TB-TL y la textura de vegetales procesados. *Revista de la sociedad quimica de México.* 2:54-62.

Panglossi, HV (2006) *New developments in antioxidants research.* Nova publishers.

**Papadakis SE, S Abdul-Malek, RE Kamdem, KL Yam (2000)** A versatile and inexpensive technique for measuring colors of foods 54: 48-51.

**Poyton, C. (1996)** *A technical Introduction to Digital Video.* Prentice Hall, Toronto Canada.

**PRODUCE (2003)** Cadena Agroalimentaria de Brócoli. Disponible en: <http://www.snitt.org.mx/pdfs/demanda/brocoli.pdf> (Enero 2010).

**Punnawich-Yenjita MI (2010)** Fungicidal activity of compounds extracted from the pericarp of *Areca catechu*. *Postharvest Biology and Technology.* 55:129-132.

**Rangkadilo N, ME Nicola, RN Bennet, DR Eagling, RR Premier, PW Taylor (2002)** Developmental changes of sinigrin and glucoraphanin in three *Brassica* species (*Brassica nigra*, *Brassica juncea* and *Brassica oleracea* var. *italica*). *Scientia Horticulturae* 96: 11-26.

**Rangkadilok N, ME Nicola, RN Bennet, DR Eagling, RR Premier, PW Taylor (2002)** Developmental changes of sinigrin and glucoraphanin in three Brassica species (*Brassica nigra*, *Brassica juncea* and *Brassica oleracea* var. *italica*). *Scientia Horticulturae*. 96:11-26.

**Rangkadilok N, B Tomkins, M E Nicolas, R R Premier, R N Bennett, D R Eagling, P W Taylor (2002)**. The effect of postharvest and packaging treatments on glucoraphanin concentration in broccoli (*Brassica oleracea* var *italica*). *Journal of agriculture and food chemistry* 50:7386-7391.

**Rask L, E Andreasson, B Ekbon, S Eriksson, B Pontoppidan, J Meijer (2000)**. Myrosinase: gene family evolution and herbivore defense in Brassicaceae. *Plant molecular biology* 42:93–113.

**Rodrigues AS, EA Rosa (1999)** Effect of post-harvest treatments on the level of glucosinolates in broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*). *Journal of the science of food and agriculture* 79: 1028-1032.

**Rungapamestry V, AJ Duncan, Z Fuller, B Ratcliffe (2007)** Effect of cooking brassica vegetables on the subsequent hydrolysis and metabolic fate of glucosinolates. *Proceedings of the Nutrition Society* 66:69-81.

**Sivakumar G, A. Aliboni, L Bacchetta (2007)** HPLC screening of anti-cancer sulforaphane from important European Brassica species. *Food chemistry*. 4:1761-1764.

**Sixue C, B Larsen-Petersen, C Erik Olsen, A Schulz, B Ann-Halkier (2001)** Long-Distance phloem transport of glucosinolate in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 127:194-201.

**Surmacka S A (2002)** Texture is a sensory property. *Food Quality and Preference* 13: 215-225.

**Surmacka-Szczesniak A (2002)** Texture is a sensory property. *Food Quality and Preference*. 13:215-225.

**Sutton BC (1980)** The Coelomycetes: Fungi Imperfecti with Picnidia, Acervuli and Stromata. Commonwealth Mycological Institute.

**Tanaka T, S Miyamoto, R Suzuki, Y Yasui (2006)** Chemoprevention of colon carcinogenesis by dietary non-nutritive compounds. *Current topics in nutraceutical research* 4:127-151.

**Tijskens L M, E P Schijvens, E S Biekman (2001)** Modelling the change in colour of broccoli and green beans during blanching. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 2:303-313.

**Tijskens LM, EP Schijvens, ES Biekman (2001)** Modelling the change in colour of broccoli and green beans during blanching. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 2:303-313.

**Touchstone JC (1992)** Practice of thin layer chromatography, 3th. U.S.A.

**Tripathi P, NK Dubey (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.

**Ulmer B J, L M Dossall (2006)** Glucosinolate profile and oviposition behavior in relation to the susceptibilities of Brassicaceae to cabbage seedpod weevil. *Entomologia experimentalis et applicata* 121:203-213.

**Van D, I Oey, M Hendrick, A Van (2007)** Kinetics of stability of broccoli (*Brassica oleracea* cv. *Italica*) myrosinase and isothiocyanates in broccoli juice during pressure/temperature treatments. *Journal of agricultural and food chemistry* 6: 2163-2170.

**Van-Eylen D, N Bellostas, BW Strobel, I Oey, M Hendrickx, A Van Loey, H Sorencen, J C Sorencen (2009)** Influence of pressure/temperature treatments on glucosinolate conversion. *Food Chemistry* 112: 646-653.

**Vaughn S F, D E Palmquist, S M Duval, M A Berhow (2006)** Herbicidal activity of glucosinolate-containing seedmeals. 54:743-748.

**Velasco P, ME Cartea, C Gonzales, M Villar, A Ordas (2007)** Factors affecting the glucosinolate content of kale (*Brassica oleracea acephala* group). *Journal of agricultural and food chemistry* 3: 955-962.

**Volden J, GI Borge, M Hansen, T Wicklund, GB Bengtsson (2009)** Processing (blanching, boiling, steaming) effects on the content of glucosinolates and antioxidant-related parameters in a cauliflower (*Brassica oleracea* L. ssp. botrytis). *LWT - Food Science and Technology* 42: 63-73.

**Wade KL, IJ Garrard, JW Fahey (2007)** Improved hydrophilic interaction chromatographic method for the identification and quantification of glucosinolates. *Journal of chromatography* 1-2: 469-462.

**Wittstock U, Halkier BA (2002)** Glucosinolate research in the Arabidopsis era. *Trends in Plant Science* 6:263-270.

**Yam KL, Papadakis S (2004)** A simple digital imaging method for measuring and analyzing color of food surfaces. *Journal of Food engineering*. 61:137-142.

**Yonas K, Amare A (2008)** Postharvest biological control of anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*). *Postharvest Biology and Technology*. 50:8-11.

**Yu-Bin J, W Xiao-Dan, W Mei-Xu, W Zhi-Ju (2007)** Effects of glucosinolates in broccoli on antioxidant function of S-180 bearing mice. *Chinese Journal of natural medicines* 5:134-136.