

Efecto del jugo de brócoli y cambios químicos en la inhibición de *Alternaria* en arúgula mínimamente procesada*

Effect of broccoli juice and chemical changes in the inhibition of *Alternaria* in minimally processed arugula

María Antonia Flores-Córdova¹, Ma Teresa Martínez-Damián^{2§}, Juan Enrique Rodríguez-Pérez², Daniel Nieto-Ángel³, María Teresa Colinas-León² y Juan Martínez Solís²

¹Universidad Autónoma Chapingo- Departamento de Horticultura. Carretera México- Texcoco km 38.5. Chapingo, México. C. P. 56230. Tel: 6142424330 (mariflor_556@hotmail.com). ²Departamento de Fitotecnia. Universidad Autónoma Chapingo. Carretera México- Texcoco, km 38.5. C. P. 56230. Chapingo, México. Tel: 595 952 1500, Ext. 6163, 6133, 6389, 1616. (erodriguezx@yahoo.com; dnieto@colpos.com; lozcol@gmail.com). ³Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. Carretera México- Texcoco km 36.5. 56230, Montecillo, Texcoco, Estado de México. Tel: 595 951 0279. [§]Autor para correspondencia: teremdl3@gmail.com.

Resumen

El brócoli es una especie de la familia de las *Brassicas*, que posee gran cantidad de glucosinolatos los cuales tienen propiedades antifúngicas y han sido probados *in vitro* contra de diferentes hongos. En este estudio se probó el efecto del jugo de brócoli (GLs) *in vitro* y en vivo en la inhibición de *Alternaria* y conservación de la calidad de arúgula. Para el ensayo *in vitro* se utilizó medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA) y concentraciones de 0.15, 0.11, 0.07, 0.04, 0.01 y 0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ del jugo de brócoli, para evaluar su efecto en la germinación de esporas de *Alternaria alternata*. Se evaluó la fisiología postcosecha de Arúgula almacenadas a 0.4 °C y temperatura ambiente por 15 días, después de la inoculación con esporas de *Alternaria* (1×10^6). Los tratamientos fueron: 2.98 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de GLs + inóculo, 1.49 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de GLs + inóculo, con solución de esporas de *Alternaria* y el testigo. Cada tercer día se evaluó la severidad del daño por hongo. Las variables medidas fueron vitamina C, capacidad antioxidante y fenoles. Los resultados obtenidos mostraron que la concentración mínima de jugo de brócoli *in vitro* para obtener 100% de inhibición fue de 0.07 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, en vivo la concentración de 2.98 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y la temperatura de 0 °C fueron las que conservaron los parámetros de calidad en

Abstract

Broccoli is a species of the Brassica family, which has lots of glucosinolates which have antifungal properties and have been tested *in vitro* against different fungi. In this study the effect of broccoli juice (GLs) *in vitro* and live in the inhibition of *Alternaria* and preservation of the quality of arugula tested. For testing *in vitro*, we used culture in a medium potato dextrose agar (PDA) and concentrations of 0.15 was used, 0.11, 0.07, 0.04, 0.01 and 0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ of broccoli juice to evaluate its effect on the germination of spores of *Alternaria alternata*. The postharvest stored physiology was evaluated at 0.4 °C and room temperature for 15 days after inoculation with spores of *Alternaria* (1×10^6). The treatments were: 2.98 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of GLs + inoculum, 1.49 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of GLs + inoculum, with spores of *Alternaria* solution and the control. Every third day, the severity of the damage was evaluated by fungus. The variables measured were vitamin C, antioxidant capacity and phenolics. The results showed that, the lowest concentration of broccoli juice *in vitro* for 100% inhibition was 0.07 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, on live the concentration of 2.98 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and a temperature of 0 °C were the parameters retained quality and condition to storage. So, it is concluded that broccoli juice (GLs) can be used to control postharvest *Alternaria*.

* Recibido: febrero de 2015
Aceptado: mayo de 2015

excelentes condiciones hasta el almacenamiento. Por lo que se concluye que el jugo de brócoli (GLs) puede ser usado en postcosecha para el control de *Alternaria alternata*.

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

Introducción

La calidad y seguridad microbiológica de los productos vegetales frescos cortados es un aspecto esencial en su procesamiento y distribución. Su contaminación puede ocurrir en cualquier punto entre el cultivo y el consumo de los mismos. Para lograr productos de alta calidad que cumplan con estos requisitos es necesaria la puesta en práctica de métodos de conservación con bajo impacto sobre el alimento y a menudo una combinación inteligente de ellos (González-Aguilar, 2005). Hoy los consumidores demandan productos vegetales como la arúgula, (*Eruca sativa* Mill.), perteneciente a la familia *Brassicaceae*, originaria de la región mediterránea, y que se distribuye en todo el mundo.

Sin embargo, esta es susceptible al daño causado por *Alternaria*, hongo patógeno causante de la pérdida de calidad del producto, acortándose su vida postcosecha por lo que se ha considerado el uso de la refrigeración durante el almacenamiento (Kader, 2003), este método ha sido eficiente en la disminución de las alteraciones mecánicas, microbiológicas y biológicas, la cual se ha convertido en un método ampliamente utilizado durante el manejo postcosecha (Tonoiven, 2004).

Los glucosinolatos (GLs) son una serie de compuestos del metabolismo secundario de las plantas principalmente del orden de los *Capparales*, familia *Brassicales*. Los GLs intactos tienen actividad biológica limitada, se incrementa cuando son hidrolizados a isotiocianatos (ITCs). El brócoli es la principal fuente natural del isotiocianato sulforafano (1-isotiocianato-4-(metilsulfinil)-butano), su precursor glucorafanina constituye más de 80% de los glucosinolatos totales presentes en este vegetal (Campas-Baypoli *et al.*, 2009). Se ha comprobado que los isotiocianatos tienen la propiedad de controlar el crecimiento de microorganismos patógenos tales como *Fusarium oxysporum*, (Smolinska *et al.*, 2003), *Alternaria rot* (Troncoso *et al.*, 2005), *Rhizopus nigricans* (Mucete *et al.*, 2006) *Penicillium expansum*

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

Introduction

The quality and microbiological safety of fresh cut plant products is an essential aspect in processing and distribution. Contamination can occur at any point between the cultivation and consumption. In order to achieve high quality products that meet these requirements, the implementation of conservation methods with low impact on the food and often a clever combination of them is necessary (González-Aguilar, 2005). Today, consumers demand products such as vegetable arugula (*Eruca sativa* Mill.), Belonging to the mustard family, native to the Mediterranean region, and distributed worldwide.

However, this is susceptible to damage caused by *Alternaria*, pathogenic fungus causing the loss of product quality, shortening their vase life by what has been considered the use of refrigeration during storage (Kader, 2003), this method has been effective in reducing mechanical, microbiological and biological alterations, which has become a widely used method for postharvest handling (Tonoiven, 2004).

Glucosinolates (GLs) are a series of compounds of the secondary metabolism of plants primarily in the range of *Capparales*, *Brassicales* family. Intact GLs have limited biological activity, increases as are hydrolyzed to isothiocyanates (ITCs). Broccoli is the primary natural source of sulforaphane isothiocyanate (1-isothiocyanato-4-(methylsulfinyl) butane), its precursor glucoraphanin, constitutes over 80% of total glucosinolates present in the plant (Campas-Baypoli *et al.*, 2009) It has been found that isothiocyanates have the property of controlling the growth of pathogenic microorganisms such as *Fusarium oxysporum*, (Smolinska *et al.*, 2003), *Alternaria rot* (Troncoso *et al.*, 2005), *Rhizopus nigricans* (Mucete *et al.*, 2006) *Penicillium expansum* (Mari *et al.*, 2002) and *Aspergillus spp.*, disease-causing agents in food and decomposition thereof (Viuda-Martos *et al.*, 2007).

Some authors have reported that the mechanism by which ITCs inhibit the growth of fungi and microorganisms still not well known (Báez-Flores *et al.*, 2008); however, some hypotheses suggested that these compounds are the cause

(Mari *et al.*, 2002) y *Aspergillus* spp., agentes causantes de enfermedades en los alimentos y descomposición de los mismos (Viuda-Martos *et al.*, 2007).

Algunos autores han reportado que el mecanismo por el cual los ITCs inhiben el crecimiento de hongos y microorganismos aún no se conoce bien (Báez-Flores *et al.*, 2008); sin embargo, algunas hipótesis proponen que estos compuestos son la causa de la inactivación de las enzimas intracelulares por medio de la degradación oxidativa de los puentes disulfuro, de la inhibición de enzimas metabólicas por la acción del radical tiocianato y su acción desacopladora de la fosforilación oxidativa. Al parecer, la alta reactividad de los ITCs se debe principalmente a la fuerte naturaleza electrofílica del grupo funcional isotiocianato (Báez-Flores *et al.*, 2008; Kroll *et al.*, 1994). Es por ello, que el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la aplicación de refrigeración y el uso de jugo de brócoli tanto *in vitro* como en vivo en la inhibición de la germinación de esporas de *Alternaria* así como en la conservación y vida de anaquel de Arúgula.

Materiales y métodos

Preparación del jugo crudo de brócoli

Se obtuvo brócoli procedente del mercado de abastos de Texcoco, Estado de México. Los floretes y tallos de brócoli fueron desinfectados con hipoclorito de sodio 100 mg g⁻¹ y extraído en un extractor Moulinex, el jugo obtenido se dejó reposar por espacio de una hora, con el fin de llevar a cabo el proceso de hidrólisis mediante la enzima miosina. La muestra obtenida se pasó a una centrifuga a 7 080 G por 10 min. De acuerdo a la metodología establecida por Brandi *et al.* (2006). El sobrenadante se almacenó a -20 °C hasta su uso.

Determinación espectrofotométrica de glucosinolatos

Se tomaron aproximadamente 0.5 mg de extracto de brócoli liofilizado (Jezek *et al.*, 1999) el cual se diluyó en 9 ml de solución, de los cuales 7.5 mL corresponden de amortiguador acetato 0.2 M a pH 4.2 y 1.5 mL de acetato de plomo y bario 0.5 M. La mezcla se agitó vigorosamente en vortex. Se adicionaron 0.4 G de polivinilpolipirrolidona (PVPP) y se incubó a temperatura ambiente, con agitación en vortex, por 15 min. Después se agregaron 1.5 mL de sulfato de sodio 2 M y se centrifugó a 11 336 G por 5 min a temperatura

of the intracellular enzymes inactivation by oxidative degradation of the disulfide bridges, inhibition of metabolic enzymes by the action of thiocyanate radical action and uncoupling of oxidative phosphorylation. Apparently, the high reactivity of the ITCs is mainly due to the strong electrophilic nature of the isothiocyanate functional group (Kroll *et al.*, 1994; Báez-Flores *et al.*, 2008). It is therefore the aim of this study was evaluate the effect of the cooling application and use of broccoli juice both *in vitro* and live in inhibiting spore germination of *Alternaria* well as the conservation and shelf life of arugula.

Materials and methods

Preparation of raw broccoli juice

Broccoli from the supply market in Texcoco, State of Mexico was obtained. And stems of the broccoli florets were disinfected with sodium hypochlorite 100 mg g⁻¹ and extracted from a Moulinex extractor, the juice obtained was allowed to stand for one hour in order to carry out the process of hydrolysis by the enzyme miosina. The sample was transferred to a centrifuge at 7080 G for 10 min. According to the methodology established by Brandi *et al.* (2006). The supernatant was stored at -20 °C until use.

Spectrophotometric determination of glucosinolates

About 0.5 mg of extract lyophilized broccoli were taken (Jezek *et al.*, 1999) which was diluted in 9 ml of solution, of which 7.5 mL correspond to acetate buffer 0.2 M at pH 4.2 and 1.5 mL of lead acetate and Barium 0.5 M. The mixture was stirred vigorously vortexed. Adding 0.4 G of polyvinylpolypyrrolidone (PVPP) and incubated at room temperature with vortex agitation, for 15 min. After they added 1.5 mL of 2 M sodium sulfate and centrifuged at 11 336 G for 5 min at room temperature. We took 0.9 mL treated with PVPP, mixed with 0.9 mL of sodium hydroxide 2M and incubated for 30 min.

To the mixture was added 0.138 mL of concentrated hydrochloric acid and centrifuged at 4000 G for 10 minutes. For the spectrophotometric determination were taken 0.5 mL supernatant and mixed with 0.5 ml of 2 mM ferricyanide solution in 0.2 M phosphate buffer at pH 7. Finally the absorbance of the solution at 420 nm was measured within

ambiente. Se tomaron 0.9 mL de extracto tratado con PVPP se mezclaron con 0.9 mL de hidróxido de sodio 2M y se incubaron por 30 min.

A la mezcla se le adicionó 0.138 mL de ácido clorhídrico concentrado y se centrifugó a 4 000 G por 10 minutos. Para la determinación espectrofotométrica se tomaron 0.5 mL de sobrenadante y se mezclaron con 0.5 µl de solución de ferricianuro 2 mM en amortiguador fosfato 0.2 M a pH de 7. Finalmente se midió la absorbancia de la solución a 420 nm antes de 15 s. Se tomó como blanco amortiguador fosfato 0.2 M a pH 7. Para la curva de calibración se utilizó el patrón sinigrina 5.6 mM con diluciones de 0 a 90 µl. Con los datos del espectrofotómetro se ajustó un modelo de regresión lineal, para determinar la concentración de los GLs obtenidos del jugo de brócoli.

Actividad del jugo de brócoli (GLs) *in vitro* sobre *Alternaria*

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

Se colocaron 150 µl de medio de cultivo PDA en recipientes translúcidos con una capacidad de 300 µl, antes de que el medio de cultivo solidificara se mezcló con 50 µl del extracto puro de brócoli, después se añadió 20 µl de la suspensión de conidios, sobre cada uno de los recipientes. Se probaron las concentraciones 0.15, 0.11, 0.07, 0.04, 0.01, 0 µg/µl, posteriormente se colocaron en cámara húmeda y se incubaron por 2, 4, y 6 h a 28±3 °C. Con la ayuda de un microscopio se cuantificó los conidios germinados, se consideraron 100 conidios al azar, de cada concentración se hicieron tres repeticiones (Flores *et al.*, 2013). Los datos obtenidos se sometieron a un análisis de varianza. El porcentaje de inhibición se determinó mediante la fórmula: $IN (\%) = a-b/a * 100$

Actividad del jugo de brócoli (GLs) *in vivo* en *Alternaria*

Las hojas de arúgula se lavaron y desinfectaron con hipoclorito de sodio a 100 mg g⁻¹, posteriormente se dividió el material en 4 grupos para los tratamientos correspondientes:

15 s. It took targeting 0.2 M phosphate buffer at pH 7. 5.6 mM sinigrina pattern with dilutions of 0-90 µl was used for the calibration curve. Spectrophotometer with data linear regression model was adjusted, in order to determine the concentration of the juice obtained with GLs broccoli.

Activity of broccoli juice (GLs) *in vitro* on *Alternaria*

The isolation of *Alternaria* was obtained from arugula leaves provided by the company Glezte located Axochiapan in Morelos, with symptoms of leaf spot. *Alternaria* samples were seeded in culture medium Potato Dextrose Agar (PDA). Fungi characteristics according to morphological keys Barnett and Hunter (1998) and Rotem (1994) were studied. Definitive identification was performed by sequencing of fungal DNA.

150 µl of PDA culture medium were placed in translucent containers with a capacity of 300 µl, mixed with 50 µl of pure broccoli extract, then added 20 µl of the suspension of conidia on each one of the containers. Concentrations 0.15, 0.11, 0.07, 0.04, 0.01, 0 µg/µl were tested, were then placed in a moist chamber and incubated for 2, 4, and 6 h at 28 ± 3 °C. With the aid of a microscope, the germinated conidia was quantified, taking 100 conidia at random, from each concentration three repetitions were made (Flores *et al.*, 2013). The data obtained were subjected to an analysis of variance. Percent inhibition was determined by the formula: $IN (\%) = a-b/a * 100$.

Activity of broccoli juice (GLs) *in vivo* on *Alternaria*

Arugula leaves were washed and disinfected with sodium hypochlorite at 100 mg g⁻¹, then the material was divided into 4 groups to the corresponding treatments: treatment group and one was immersed in pure broccoli juice at a concentration of 2.98 µg mL⁻¹ of GLs plus *Alternaria* inoculation 1x10⁶ spores per mL; group two was immersed in broccoli juice at a concentration of 1.49 µg mL⁻¹ of GLs plus inoculation of *Alternaria* spores, group Three, only inoculated with spores of *Alternaria* solution; group four control without glucosinolates without spores; then the leaves are dried and then 100 g were packed in rigid trays and stored in refrigeration at 0.4 and 22 °C (room temperature) for 15 days with a completely randomized experimental design and factorial arrangement of 3 x 4 and three replications.

grupo o tratamiento uno, fue sumergido en jugo de brócoli puro a una concentración de $2.98 \mu\text{g mL}^{-1}$ de GLs más la inoculación de *Alternaria* 1×10^6 esporas por mL; grupo dos, fue sumergido en jugo de brócoli a una concentración de $1.49 \mu\text{g mL}^{-1}$ de GLs más la inoculación de esporas de *Alternaria*; grupo tres, inoculado sólo con la solución de esporas de *Alternaria*; grupo cuatro, testigo sin glucosinolatos y sin esporas; posteriormente se secaron las hojas y luego se envasaron 100 g en charolas rígidas y se almacenaron en refrigeración a 0. 4 y 22 °C (temperatura ambiente) durante 15 días, con un diseño experimental completamente al azar y arreglo factorial de 3 x 4 y tres repeticiones.

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

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

Donde: IS= índice de severidad; X_{ki} = nivel del daño en el momento i ; N_{ki} = número de hojas con el nivel del daño en el momento i ; N_j = número total de hojas evaluadas.

Efecto de GLs en la fisiología poscosecha de arúgula en vivo

Se determinó la fisiología y vida de anaquel de las hojas de arúgula, mediante el uso del jugo de brócoli (GLs) en las siguientes variables:

Vitamina C (ácido ascórbico)

Se homogeneizaron 5 mL de jugo con 50 mL de una solución de ácido oxálico (0.5%), de la cual se tomó una alícuota de 5 mL y se tituló con solución de Tillman (0.01%) hasta que permaneció una coloración rosa visible por 1 min. La concentración se expresó en mg g^{-1} utilizando como estándar el ácido ascórbico (AOAC, 1980).

Fenoles totales

Se empleó el método espectrofotométrico desarrollado por Folin y Ciocalteu descrito por Waterman y Mole (1994). Se pesaron 0.5 G de tejido fresco y se agregaron 5 mL de metanol al 100%, se homogeneizaron por 5 min a 13 147 G. Se tomaron 60 μL del sobrenadante, se tomaron 16 mL de agua desionizada y 0.5 mL de folin, se agitaron y antes de 8 min se

The severity of damage by fungus was assessed every third day and was reported as a percentage plant infection. We used a hedonic scale created with the 2log program. With this nominal rating, we obtained the population index when applying the following formula:

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

Where: IS= severity index; X_{ki} = level of damage at the time i ; N_{ki} = number of sheets to the level of the injury at the time i ; N_j = total number of leaves scored.

GLs effect of postharvest physiology on live arugula

Physiology and shelf life arugula leaves was determined using the broccoli juice (GLs) in the following variables:

Vitamin C (ascorbic acid)

5 mL of juice were homogenized with 50 mL of a solution of oxalic acid (0.5%), of which a 5 ml aliquot was taken and titrated with solution Tillman (0.01%) until remained visible pink coloration for 1 min. The concentration was expressed in mg g^{-1} using standard ascorbic acid (AOAC, 1980).

Total phenols

The spectrophotometric method developed by Folin and Ciocalteu described by Waterman and Mole (1994) was used. 0.5 G of fresh tissue was weighed and added 5 mL of 100% methanol, homogenized for 5 min at 13,147 G. 60 μL of supernatant were taken were taken 16 mL of deionized water and 0.5 mL of Folin, stirred and 8 min before Na_2CO_3 at 20% was added to this mixture was stirred vigorously and then allowed to stand for 2 h, protected from light. After the incubation period, the reaction mixture was analyzed in a spectrophotometer at λ of 760 nm to determine its absorbance. It was used as blank deionized water. Quantification was performed using a calibration curve for tannic acid, the data expressed in mg g^{-1} fresh weight.

Determination of antioxidant capacity

The determination of the antioxidant capacity was performed according to the method ABTS [2,2' azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)] proposed by Rice-Evans *et al.*, (1997) modified by Ozgen *et al.* (2006), for which the ABTS radical was formed by reaction of ABTS (7 mM) with potassium persulfate (2.45mM final

agregó Na_2CO_3 al 20% esta mezcla se agitó vigorosamente y luego se dejó reposar por 2 h, lejos de la luz. Transcurrido el periodo de incubación, la mezcla de reacción se analizó en un espectrofotómetro a λ de 760 nm para determinar su absorbancia. Se utilizó como blanco agua desionizada. La cuantificación se realizó mediante una curva patrón de ácido tánico, los datos se expresaron en mg g^{-1} de peso fresco.

Determinación de la capacidad antioxidante

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

Análisis estadístico

Los resultados *in vitro* y en vivo de las variables químicas y fisiológicas se sometieron a un análisis de varianza y pruebas de comparación de medias (Tukey, $p = 0.05$). Se empleó el paquete de análisis estadístico SAS[®] (Statistical Analysis System) ver. 9.0 (SAS, 2002).

Resultados y discusión

Determinación espectrofotométrica de glucosinolatos

El cual se basó en la metodología establecida por Jezeck *et al.* (1999) para determinar glucosinolatos, mediante espectrofotometría, usando una alcalina degradación y reacción con ferricianuro, utilizando sinigrina como modelo de glucosinolatos, así mismo Gallaher *et al.* (2012) validaron el método de cuantificación de glucosinolatos totales en crucíferas como el brócoli, basado en la misma reacción y como estándar usaron sinigrina. El modelo utilizado fue: $Y = -0.0041x + 0.9313$ (r^2 de 0.97, $p = 0.002$) y la concentración de glucosinolatos fue de $0.0029 \text{ mg mL}^{-1}$.

concentración) and incubated at room temperature in dark for 16 h. Once the radical ABTS was formed, it was diluted with PBS (phosphate buffer solution) (pH 7.4) to obtain an absorbance value of 0.7 ± 0.1 at 734 nm (maximum absorption length). For the assay were mixed 3 mL of the ABTS solution and 20 μl of sample extract, left to stand for 2 h and then the absorbance reading was performed at 734 nm. The antioxidant ascorbic acid was the reference (0 to 2.5 mM).

Statistical Analysis

The *in vitro* and *in vivo* chemical and physiological variables results a variance analysis and comparison tests were submitted (Tukey, $p = 0.05$). Package SAS[®] statistical analysis (Statistical Analysis System) view is used. 9.0 (SAS, 2002).

Results and discussion

Spectrophotometric determination of glucosinolates

Based on the methodology established by Jezeck *et al.* (1999) to determine glucosinolates by spectrophotometry using an alkaline degradation and reaction with ferricyanide, using as model sinigrina glucosinolates, likewise, Gallaher *et al.* (2012) validated the method of quantification of total glucosinolates in cruciferous vegetables like broccoli, based on the same reaction and used as standard sinigrina. The model used was: $Y = -0.0041x + 0.9313$ (r^2 of 0.97, $p = 0.002$) and the concentration of glucosinolates was $0.0029 \text{ mg mL}^{-1}$.

Activity of broccoli juice (GLs) *in vitro* in *Alternaria alternata*

A fungal colony in dark green leaves of arugula was identified. When viewed under a microscope it presented simple light brown conidiophores of tabicados, and conidia with transverse and longitudinal septa, traits corresponding to *Alternaria* species, according to the keys and descriptions of Barnett and Hunter (1998) and Rotem (1994). This morphological identification was confirmed by sequencing the genome fungal aligned in the gene bank (NCBI), reported by Andersen *et al.* (2001) and Fraire *et al.* (2010).

In figure 1, is shown the effect at 6 hours of broccoli juice concentrations (GLs) in inhibiting spore germination of *Alternaria* incubated at 26 °C. It can be seen that for

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

Se identificó una colonia fungal de color verde oscuro en hojas de arúgula. Al observarla al microscopio ésta presentó, conidióforos simples de color café claro tabicados, y conidios con septa transversal y longitudinal, características que corresponden a la especie de *Alternaria alternata* de acuerdo a las claves y descripciones de Barnett y Hunter (1998) y Rotem (1994). Esta identificación morfológica fue confirmada por la secuenciación del genoma fungal alineada en el banco de genes (NCBI), reportado por Andersen *et al.* (2001) y Fraire *et al.* (2010).

En la Figura 1 se muestra el efecto a las 6 horas de las concentraciones de jugo de brócoli (GLs) en la inhibición de la germinación de esporas de *Alternaria* incubadas a 26 °C. En ella se puede observar que para las concentraciones 0.15, 0.11 y 0.07 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, el porcentaje de germinación fue de 0%, mientras que las concentraciones de 0.01 y 0.04 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ presentan menor control, lo cual sugiere que a mayor concentración de GLs se presentó un menor crecimiento fungal. Todos los tratamientos con jugo de brócoli GLs disminuyeron el crecimiento del hongo respecto al testigo 0.0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de GLs. Varios autores han demostrado previamente que los GLs tienen efecto en contra de algunos patógenos. Mari *et al.* (1996) reportan que los isotiocinatos derivados de los glucosinolatos usados a una concentración de 3.6 mg mL^{-1} controlaron completamente al hongo *Penicillium expansum* en frutos de pera. Masahiro *et al.* (2006), probaron concentraciones de 20 mg g^{-1} de compuestos volátiles de *Brassicarapa* inhibió el crecimiento micelial de *Rhizoctonia solani*.

Por su parte Sisti *et al.* (2006), utilizaron jugo crudo de *Brassica* en la inhibición del crecimiento del hongo *Candida albicans* a una concentración de 10.9 $\mu\text{g mL}^{-1}$, después de 4 horas de incubación, obtuvieron 95% de inhibición, resultados similares a los encontrados pero con concentraciones diferentes.

Los resultados obtenidos en la presente sugieren el efecto inhibitorio del jugo de brócoli GLs en la germinación de esporas de *Alternaria alternata* en concordancia con lo obtenido en trabajos previos.

concentraciones 0.15, 0.11 and 0.07 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, the germination percentage was 0%, whereas the concentrations of 0.01 and 0.04 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ have less control, suggesting that the higher the concentration of GLs showing less fungal growth. All treatments of GLs with broccoli juice decreased fungal growth over control's, at 0.0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ of GLs. Several authors have previously shown that GLs are effective against some pathogens. Mari *et al.* (1996) reported that isothiocyanates derived from glucosinolates used at a concentration of 3.6 mg mL^{-1} completely controlled the fungus *Penicillium expansum* in pear fruit. Masahiro *et al.*, (2006) tested concentrations of 20 mg g^{-1} of volatile compounds of *Brassicarapa*, inhibited the mycelial growth of *Rhizoctonia solani*.

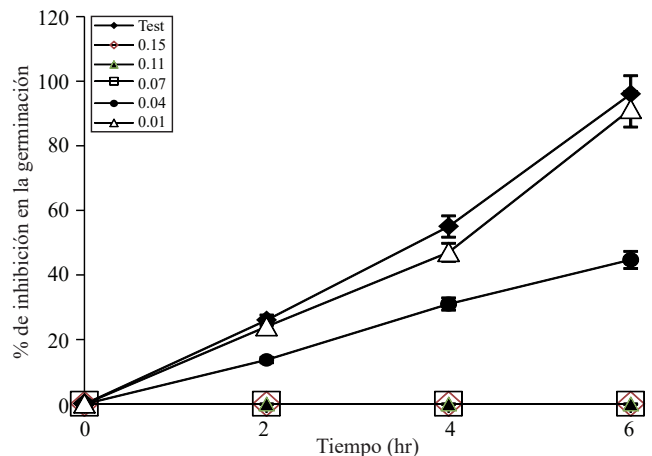


Figura 1. Efecto de las concentraciones de jugo de brócoli en la inhibición de la germinación de esporas de *Alternaria alternata in vitro*, los puntos representan el promedio de n repeticiones y su error std.

Figure 1. Effect of broccoli juice concentrations in inhibiting spore germination of *Alternaria alternata in vitro*, the points represent the mean of n repetitions and standard error.

Meanwhile, Sisti *et al.* (2006), used raw juice used of *Brassica* in the growth inhibition of the fungus *Candida albicans* at a concentration of 10.9 mg mL^{-1} , after 4 hours of incubation, 95% inhibition obtained similar results to those found but with different concentrations.

The results suggested the inhibitory effect of broccoli juice GLs, on the germination of spores of *Alternaria alternata* in line with those obtained in previous studies.

Actividad del jugo de brocoli (GLs): en vivo en *Alternaria alternata*

En el Cuadro 1 se presentó el porcentaje de severidad de daño causado por *A. alternata* en hojas de Arúgula. Se puede observar que el tratamiento sin GLs + inóculo presentó la mayor severidad del daño durante todo el periodo de evaluación, mientras que la menor severidad se obtuvo cuando se utilizó la concentración de 2.98 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de GLs contenidos en el jugo de brócoli + inóculo. En el presente trabajo se observó una disminución del daño causado por *A. alternata* en hojas de arúgula. Los resultados obtenidos en este trabajo fueron superiores a los reportados por Troncoso-Rojas *et al.* (2005) quienes tuvieron una reducción de 80% en el daño causado por *Alternaria alternata* en tomates, al utilizar isotiocinatos (ITCs) (derivados de los glucosinolatos), a una concentración de 0.56 mg mL^{-1} .

Activity of broccoli juice (GLs): on live in *Alternaria alternata*

The Table 1 shows the percentage of severity of damage caused by *A. alternata* in Arugula leaves. It can be seen that treatment without GLs + inoculum showed the highest severity of the damage throughout the evaluation period, while the lowest severity was obtained when the concentration of 2.98 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of GLs content was used in broccoli juice + inoculum. In this paper, a decreased in damage was observed on arugula leaves. The results in this study were higher than those reported by Troncoso-Rojas *et al.* (2005), who had a 80% reduction in the damage caused by *Alternaria alternata* on tomatoes, using isothiocyanates (ITCs) (derived from glucosinolates) at a concentration of 0.56 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Also, we found that, there were significant differences ($p \leq 0.05$) between treatments at days seven, eleven, thirteen and fifteen, indicating that not all levels have the same effect on

Cuadro 1. Efecto de concentraciones de GLs y temperaturas de almacenamiento en la severidad del daño de *A. alternata* en hojas de arúgula, el dato representa el promedio de n repeticiones.

Table 1. Effect of concentrations of GLs and storage temperatures on the severity of the damage on *A. alternata* on arugula leaves, the data represents the average of n repetitions.

Factor/nivel $\mu\text{g mL}^{-1}$ de GLs	Días de vida poscosecha							
	0	3	5	7	9	11	13	15
	(% de severidad de daño de <i>Alternaria</i>)							
Concentraciones								
Sin GLs, sin inóculo	0*	5.5 b ^t	9.26 a	13.8 b	4.16 b	9.03 b	13.1 b	17.3 b
Sin GLs + inóculo	0	6.90 a	12.9 b	22.6 a	13.1 a	17.3 a	19.8 a	37.2 a
1.49 GLs + inóculo	0	1.80 c	5.09 c	6.90 c	0.69 c	2.08 c	3.40 c	3.40 c
2.98 GLs + inóculo	0	1.30 c	3.70 c	5.00 d	0.00 c	0.00 d	0.00 d	0.00 d
DMSH		0.90	2.02	1.80	2.81	2.78	2.50	2.50
Temperatura °C								
22	0	11.8 a	22.5 a	32.2 a	- [†]	-	-	-
4	0	0.00 b	0.69 b	3.10 b	5.90 a	9.30 a	11.6 a	17.7 a
0	0	0.00 b	0.00 b	1.04 c	3.10 b	4.80 b	6.59 b	11.6 b
DMSH		0.73	1.58	1.41	1.40	1.45	1.31	2.60

Medias con la misma letra dentro de columnas y factor no son diferentes (Tukey con $p \leq 0.05$). *No significativo; DMSH= diferencia mínima significativa honesta. GLs= Glucosinolatos; [†]datos perdidos por senescencia.

Asimismo, se encontró que existieron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre tratamientos los días siete, once, trece y quince lo que indica que no todas las concentraciones producen el mismo efecto en la severidad de daño para esos días y la concentración de 2.98 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de GLs + inóculo presentó la menor severidad de daño. Por lo que dicha concentración resultó ser más efectiva para el control de *A. alternata*, similar resultado obtenido por Tiznado-Hernández y Troncoso-Rojas (2006) quienes demostraron que el isotiocinato (ITC)

the severity of damage to those days and the concentration of 2.98 mg mL^{-1} GLs + inoculum had the lowest severity of damage. So, that the concentration was more effective to control *A. alternata*, similar result obtained by Tiznado-Hernández and Troncoso-Rojas (2006), who showed that, the isothiocyanate (ITC) 3-metilsufnil-3-butenyl at a concentration of 3.6 $\mu\text{g mL}^{-1}$, completely inhibited the growth of *Monilinia lax* in fruit pear. Troncoso-Rojas *et al.* (2005), showed that (ITC) of

3-metilsufnil-3-butenil a una concentración de 3.6 mg mL⁻¹, inhibió totalmente el crecimiento de *Monilinia laxa* en frutos de pera. Troncoso-Rojas *et al.* (2005), demostraron que el (ITC) de bencil a las concentraciones de 0.28 y 0.56 mg/mL⁻¹ inhibió 100% el crecimiento micelial de *A. alternata* en frutos de pimiento morrón.

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

En los resultados del ensayo en vivo, se observó que las hojas de arúgula tratadas con las concentraciones de GLs contenidas en el jugo de brócoli, presentaron una menor incidencia de *A. alternata*. El modo de acción de los GLs no está dilucidado aún pero la evidencia experimental apoya la acción de que los isotiocinatos en el organismo vivo, llevan a cabo las reacciones interespecíficas con cualquier proteína del organismo. Estas reacciones se cree que están teniendo lugar entre el grupo isotiocinato (R-N=C=S) y el grupo amino del grupo R de la lisina, el grupo sulfhidrido del grupo R de la cisteína y con enlaces disulfuro. Después de la reacción, los isotiocinatos permanecen unidos covalentemente a la proteína que trae cambios en la estructura terciaria de la proteína y conduce a la pérdida parcial total de la actividad enzimática (Tiznado-Hernández *et al.*, 2006).

Capacidad antioxidante

Con relación a la capacidad antioxidante la concentración de 2.98 µg mL⁻¹ + inóculo presentó una ligera disminución de 3.16 a 2.89 mg g⁻¹, mientras que el tratamiento Sin GLs + inóculo oscilo entre 3.16 y 2.32 mg g⁻¹. De acuerdo al Cuadro 2, los días tres, cinco, siete, nueve, once trece y quince, mostraron diferencias estadísticas significativas ($p \leq 0.05$), en todos los tratamientos con concentraciones

benzyl at concentrations of 0.28 and 0.56 mg/mL⁻¹ 100% inhibited mycelial growth of *A. alternata* in fruits of sweet pepper.

Regarding the treatment handled at room temperature (22 °C) it was observed further damage caused by *A. alternata* during the storage period. Storage temperatures of 0 to 4 °C were statistically equal, days three and five of storage; However, from the seventh day onwards there were significant differences. The temperature of 0 °C provided better control of *A. alternata* than 4 °C. Koukounaras *et al.* (2007), mentioned that, the leaves of arugula can be successfully cooled to 0 °C, with a maximum storage life of 16 days, a similar pattern to the results of this work. Also report that storage at 5 °C was a slight deterioration in the quality and shelf life is reduced three days, similar results to those obtained in this study, so it can be concluded that storage at 0 °C increases the life shelf arugula leaves, and inhibits the growth of *A. alternata*.

In the test results in vivo were observed that arugula leaves treated with concentrations of GLs contained in broccoli juice, had a lower incidence of *A. alternata*. The mode of action of the GLs is not elucidated but experimental evidence supports the action of the isothiocyanates in the living body, performed interspecific reactions with any protein in the body. These reactions are thought to be taking place between the isothiocyanate group (R-N=C=S) and the amino group of the R group of lysine, the sulfhydryl group of the R group and cysteine disulfide bonds. After the reaction, the isothiocyanates remain covalently bound to the protein that brings changes in the tertiary structure of the protein and partial leads to total loss of enzymatic activity (Tiznado-Hernández *et al.*, 2006).

Antioxidant capacity

Regarding the antioxidant concentration of 2.98 µg mL⁻¹ + inoculum showed a slight decrease of 3.16 to 2.89 mg g⁻¹, while the treatment without GLs + inoculum, moved between 3.16 and 2.32 mg g⁻¹. According to Table 2, on the days three, five, seven, nine, eleven thirteen and fifteen, were statistically different ($p \leq 0.05$) in all treatments with concentrations of GLs and GLs plus inoculum, suggesting that did not had the same effect on leaves of arugula, the antioxidant capacity with concentration of 2.98 µg mL⁻¹ presents a decrease of 8% to 15 day storage. In a study conducted by Venneria *et al.* (2012), state that had a decrease in the antioxidant capacity of 8% on the second day of storage, obtaining values of 12.9 mM Fe²⁺ per kg, fresh arugula leaves.

de GLs y GLs mas inoculo, lo que sugiere que no tuvieron el mismo efecto en las hojas de arúgula, la capacidad antioxidante con la concentración de $2.98 \mu\text{g mL}^{-1}$ presenta una disminución de 8% al día 15 de almacenamiento. En un trabajo realizado por Venneria *et al.* (2012) mencionan que tuvieron una disminución de la capacidad antioxidante de 8% al segundo día de almacenamiento, obteniendo valores de 12.9 mM Fe^{2+} por kg, en hojas de arúgula fresca.

Results of antioxidant could be attributed to vitamin C and phenolic compounds, present in the leaves of arugula, which were unaffected. Recently it has gained more attention to a diet rich in vegetables for their antioxidant capability protect the body from the action of free radicals that cause aging processes and can help prevent certain diseases such as cancer (Sun-Ju *et al.*, 2004).

Cuadro 2. Efecto de concentraciones de GLs y temperaturas de almacenamiento en capacidad antioxidante, en hojas de arúgula, el dato representa el promedio de n repeticiones.

Table 2. Effect of concentrations of GLs and storage temperatures on the antioxidant capacity, arugula leaves, the data represents the average of n repetitions.

Factor/nivel $\mu\text{g mL}^{-1}$ de GLs	Días de vida poscosecha							
	0	3	5	7	9	11	13	15
	Capacidad antioxidante mg g^{-1}							
Concentraciones								
Sin GLs, sin inóculo	3.16*	2.87c ^t	2.76 c	2.63 c	2.63 c	2.56 c	2.58 c	2.49 c
Sin GLs + inóculo	3.16	2.81 d	2.69 d	2.55 d	2.55 d	2.49 d	2.36 d	2.32 d
1.49 GLs + inóculo	3.16	3.03 b	2.86 b	2.74 b	2.72 b	2.68 b	2.77 b	2.78 b
2.98 GLs+ inóculo	3.16	3.09 a	2.97 a	2.81 a	2.87 a	2.80 a	2.87 a	2.89 a
DMSH		0.03	0.03	0.03	0.02	0.01	0.03	0.01
Temperatura °C								
22	3.16	2.94 b	2.83 b	2.54 c	- ¹	-	-	-
4	3.16	2.91 b	2.75 c	2.71 b	2.66 b	2.58 b	2.59 b	2.53 b
0	3.16	3.0 a	2.88 a	2.79 a	2.73 a	2.69 a	2.70 a	2.70 a
DMSH		0.02	0.02	0.02	0.01	0.005	0.01	0.01

*Medias con la misma letra dentro de columnas y factor no son diferentes (Tukey con $p \leq 0.05$). ¹No significativo; DMSH= diferencia mínima significativa honesta. GLs= Glucosinolatos; ^tdatos perdidos por senescencia.

Los resultados de la capacidad antioxidante podrían atribuirse, a la vitamina C y los compuestos fenólicos, presentes en las hojas de arúgula los cuales no fueron afectados. Recientemente se ha ganado más la atención a una dieta rica en vegetales que por su capacidad antioxidante protegen al organismo de la acción de radicales libres, causantes de los procesos de envejecimiento y que pueden ayudar a prevenir ciertas enfermedades como el cáncer (Sun-Ju *et al.*, 2004).

La temperatura de almacenamiento mantuvo la capacidad antioxidante a 0 °C de 3.0 mg g^{-1} a 2.7 mg g^{-1} , durante los 15 días de almacenamiento, con diferencias de los tratamientos de 4 y 22 °C . Autores como Martínez-Sánchez *et al.* (2006) cuando almacenaron a 4 °C , obtuvieron una reducción de 60% en la capacidad antioxidante con valores que pasaron de 104.8 hasta $47.6 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$ a los 14 días. Por su parte Nicola *et al.* (2010) tuvieron un decremento de 69% al almacenar a 12 °C con un valor de $1.96 \mu\text{mol Fe}^{2+} \text{ g}^{-1}$ al

The storage temperature kept the antioxidant capacity at 0 °C for 3.0 mg g^{-1} at 2.7 mg g^{-1} , during the 15 days of storage, with differences of treatments of 4 and 22 °C . Authors like Martínez-Sánchez *et al.* (2006), when stored at 4 °C , obtained a 60% reduction in antioxidant capacity, values fell from 104.8 to $47.6 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$ after 14 days. Nicola *et al.* (2010) had a decrease of 69% by storing at 12 °C with $1.96 \text{ mol Fe}^{2+} \text{ g}^{-1}$ point out that, the antioxidant capacity was devoted to control the radical species formed after cutting and significantly influenced by storage temperature over time.

Vitamin C

Vitamin C content is maintained within the range of 86.3 to 48.3 mg g^{-1} in the treatment $2.98 \mu\text{g mL}^{-1}$ + inoculum, while the treatment without GLs + inoculum declined to 19.5 mg g^{-1} (Table 3). Authors like Kim and Ishi (2007)

respecto señalan que la capacidad antioxidante, fue dedicada a controlar las especies de radicales formados después del corte y significativamente influenciada por la temperatura de almacenamiento a través del tiempo.

Vitamina C

El contenido de Vitamina C se mantuvo dentro de los valores de 86.3 a 48.3 mg g⁻¹, en el tratamiento 2.98 µg mL⁻¹ + inóculo, mientras que en el tratamiento sin GLs + inóculo decayó hasta 19.5 mg g⁻¹ (Cuadro 3). Autores como Kim e Ishi (2007) obtuvieron contenido de vitamina C de 1.45 mg g⁻¹ a los 10 días de almacenamiento a 4 °C en hojas de arúgula, valores más bajos a los obtenidos en este trabajo. El contenido es importante en la conservación de alimentos, toda vez que es uno de los antioxidantes más efectivos, con efecto protector frente a los radicales libres (González-Aguilar, 2005). En el Cuadro 6 puede apreciarse que para esta variable existieron diferencias significativas ($p \geq 0.05$) entre los tratamientos con concentraciones de GLs contenidos en el jugo de brócoli y GLs con inóculo, aplicados durante todo el periodo de evaluación.

obtained vitamin C of 1.45 mg g⁻¹ after 10 days of storage at 4 °C in arugula leaves, lower the values obtained in this work. Content is important in food preservation, since it is one of the most effective antioxidants with protective effect against free radicals (González-Aguilar, 2005). The Table 6 shows that for this variable significant differences ($p \geq 0.05$) between the treatments with GLs concentrations contained in broccoli juice and GLs with inoculum applied throughout the evaluation period.

Regarding the effect of temperature, we obtained that the treatment of 2.98 µg mL⁻¹ + inoculum at 0 °C was the best preserved the vitamin C with a value at the end of storage of 37.4 mg g⁻¹ unlike the treatment which showed a value of 32.1 mg g⁻¹. Meanwhile Nicola *et al.* (2010), found a decrease of 32.5% in the content of vitamin C (9.3 mg 100 g⁻¹) to be stored at 4 °C and 46.6% at temperatures of 12 °C after 10 days of storage. Martínez-Sánchez *et al.* (2006), determined values of 50 mg 100 g⁻¹ at 8 °C storage. Kim and Ishi (2007) mentioned that, the availability of vitamin C is influenced by numerous factors such as the intensi

Cuadro 3. Efecto de concentraciones de GLs y temperaturas de almacenamiento en el contenido de vitamina C en hojas de arúgula, el dato representa el promedio de n repeticiones.

Table 3. Effect of concentrations of GLs and storage temperatures in the content of vitamin C in arugula leaves, the data represents the mean of n repetitions.

Factor/nivel µg mL ⁻¹ de GLs	Días de vida poscosecha							
	0	3	5	7	9	11	13	15
	Vitamina C mg g ⁻¹							
Concentraciones								
Sin GLs, sin inóculo	86.3*	67.5 c ^t	59.2 c	51.6 c	53.0 c	47.8 c	39.8 c	34.5 c
Sin GLs + inóculo	86.3	59.0 d	41.5 d	35.8 d	32.6 d	27.9 d	22.4 d	19.5 d
1.49 GLs + inóculo	86.3	70.1 b	64.2 b	56.1 b	59.5 b	54.0 b	44.4 b	39.4 b
2.98 GLs + inóculo	86.3	73.8 a	69.2 a	59.2 a	67.5 a	61.8 a	53.4 a	48.3 a
DMSH		1.50	1.57	1.33	1.33	1.07	1.32	0.76
Temperatura °C								
22	86.3	60.3 c	47.0 c	32.1 c	- ¹	-	-	-
4	86.3	69.0 b	61.0 b	56.5 b	50.9 b	45.7 b	38.2 b	33.5 b
0	86.3	73.5 a	67.6 a	63.4 a	55.3 a	50.0 a	41.6 a	37.4 a
DMSH		1.18	1.23	1.04	0.70	0.56	0.69	0.40

*Medias con la misma letra dentro de columnas y factor no son diferentes (Tukey con $p \leq 0.05$). ¹No significativo; DMSH= diferencia mínima significativa honesta. GLs= Glucosinolatos; ^tdatos perdidos por senescencia.

En relación al efecto de la temperatura se obtuvo que el tratamiento de 2.98 µg mL⁻¹ + inóculo a 0 °C fue el que conservó mejor el contenido de vitamina C con un valor al final del almacenamiento de 37.4 mg g⁻¹ a diferencia del tratamiento a temperatura ambiente el cual mostró un valor de 32.1 mg g⁻¹.

ty of light, storage temperature and exposure to pollutants that may modify their content stored or products during postharvest life as is one of the most vulnerable to the conditions of processing and preserving constituents (Davey *et al.*, 2000).

Por su parte Nicola *et al.* (2010) encontraron un decremento de 32.5% en el contenido de vitamina C ($9.3 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$) al almacenar a 4°C y de 46.6% bajo temperaturas de 12°C después de 10 días de almacenamiento. Al respecto Martínez-Sánchez *et al.* (2006) determinaron valores de $50 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$ al almacenar a 8°C . Kim y Ishi (2007) mencionan que la disponibilidad de vitamina C total es influenciada por numerosos factores como la intensidad de la luz, temperatura de almacenamiento y exposición a contaminantes, que pueden modificar sus contenidos en productos almacenados ó durante su vida poscosecha, ya que es uno de los constituyentes más vulnerables a las condiciones de procesamiento y conservación (Davey *et al.*, 2000).

Fenoles

En relación al contenido de fenoles (Cuadro 4), se observan diferencias significativas ($p \geq 0.05$) entre las concentraciones de GLs contenidos en el jugo de brócoli y GLs con inoculo, los días cinco, siete, nueve, once y quince de almacenamiento. El mejor contenido de fenoles ($0.22 \text{ mg } \text{g}^{-1}$) se obtuvo en la concentración de $2.98 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ de GLs, mientras que el tratamiento sin GLs + inóculo mostró una disminución a partir del día nueve sin alcanzar el valor inicial terminando con $0.15 \text{ mg } \text{g}^{-1}$, en el día 15, los valores obtenidos son comparados con los de Nicola *et al.* (2010) quienes reportan valores de 0.20 a $0.15 \text{ mg } \text{g}^{-1}$, sin embargo los valores obtenidos en este estudio con las concentración de $2.98 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ y $1.49 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ de GLs + inoculo fueron de 0.20 y $0.22 \text{ mg } \text{g}^{-1}$, los compuestos fenólicos son un grupo de antioxidantes y la actividad puede ser atribuida a efectos sinérgico de la vitamina C y la capacidad antioxidante.

Phenols

Regarding the content of phenols (Table 4), significant differences ($p \geq 0.05$) between the concentrations of GLs contained in broccoli juice and GLs with inoculum days five, seven, nine, eleven and fifteen storage were observed. The best content of phenols ($0.22 \text{ mg } \text{g}^{-1}$) was obtained in the concentration of $2.98 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ of GLs, while treatment without GLs + inoculum showed a decrease from ninth day without reaching baseline ending $0.15 \text{ mg } \text{g}^{-1}$, on day 15, the values obtained are compared with those of Nicola *et al.* (2010), who reported values from 0.20 to $0.15 \text{ mg } \text{g}^{-1}$; however, the values obtained in this study with the concentration of $2.98 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ and $1.49 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ of GLs + inoculum were 0.20 and $0.22 \text{ mg } \text{g}^{-1}$, the phenolic compounds are a group of antioxidants and activity can be attributed to the synergistic effects of vitamin C and antioxidant capacity.

Storage at 0°C presented to maintain amounts of tannic acid of 0.26 to $0.19 \text{ mg } \text{g}^{-1}$ after 15 days of storage. These results were higher than those observed by Martínez-Sánchez *et al.* (2006), who found values of 109.3 g to $56.3 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$ of gallic acid in leaves of arugula, stored at 4°C , for 14 days at representing a decrease of almost 50% compared to the concentration used in this study which was lower. Phenolic compounds have received considerable attention as potential protective factors for cancer and heart disease, in part because of its powerful antioxidant properties dietary worldwide (Cartea *et al.*, 2011).

Cuadro 4. Efecto de concentraciones de GLs y temperaturas de almacenamiento en el contenido de fenoles en hojas de arúgula, el dato representa el promedio de n repeticiones.

Table 4. Effect of concentrations of GLs and storage temperatures phenol content in leaves arugula, the data represents the mean of n repetitions.

Factor/Nivel $\mu\text{g mL}^{-1}$ de GLs	Días de vida poscosecha							
	0	3	5	7	9	11	13	15
	Fenoles $\text{mg } \text{g}^{-1}$							
Concentraciones								
Sin GLs, sin inóculo	0.32*	0.23 c ^t	0.21 c	0.20 c	0.20 c	0.20 c	0.19 c	0.17 c
Sin GLs + inóculo	0.32	0.23 c	0.19 d	0.18 d	0.19 d	0.18 d	0.16 d	0.15 d
1.49 GLs + inóculo	0.32	0.26 b	0.23 b	0.22 b	0.24 b	0.23 b	0.21 b	0.20 b
2.98 GLs+ inóculo	0.32	0.29 a	0.26 a	0.25 a	0.26 a	0.26 a	0.24 a	0.22 a
DMSH		0.007	0.004	0.004	0.004	0.004	0.005	0.003
Temperatura $^\circ\text{C}$								
22	0.32	0.27 a	0.22 b	0.19 c	- ⁱ	-	-	-
4	0.32	0.24 c	0.21 b	0.21 b	0.21 b	0.21 b	0.20 a	0.18 b
0	0.32	0.26 b	0.24 a	0.23 a	0.23 a	0.22 a	0.20 a	0.19 a
DMSH		0.002	0.003	0.003	0.002	0.002	0.003	0.001

*Medias con la misma letra dentro de columnas y factor no son diferentes (Tukey con $p \leq 0.05$). ^tNo significativo; DMSH= diferencia mínima significativa honesta. GLs= Glucosinolatos; ⁱdatos perdidos por senescencia.

El almacenamiento a 0 °C presentó mantener cantidades de ácido tánico de 0.26 a 0.19 mg g⁻¹ después de 15 días de almacenamiento. Estos resultados estuvieron más altos que de los observados por Martínez-Sánchez *et al.* (2006) quienes encontraron de valores de 109.3 g a 56.3 mg 100 g⁻¹ de ácido gálico en hojas de arúgula, almacenadas a 4 °C, por 14 días lo que representó una disminución casi del 50 %, en comparación con la concentración que se utilizó en este estudio la cual fue menor. Los compuestos fenólicos han recibido una considerable atención por ser factores potencialmente protectores contra el cáncer y enfermedades del corazón, en parte debido a sus propiedades antioxidantes potentes en la dieta en todo el mundo (Cartea *et al.*, 2011).

Conclusiones

La aplicación de GLs contenidos en el jugo de brócoli y el almacenamiento a 0 °C preservaron mejor la fisiología de las hojas de arúgula, según lo muestran las variables evaluadas, capacidad antioxidante, vitamina C y fenoles, las cuales no se vieron afectadas y alargaron la vida de anaquel. Por lo que estos resultados corroboran la actividad antifúngica del jugo de brócoli (GLs), *in vitro* y en vivo como una alternativa potencial para el control de *Alternaria alternata* en el manejo postcosecha de arúgula.

Literatura citada

- Andersen, B.; Kroger, E. and Roberts, G. 2001. Chemical and morphological segregation of *Alternaria alternata*, *A. gaisen* and *A. longipes*. Mycol. Res. 105:291-299.
- AOAC (Association of official analytical chemists). 1980. Official Methods of Analysis. Horwitz, (Ed). 13th (Ed.). Franklin, B. Station, Washington, DC. USA. 1018 p.
- Barnett, H. L. and Hunter, B. B. 1998. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. Cuarta edición. Minnesota. APS Press. 210 p.
- Báez-Flores, M. E.; Troncoso-Rojas, R. y Tiznado-Hernández, M.E. 2008. Respuestas genéticas provocadas por el tratamiento con isotiocianatos en hongos del género *Alternaria*. Rev. Mex. Fitopatol. 29:61-68.
- Brandi, G.; Amagliani, G.; Schiavano, G. F.; De Santi, M. and Sisti, M. 2006. Activity of *Brassica oleracea* leaf juice on foodborne pathogenic bacteria. J. Food Protec. 9:2274-2279.
- Campas-Baypoli, O. N.; Bueno-Solano, C.; Martínez-Ibarra, D. M.; Camacho-Gil, F.; Villa-Lerma, A. G.; Rodríguez-Núñez, J. R.; López-Cervantes, J. y Sánchez-Machado, D. I. 2009. Contenido de sulforafano (1 isotiocianato-4-(metilsulfinil)-butano) en vegetales crucíferos. Arch. Latinoam. Nut. 59:(1)95-100.

Conclusions

The application of GLs contained in broccoli juice and storage at 0 °C best preserved physiology arugula leaves, as shown by the variables evaluated, antioxidant, vitamin C and phenols, which were not affected and lengthened shelf life. So, these results corroborate the antifungal activity of broccoli juice (GLs), *in vitro* and *in vivo* as a potential alternative to control *Alternaria* in postharvest handling of arugula.

End of the English version



- Davey, M. V.; Montagu, V. M.; Inzé, D.; Sanmartín, M.; Kanellis, A.; Smirnoff, N.; Benzie, J. J.; Strain, J. J.; Favell, D. and Fletcher, J. 2000. Plant L-ascorbic acid: chemistry, function, metabolism, bioavailability and effect of processing. J. Sci. Food Agric. 80:825-860.
- Gallaher, C. M.; Gallaher, D. D. and Peterson, S. 2012. Development and validation of a spectrophotometric method for quantification of total glucosinolates in cruciferous vegetables. J. Agric. Food Chem. 60:1358-1362.
- Flores, M. A.; Martínez, D. M. T.; Nieto, A. D., Rodríguez, P. J. E.; Colinas, L. M. T. y Martínez, S. J. 2013. Reducción en la germinación *in vitro* de conidios de *Alternaria alternata* aislada de *Eruca sativa* con jugo de brócoli. Fitopatología. 31:180-190.
- Fraire-Cordero, M. L.; Nieto-Ángel, D. y Cárdenas-Soriano, E. 2010. *Alternaria tenuissima*, *A. alternata* y *Fusarium oxysporum* hongos causantes de la pudrición de florete de brócoli. Rev. Mex. Fitopatol. 28(1):25-33.
- González-Aguilar, G. A.; Gardea, A. A. y Cuamea-Navarro, F. 2005. Nuevas tecnologías de conservación de productos vegetales frescos cortados. CIAD México. 558 p.
- Jezek, J.; Barry, G.; Haggett, D.; Atkinson, A. and Rawson, D. M. 1999. Determination of glucosinolates using their alkaline degradation and with ferricyanide. J. Agric. Food Chem. 47:4669-4674.
- Kader, A. A. 2003. A perspective on postharvest horticulture. HortScience. 38:(5)1004-1008.
- Kim, S. J. and Ishi, G. 2007. Effect of storage temperature and duration on glucosinolate, total vitamin C and nitrate contents in rocket salad (*Eruca sativa* Mill). J. Sci. Food Agric. 87:966-973.
- Sun-Ju, K.; Shigeki, J. and Gensho, I. 2004. Isolation and structural elucidation of 4-(B-glucopyranosyldisulfanyl) butyl glucosinolate from leaves of rocket salad (*Eruca sativa* L.) and its antioxidative activity. Biosci. Biotechnol. Biochem. 68:2444-2450.
- Koukounaras, A.; Siomos, A. S. and Sfakiotakis, E. 2007. Postharvest CO₂ and ethylene production and quality of rocket (*Eruca Sativa* Mill.) leaves as affected by leaf age and storage temperature. Postharvest Biol. Technol. 46:167-173.
- Kroll, J.; Noack, J.; Rawel, H.; Kroeck, R. and Proll, J. 1994. Chemical reactions of benzyl isothiocyanate with eggwhite protein fractions. J. Sci. Food Agric. 65:337-345.

- Mari, M.; Iori, R.; Leoni, O. and Marchi, A. 1996. Bioassays of glucosinolate-derived isothiocyanates against postharvest pear pathogens. *Plant Pathology*. 45:753-760.
- Mari, M.; Leoni, O.; Iori, R. and Cembali, T. 2002. Antifungal vapour-phase of allyl-isothiocyanate against *Penicillium expansum* on pears. *Plant Pathol.* 51:231-236.
- Martínez-Sánchez, A.; Allende, A.; Bennett, R. N.; Ferreres, F. and Gil, M. I. 2006. Microbial, nutritional and sensory quality of rocket leaves as affected by different sanitizers. *Postharvest Biol. Technol.* 42:86-97.
- Masahiro, K.; Andriantsoa, R.; Yoko, O.; Motoaki, T.; Hitoshi, H. and Ryo, F. 2006. Induction of soil suppressiveness against *Rhizoctonia solani* by incorporation of dried plant residues into soil. *Phytopathology*. 96:1372-1379.
- Mucete, D.; Borozan, A.; Radu, F. and Jianu, I. 2006. Antibacterial activity of isothiocyanates, active principales in *Armoracia rusticana* roots. *J. Agroal. Proc. Technol.* 2:443-452.
- Nicola, S.; Fontana, E.; Tibaldi, G. and Zhan, L. 2010. Quantitative and physiological response of minimally processed rocket (*Eruca sativa* Mill.) to package filling amount and shelf-life temperature. *Acta Hortic.* 877: 611-618.
- Ozgen, M.; Reese, N. R.; Artemio, Z.; Tulio, J. R.; Scheerens, C. J. and Miller, R. A. 2006. Modified 2,2-Azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) method to measure antioxidant capacity of selected small fruits and comparison to ferric reducing antioxidant power (FRAP) and 2,2'-diphenil-1-picrylhydrazyl (DPPH) methods. *J. Agric. Food Chem.* 54(4):1151-1157.
- Rice-Evans, A. C.; Miller, N. J. and Paganga, G. 1997. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Sci.* 2(4):152-158.
- Rodríguez-Sauceda, E. N. 2011. Uso de agentes antimicrobianos naturales en la conservación de frutas y hortalizas. *Ra Ximhai*. 7(1):153-170.
- Rotem, Y. 1994. The genus *Alternaria*: biology, epidemiology and pathogenicity. APS Press, Am. Phytopathol. Soc. 326 p.
- SAS Institute. 2002. users guide: Statics, Ver. 9.00. SAS Institute, Inc. Cary, NC, USA. 1503 p.
- Sisti, M.; Amagliani, G. and Brandi, B. 2006. Antifungal activity of *Brassica oleracea* var. botrytis fresh aqueous juice. *Fitoterapia*. 74:453-458.
- Smolinska, U.; Morra, M. J.; Knudsen, G. R. and James, R. L. 2003. Isothiocyanates produced by Brassicaceae species as inhibitors of *Fusarium osyosporum*. *Plant Dis.* 87:407-412.
- Tiznado-Hernández, M. and Troncoso-Rojas, R. 2006. Control of fungal diseases with isothiocyanates. *Stewart Postharvest Review*. 1(4):1-14.
- Tonoiven, P. M. A. 2004. Postharvest storage procedures and oxidative stress. *HortScience*. 39(5):938-942.
- Torales, A. C.; Chávez, A. R. y Rodríguez, S. C. 2010. Cambios en la calidad de rúcula mínimamente procesada, efecto de distintos envases. *Rev. Iberoam. Tecnol. Post.* 11(2):196-203.
- Troncoso, R.; Espinoza, C.; Sánchez-Estrada, A.; Tiznado, M. E. and García, H. S. 2005. Analysis of the isothiocyanates application to control *Alternaria* rot in bell peppers. *Food Res. Int.* 38:701-708.
- Troncoso-Rojas, R.; Sánchez-Estrada, A.; Ruelas, C. and García, H. S. 2005. Effect of benzyl isothiocyanate on tomato fruit infection development by *Alternaria alternata*. *J. Sci. Food Agric.* 85:1427-1434.
- Venneria, E.; Marinelli, L.; Intorre, F.; Foddai, M. E.; Aurigemma, C.; Durazzo, A.; Maiani, G. and Giusti, M. 2012. Effect of harvest time and minimal processing on nutritional and microbiological quality of three leaf crops. *J. Agric. Bio. Res.* 1(1):11-17.
- Viuda-Martos, M.; Ruiz-Navajas, Y.; Fernández-López, J. and Pérez-Álvarez, J.A. 2007. Antifungal activities of thyme, clove and oregano essential oils. *J. Food Safety* 27:91-101.
- Waterman, P. G. and Mole, S. 1994. Analysis of phenolic plant metabolites. Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK. 238 p.