

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL
PROGRAMA DOCENTE DE INGENIERIA EN CIENCIA Y TEGNOLOGIA DE
ALIMENTOS



Extracción y Cuantificación de glucosinolatos obtenidos de brócoli como control biológico para prevenir el crecimiento del hongo de *Colletotrichum gloesporoides* en mango

POR:

ANA YARELLI DE LA LUZ TORRES

TESIS:

Presenta como requisito parcial para obtener el título de profesional de:
Ingeniero en ciencia y tecnología de alimentos

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL

Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos

**EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE GLUCOSINOLATOS OBTENIDOS DE
BRÓCOLI COMO CONTROL BIOLÓGICO PARA PREVENIR EL CRECIMIENTO
DEL HONGO DE *COLLETOTRICHUM GLOESPOROIDES* EN MANGO**

Presentada por

ANA YARELLI DE LA LUZ TORRES

TESIS

Que se somete a la consideración del H. Jurado examinador como requisito
para obtener el título de:

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Aprobado por el comité de Asesoría:



Dra. Dolores Gabriela Martínez Vázquez

Asesor Interno



Dra. Ana Lilia De Jesús Lázaro

Asesor externo

Buenavista, Saltillo Coahuila, México

Diciembre de 2024

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL

Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos

Presentada por

ANA YARELLI DE LA LUZ TORRES

TESIS

Que se somete a la consideración del H. Jurado examinador como requisito para obtener el título de:

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Extracción y cuantificación de glucosinolatos obtenidos de brócoli como control biológico para prevenir el crecimiento del hongo de *Colletotrichum gloeosporioides* en mango

Aprobada por:

Dra. Dolores Gabriela Martínez Vázquez

Presidente

Dra. Ana Verónica Charles Rodríguez

Vocal

Dr. Espenjo Gastro Del Ángel

Vocal

Dra. Sarahi de Carmen Rangel ortega

Vocal

Mc. Pedro Carrillo López

Coordinador de ciencia-Animal

Buenavista, Saltillo Coahuila, México

Diciembre de 2024



AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a **Dios** por darme vida y salud para poder llegar a culminar esta etapa muy importante en mi vida, y que por más duro y difícil que fuera el camino siempre se puede lograr las metas que uno mismo se proponga en esta vida.

Quiero agradecer a **Don Fermín** y a **Doña Guadalupe** por ser mis ejemplos a seguir en esta vida y sobretodo el apoyo incondicional que me brindaron y que siempre me han impulsado a ser mejor persona en esta vida y por crear una versión de una mujer fuerte e independiente a pesar de estar muy lejos de casa, y por siempre decirme que cualquiera que fuera mi decisión de donde yo quisiera llevar a cabo mis estudios ellos nunca me detendrían y que siempre contaría con su apoyo incondicional, solo me resta decir muchas gracias por enseñarme a volar muy alto. Porque no tengo palabras para agradecer lo mucho que me han dado en esta vida los amo mucho, aunque no se los diga muy frecuentemente.

Agradezco incondicionalmente a mi **ALMA TERRA MATER** por acogerme durante cinco largos años de mi vida y hacer que mi estancia en esta gran universidad haya sido de lo mejor en mi vida, también por darme a los mejores amigos que pude encontrar y encontrar el verdadero significado de la familia y ver como cada uno de tus amigos hace un espacio en su vida para dejarte entrar, gracias por todos los buenos momentos que me hiciste pasar Narrito.

Agradezco a mi novio **EDGAR MACARIO DE LA CRUZ** por su apoyo incondicional cuando le conté mi ilusión por estudiar en la narro, siempre he contado con todo su apoyo en todo y para todo, por ser ese mejor amigo y mi comadre chismosa en los mejores momentos que más lo requería, por siempre quedarte despierto hasta tarde haciéndome compañía cuando tenía que hacer demasiada tarea o tener que estudiar para exámenes, y sobre todo por siempre estar conmigo en todo momento de esta larga travesía universitaria, infinitas gracias por todo.

A mis amigos **RODO, SUSY, ANGEL, OMAR, ALEX**: por dejarme ser parte de su vida, y ser mi Team de la universidad donde con ustedes compartí grandes cosas, nunca nos faltaron las risas, agradezco más que nada porque nunca me dejaron estar sola cuando yo estaba comenzando mi vida universitaria, a pesar de ser de semestres más grandes que yo. Siempre hubo un desayuno en familia con ustedes, espero que se encuentre bien amigos y espero verlos pronto.

A mi mejor amiga de toda la vida **DANIELA**, por ser mi amiga incondicional en las buenas en las malas y en todas nuestras locuras, por eso nuestras mamás ya no nos dejaban estar juntas, pero siempre encontrábamos la manera de vernos, a pesar de que ahorita tiene años que no, nos vemos, llegara el día donde nos podamos reencontrar y platicar de lo bien que nos ha ido en la vida, ver como cada cosa que nos propusimos estamos llegando a lograr, infinitas gracias por tu apoyo incondicional por ser esa súper amiga que nunca pero nunca me abandono en los momentos más difíciles de mi vida, que siempre vio la manera de ver una sonrisa en mi rostro, gracias por estar conmigo apoyándome en todas las decisiones que he llegado a tomar a lo largo de mi vida por todo eso y más te amo vieja.

A mi primera y única amiga de toda la carrera **LIZBETH** gracias por compartir un espacio de tu vida conmigo, por ser mi amiga incondicional, por siempre escucharme; aún recuerdo como si fuera ayer cuando nos sentamos afuera de biblioteca a platicar de nuestras primeras vacaciones en casa, en ese crudo y frio invierno mientras esperábamos nuestra siguiente clase y que rápido se nos fueron 5 años de nuestra vida siendo universitarias, compartiendo clases todos los semestres, metiendo nuestras materias juntas, viviendo cada aventura juntas, como recordar que casi te atropellan cuando habíamos entrado a la narro, e incluso que me ayudaras con mi experimento de tesis, que me pasaras tareas y demás cosas gracias infinitas gracias por ser esa amiga que todos quisiéramos tener por estar para mí 24/7 te quiero mucho mejor amiga de la universidad.

A mi súper amigo **ISMAEL** la manera en la que llegaste a mi vida fue demasiado repentina y ver que te conocí en una de nutras reunionés de la casa y ver que tú eras parte ya de los nuestros, la manera en que entablamos nuestra conversación ver que me brindabas tu amistad y después dejaste que formara parte de tu vida, no tengo palabras para agradecer todo lo que has hecho por mí por tu apoyo incondicional en un momento súper difícil de mi vida y ver que eras la única persona con la que contaba incondicionalmente gracias por ser ese amigo súper protector y nunca dejarme solita y siempre acompañarme en todo momento muchas gracias por todo.

A mi amiga **Montserrat** por siempre apoyarme, más que nada por darme ánimos y siempre estar conmigo para todo momento, por compartir nuestras aventuras como foráneas, ella siendo maestra y yo universitaria, después de un lago tiempo nos mantuvimos distanciadas donde nuestras charlas solían ser por teléfono, pero aun así solíamos compartir como nos iba en el día a día, muchas gracias por ser esa amiga que a pesar de la distancia siempre solemos compartir ideas y apoyarnos mucho.

A mi amiga **Diana Rodríguez** (dino) gracias por dejarme entrar a tu vida y brindarme tu amistad incondicional y volverte como una mama para mí. Por siempre cuidar de mí, alimentarme y dejarme invadir tu cuarto y que en cada viaje que sales siempre me tomas en cuenta para traerme algo. Gracias por estar conmigo cuidándome en mis momentos delicados de salud, gracias por ser un ser maravillo en mi vida.

A mi amiga **DIANA CERVANTES** por ser esa persona tan inesperada que se uniría a mi vida y por convertirte en una gran amiga en la cual podía confiar todo el tiempo, también gracias por pasarme las respuestas del examen, contigo compartí buenos momentos de risa, estrés por no poder salvar ingeniería gracias por ser la persona que eres y ese rayito de sol que siempre está conmigo ayudándome en toda princesa.

A la **Dra. Dolores Gabriela** por brindarme la oportunidad de ser su tesista y por brindarme su apoyo incondicional y por estar para mí cuando me puse muy grave de salud y estar al pendiente de mi proceso de recuperación. Gracias por ser una gran docente conmigo.

A la **Dra. Ana Lilia** por la ayuda que me brindo durante el proceso del experimento y más que nada la paciencia, y por siempre estarme ayudando a que este proyecto se pueda llevar a cabo.

Al **Dr. Epifanio Castro Del Ángel** por apoyarme durante la identificación en el área de microbiología y a pesar de que no era de su área ni departamento, no se negó a brindarme apoyo, muchas gracias Dr. por sus ánimos y decirme que no me diera por vencida.

DEDICATORIAS

Esta tesis va dedicada a la pequeña Ana de hace 20 años que soñaba con ser estudiante de una de las mejores universidades de México y al día de hoy su sueño se cumplió y está a nada de lograr lo que tanto anhelo , que a pesar de la dificultad nunca se dio por vencida que a pesar de estar lejos de casa; de dejar al lado sus comodidades y demás, decidió echar sus sueños en una maleta y salir en busca de sus objetivos en esta vida, que al día de hoy se siente orgullosa de todo los pequeños logros que ha obtenido con mucho sacrificio, pero hacen sentir maravillosa a esa pequeña niña que soñó en algún día poder ser una ingeniera

Esta tesis también va dedicada a mi pequeña sobrina Aurora , que a pesar de ser una niña muy pequeña si empre estuvo para mí en todo momento dándome su apoyo y siempre que me sentía triste por estar lejos de casa ella estaba para mí en cada llamada diciéndome que todo estaría bien que solo estaríamos distanciadas por poco tiempo y que en cada periodo de vacaciones nos veríamos, para hacer todas las cosas que solíamos hacer antes de que yo me viniera a la universidad, gracias mi amor por ser esa niña tan tierna y dulce que eres conmigo, gracias pequeña aurora por ser mi curita al corazón en cada momento frustrante de mi vida, te amo mi pequeña yoyis.

DECLARACIÓN DE NO PLAGIO

El autor quien es el responsable directo, jura bajo protesta de decir la verdad que no se incurrió en plagio o conducta académica incorrecta en los siguientes aspectos:

Reproducción de fragmentos o textos sin citar la fuente o autor original (Corta y pega); reproducir un texto propio publicado anteriormente sin hacer referencia al documento original (auto plagio); comprar, robar, o pedir prestados los datos o la tesis para presentarla como propia; omitir referencias bibliográficas o citar textualmente sin usar comillas; utilizar ideas o razonamientos de un autor sin citarlo; utilizar material digital como imágenes, videos, ilustraciones, graficas , mapas o datos sin citar al autor original y/o fuente, así mismo tengo conocimiento de que cualquier uso distinto de estos materiales como el lucro, reproducción, edición o modificación será perseguido o sancionado por las autoridades correspondientes.

Por lo anterior, me responsabilizo de las consecuencias de cualquier tipo de plagio en caso de existir y declaro que este trabajo es original.

Pasante



Firma y Nombre

ÍNDICE GENERAL

1	INTRODUCCIÓN.....	1
2	JUSTIFICACIÓN.....	7
2.1	OBJETIVOS.....	8
2.1.1	Objetivo general.....	8
2.1.2	Objetivos específicos.....	8
2.2	HIPÓTESIS.....	9
3	REVISIÓN DE LITERATURA.....	10
3.1	Brócoli.....	10
3.2	Requerimientos del cultivo.....	11
3.3	Morfología de la planta.....	11
3.4	Conservación del brócoli y sus compuestos de interés.....	12
3.5	Vida útil o vida postcosecha.....	12
3.6	CLASIFICACIÓN TAXONOMÍA DE BRÓCOLI (<i>BRASSICA OLERACEA</i> L. VAR <i>ITÁLICA</i>).....	13
3.7	Glucosinolatos (GLS).....	14
3.8	MANGO.....	15
3.8.1	Usos:.....	16
3.8.2	Valor nutricional.....	16
3.8.3	Clasificación Taxonómica.....	18
4	MATERIALES Y METODOS.....	19
4.1	METODOLOGÍA.....	¡Error! Marcador no definido.
4.2	Extracción de glucosinolatos.....	20
4.3	Purificación de Glucosinolatos.....	21
4.4	Preparación de soluciones.....	22
4.5	Purificación.....	23
4.5.1	Acondicionamiento.....	24
4.5.2	Adsorción.....	24
4.5.3	Lavado.....	24
4.5.4	Elución.....	24
4.6	Cuantificación de glucosinolatos mediante la técnica de espectrofotometría.....	25
4.7	Inoculación del Hongo a Partir de mango.....	25
4.8	Identificación del hongo.....	27
4.9	Antibiograma de glucosinolatos.....	28
5	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	30
5.1	Obtención de glucosinolatos.....	30

5.2	Cuantificación de glucosinolatos.....	31
5.3	Identificación del hongo.....	34
5.4	antibiograma.....	35
6	CONCLUSIONES.....	36
7	REFERENCIAS.....	37

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. INFORMACIÓN NUTRIMENTAL Y COMPUESTOS FENÓLICOS EN FRUTA FRESCA.....	16
TABLA 2. COMPOSICIÓN NUTRIMENTAL PROMEDIO DE PULPA DE MANGO (x100G)	18
TABLA 3. VARIABLES DETERMINADAS PARA EL EXPERIMENTO.....	20

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. cultivo de brócoli, del departamento de horticultura de la uaaan imagen propia	10
Figura 2. condiciones óptimas para el desarrollo de cultivo de brócoli imagen tomada de google.....	11
Figura 3. morfología de la planta desarrollada, imagen tomada del artículo de impacto de las tecnologías de procesamiento del brócoli sobre compuestos fotoquímicos relevantes en salud humana: una revisión	12
Figura 4 . distribución de pérdidas y desperdicios del brócoli imagen tomada de la página de mi cultivo con bayer.....	13
Figura 5. alimentos de donde provienen los glucosinolatos imagen obtenida de la página de martha duran.....	14
Figura 6 los glucosinolatos presentan propiedades antifúngicas por lo que su uso como agente bio fungicida ya ha sido reportada fuente.....	15
Figura 7. a) variedad más comerciable de mango, b) diferentes procesos de maduración ambas imágenes fueron tomadas de google	15
Figura 8. productos derivados a base de mango imagen tomada del articulo alimentos vegetales autóctonos iberoamericanos subutilizados	16
Figura 9. desarrollo de las etapas de la planta de mango, desde la floración hasta la obtención del futo imagen según (aubert y lossois, 1972).....	17
Figura 10. a) recolección de cultivo de cien días sin tratamiento tomado del departamento de horticultura b) desprendimiento d hojas y flores de brócoli para procesarlo c) materia vegetal lista para llevar a cabo el proceso de liofilización imágenes propias.	19
Figura 11. a) peso de muestra ya liofilizada b) realizar una molienda y posteriormente un tamizado c) calentar la muestra a baño maría con la solución de metanol imágenes propias	20
Figura 12. purificación del extracto con la ayuda de un cartucho	21
Figura 13. a) etiquetado de recipientes para guardar nuestras soluciones ya preparadas b) reactivos con los que se prepararan soluciones c) pesar los gramos requeridos de cada reactivo, imágenes propias.....	22
Figura 14. preparación de soluciones, imagen propia.....	22
Figura 15.a) colocar tres mililitros de extracto de brócoli, b) añadir cien micro litros de acetato de plomo. c) cortar la reacción con treinta micro litros de ácido clorhídrico concentrado, imagen propia.....	23
Figura 16. cartucho lc-sax (supelco®).....	24
Figura 17. ilustración del proceso de acondicionamiento ilustración propia	24
Figura 18. gráfico de barras de la extracción de los glucosinolatos, la mayor cantidad de glucosinolatos se obtuvo de las flores y las variables que mayor impacto tienen sobre la extracción de glucosinolatos	25
Figura 19.a) pesar la cantidad indicada para preparar el medio de cultivo, b) hidratar el medio de cultivo en un litro de agua, c) esterilizar el medio de cultivo en una autoclave, imagen propias	25
Figura 20. a) muestra de mango contaminada de antracnosis, b) tejido vegetal finamente extraído para sembrar, c) solución de hipoclorito de sodio para hacer un triple lavado al tejido, d) poner a secar el tejido en una sanita estéril, imágenes propias.....	26
Figura 21.siembra de tejido vegetal en medio de cultivo para purificación, b) primera purificación de la cepa del hongo colletotrichum, c) segunda siembra de la primera purificación del hongo.....	27

Figura 22. crecimiento de la sepa de la primera purificación del hongo, imagen propia.	27
Figura 23. a) acondicionamiento de cámara húmeda para tomar la muestra de un conidio, b) muestra al microscopio para observar la cepa del hongo.	28
Figura 24. antibiograma como agente preventivo para evitar crecimiento del hongo imágenes propias.	29
Figura 25. a) calentar 20 gr de muestra con etanol a una temperatura de 70 ^o c con un tiempo de 150 min, b) recolección de extracto ya centrifugado y purificado imágenes propias	30
Figura 26. efecto de las variables sobre la concentración final de glucosinolatos, (b) resumen del efecto de las variables sobre la extracción de los glucosinolatos, (c) curva de nivel del efecto de las variables sobre la extracción de glucosinolatos, todo esto s	31
Figura 27. (a) efecto de las variables sobre la concentración final de glucosinolatos obtenidos en las hojas, (b) resumen del efecto de las variables, (c) curva de nivel del efecto de las variables	32
Figura 28. (a) efecto de las variables sobre la concentración final de glucosinolatos obtenidos en los floretes, (b) resumen del efecto de las variables, (c) curva de nivel del efecto de las variables	33
Figura 29. gráfico de barras de la extracción de los glucosinolatos, la mayor cantidad de glucosinolatos se obtuvo de las flores y las variables que mayor impacto tienen sobre la extracción de glucosinolatos	33
Figura 30. (a) sección de acérvulo de un portaobjetos: conidióforos, conidios y setas del cultivo.....	34

RESUMEN:

La antracnosis es una enfermedad que se presenta en la etapa de pre y postcosecha en mango (*Mangifera indica* L.), esta es causada por varios hongos, entre los cuáles conocido como *Colletotrichum gloeosporioides* y *C. acutatum* (teleomorfo: *G. acutata*). El uso de tratamientos químicos que suelen dejar rastro y ser inseguros para el consumo humano, es por ello que se han desarrollado estrategias para sustituir estos componentes químicos. El objetivo del presente trabajo es realizar la Extracción, purificación y cuantificación de glucosinolatos a partir de floretes de brócoli para el control de *Colletotrichum gloeosporioides* en condiciones *in vitro*. Se utilizó un diseño de experimentos de 3³ con las siguientes variables, temperatura, tiempo y concentración, con la ayuda de estas se pudo obtener los glucosinolatos. La mayor cantidad de glucosinolatos se obtuvo de los floretes a una temperatura de 70 °C, tiempo de 150 min y la concentración del solvente: agua del 70%. Este extracto se utilizó para inhibir el crecimiento del fitopatógeno, el cual se aisló de un mango en estado avanzado de maduración, se proliferó en medio agar papa dextrosa (PDA) a una temperatura de 40 °C y 35 % de humedad y se identificó. La inhibición se realizó *in vitro* agregando el extracto directamente mediante un antibiograma en medio PDA a una temperatura de 25 °C y una humedad relativa de 20 %; resultando una mejor inhibición mediante la adición de 1 mL de los glucosinolatos. Como conclusión obtuvimos que nuestro extracto funciona en un 76% y se logró la obtención de glucosinolatos extraídos de las flores de brócoli, tras la purificación se obtuvieron 168 mg/g de muestra.

1 INTRODUCCIÓN

1. Antracnosis

La antracnosis es una enfermedad que se presenta en la etapa de pre y postcosecha en mango (*Mangifera indica L.*), esta es causada por un hongo conocido como *Colletotrichum gloeosporioides* y *C. acutatum* (teleomorfo: *G. acutata*) (Arauz, 2000; Dodd *et al.*, 1997). La antracnosis en mango es una enfermedad significativa la cual degrada el estado de calidad del fruto, una de las grandes desventajas es que los frutos contienen un alto nivel de nutrientes esenciales que mantienen un pH favorable donde los hongos se puedan desarrollar (Moss, 2002).

Una de las características del hongo causante de la antracnosis es que permanece en estado quiescente, regularmente en los frutos inmaduros. En el control postcosecha se puede realizar mediante diferentes tratamientos entre los que destacan los físicos, químicos y biológicos (Yonas y Amare, 2008).

Los daños más comunes por la antracnosis se hacen presente cuando estos comienzan su madurez fisiológica esto afecta su calidad e incluso las posibilidades de su comercialización (Ploetz *et al.*, 1994; Ramírez, 1991).

1.1 Antracnosis en mango

La antracnosis en mango es una enfermedad que provoca deterioro en la calidad del fruto y por ello en la disminución de la producción, esto se da principalmente en regiones con temperatura y humedad relativa. Esta es una enfermedad que se encuentra distribuida por todas las zonas productoras de México con ataques severos ocasionando pérdidas alrededor del 15 al 50%, una de las estrategias principales ha sido realizar la aplicación de fungicidas sintéticos (Becerra-Leor, 1995; Eckert y Ogawa, 1985; Orozco, 1992; Vega, 1994).

En México se caracteriza por ser una enfermedad que ataca hojas, inflorescencias y frutos en las regiones de mango siendo esta el daño más importante en la postcosecha (García, 1976; Mosqueda-Vázquez *et al.*, 1996; Allende-Molar *et al.*, 2003; Benítez-Camilo *et al.*, 2003).

1.2 Medidas de control de la antracnosis

Para poder controlar el problema de antracnosis generalmente se llegan a utilizar fungicidas sintéticos siendo bencimidazoles siendo los más efectivos como tratamiento en postcosecha estos han sido retirados del mercado y prohibido su uso en países desarrollados esto es debido a que suelen resultar muy tóxicos (Gutiérrez *et al.*, 2004).

A raíz de esto se han promovido otros métodos o alternativas de control como inmersión de los frutos en agua caliente, también el uso de aplicación de sales inorgánicas, almacenamiento de atmosfera controladas y modificadas; otra de las alternativas es utilizar productos naturales biológicamente activos como lo es el ácido acético, propóleo, quitosano, extractos vegetales, incluso estrategias de control biológico. Se han desarrollado técnicas que aseguren el manejo adecuado de dicha enfermedad y así pudiendo disminuir los limitantes de productividad en el cultivo de mango (Ong y Ali, 2015).

1.2.1 Procedimientos químicos

Actualmente la antracnosis se combate con ayuda de la aplicación de fungicidas los cuales con dosis adecuadas han tenido buenos resultados teniendo un modelo preconcebido de las características de cada producto químico, se debe tener en cuenta que hacer la aplicación adecuada de los fungicidas para alcanzar un control adecuado, efectivo y económico. (Dodd *et al.*, 1991)

Una de las sustancias más comúnmente usadas en el control de esta enfermedad como fungicida es Benomilo, este somete al patógeno a una alta presión de selección, también se realiza la tendencia de generaciones (reproducción sexual-asexual), para facilitar la presencia de las cepas resistentes a esta molécula durante el periodo de vida del hongo. Se han desarrollado técnicas que aseguren el manejo adecuado de dicha enfermedad y así pudiendo disminuir los limitantes de productividad en el cultivo de mango. (Punnawich-Yenjita, 2010).

Se han desarrollado técnicas que aseguren el manejo adecuado de dicha enfermedad y así pudiendo disminuir los limitantes de productividad en el cultivo de mango.

1.2.2 Procedimientos físicos

En los últimos años se ha encontrado un creciente interés por encontrar productos alternativos que permitan llegar a suplir a los productos químicos, se requiere que los nuevos productos que estén por desarrollarse sean más amigables con el medio ambiente y seguros y con un riesgo mínimo para la salud de los seres humanos (Martínez-Romero *et al.*, 2008).

Otra de las estrategias para estar previniendo dicha enfermedad en etapa postcosecha son el uso de sales orgánicas como ejemplo tenemos a CaCl_2 en frutos y cítricos (Conway *et al.*, 1991; McLaughlin *et al.*, 1990)

Durante tiempo la aplicación de tratamientos térmicos has sido gracias a la tecnología comúnmente más utilizada es la estabilización de alimento debido a su alta capacidad que contiene de destruir a los microorganismos e hacer la inactivación de enzimas. Por el contrario, se sabe que el calor no solo afecta las propiedades organolépticas del fruto, sino que también reduce algunos nutrientes (González, 2005).

1.2.3 Procedimientos biológicos

El control biológico se puede interpretar como la reducción del inoculo o una actividad productora de dicha enfermedad del patógeno debido a uno o más organismo en la planta hospedera (Baker y Cook, 1974).

El control biológico o el uso de microorganismo antagonistas ha sido una alternativa viable para el control de enfermedades en la etapa de pre y postcosecha (Hernández *et al.*, 2007). Esta es una de las técnicas comúnmente más seguras y efectivas para el consumidor y sobre todo para el medio ambiente (Mejía *et al.*, 2008).

Los microorganismos suelen ser utilizados como agentes de control biológico donde se pueden aislar frutas y hojas o también pueden ser inoculados artificialmente en contra de los patógenos (Núñez, 2012).

A nivel mundial el uso de sustancias orgánicas en vegetales es muy importante, esto se hace para el control de plagas y enfermedades, tomando en cuenta que estos no deben contener algún tratamiento químico, (Stauffer *et al.*, 2000); esto se hace principalmente con cultivos de zonas tropicales,

estos son afectados por enfermedades que causan grandes pérdidas económicas, principalmente en el cultivo de mango, esto se debe a que su principal control es a base de tratamientos químicos. (Mendoza *et al.*, 2007),

En México los estudios acerca del control de la antracnosis a través de productos orgánicos son muy escasos, por el desconocimiento de su progreso epidemiológico (Orozco *et al.*, 2007).

1.3 Glucosinolatos

Los glucosinolatos son compuestos nitro azufrados cuya presencia es del género Brassica en, son muy importantes desde los años de 1970 en la actualidad se conocen aproximadamente 120 tipos de glucosinolatos estos contienen azufre y nitrógeno, los cuales se encuentran principalmente en plantas del orden de los Caparales, la cual es el brócoli (*Brassica oleracea cv. 'Itálica'*) (Witts-tock y Halkier, 2002), esto contienen una cadena de carbono de un tamaño variable con aminoácidos, de acuerdo con estos los glucosinolatos se dividen en alifáticos, indólicos y aromáticos, en la planta de brócoli el glucosinato de mayor presencia y con una gran concentración es el glucorafano, es un glucosinato alifático (Van-Eylen *et al.*, 2009).

Los glucosinolatos son metabolitos secundarios, estos son compuestos que constituyen un sistema protector, tienen propiedades anticancerígenas excepcionales de los brotes de brócoli esto es resultado a la presencia de sulforafano (Zhang, P. Talalay,1992), cuando el tejido vegetal llega a ser triturado en presencia de humedad, estos llegan a presentar una hidrólisis enzimática la cual les causa un daño y eso hace que se liberen compuestos fisiológicamente activos (McGregor *et al.*1983). Los glucosinolatos que se encuentran en el brócoli poseen propiedades que ayudan a los productos que se encuentran en estado de degradación

Una de las principales fuentes de los glucosinolatos son las plantas de las familias de las crucíferas, las que más destacan y tienen un gran interés comercial son: col de brúcelas, brócoli, repollo, coliflor (Shahidi *et al.*, 1997) la cantidad de los glucosinolatos puede llegar a variar dependiendo de la textura

de la planta, estos son hidrolizados por la enzima de la mirosinasa, donde se obtienen compuestos biológicamente activos entre los que se destacan isotiocianatos sulfuranos, nitrilos y tiocianatos. (Inis *et al.*, 2011).

El proceso de hidrólisis en glucosinolatos se obtiene cuando el tejido vegetal se rompe, eso es consecuencia de un daño mecánico, por lo tanto, las enzimas tioglucosidasa o mirosinasa se pone en contacto con el sustrato y libera moléculas de glucosa (Olga N. *et al.*, 2009).

1.3.1 Purificación

Una de las alternativas que ha sido posible emplear la cromatografía en capa fina (CCF) esta es acoplada en la densitometría, esta técnica permite realizar los siguientes análisis cuantitativos y cualitativos de diferentes compuestos con una gran precisión de algo similar a la obtenida por el medio de HPLC, incluso a bajo costo de los insumos, tiempo de análisis y volumen de disolventes (Panglossi, 2006).

1.3.2 Técnicas de cuantificación

Una de las alternativas fue hacer la extracción sostenible de glucosinolatos para obtenerlos intactos de la hoja del brócoli al igual que del fruto lo cual se hizo por medio de UHPLC-qTOF –MS esto permitió hacer una determinación rápida selectiva y sobretodo sensible (Ares *et al.*, 2015).

Por otra parte, la cocción en microondas viene siendo una de las alternativas muy efectivas ya que se ocupa una escasa cantidad de agua (Castro, 2011) y así mismo esto se utiliza para poder inactivar la enzima de la mirosinasa lo cual es una pérdida insignificante de glucosinolatos (Travis, 1999). Así mismo se usa otro método es el de cocción sobre la actividad de mirosinasa esta muestra una muestra de glucosinolatos totales al igual que individuales (Brewer *et al.*, 1994).

1.3.3 Glucosinolatos en el control de la antracnosis

Se ha encontrado que los floretes aislados de brócoli en ciertas concentraciones las cuales son de 1.54 y 0.92 $\mu\text{g}/\mu\text{L}^{-1}$ lograron hacer la inhibición en su totalidad de la germinación de esporas *Colletotrichum gloesporioides* aislado de mango (Rafael, 2018).

El extracto de raíces de *Gliricida sepium* en contra *C. gloeosporioides* fue probado para reducir en un 94% la severidad en contra de antracnosis, sobre los frutos de papaya en etapa postcosecha (Loaiza y Rivera, 2000).

1.3.4 Antibiograma para el control de la antracnosis

Actualmente existe una estrategia para prevenir esta enfermedad y es utilizando fungicidas como agente preventivo, la cual está siendo restringida por los efectos que pueden causar en la salud de nuestros consumidores (Yonas y Amare, 2008), a causa de estos efectos se encuentra una gran probabilidad de que los seres humanos se vean afectados por altos niveles de compuestos químicos (Tripathi y Dubey, 2004). En años recientes se han realizado estudios para encontrar una alternativa para suplir los fungicidas y saludable para nuestros consumidores y a su vez sean más amigables con el medio ambiente (Martínez-Romero *et al.*, 2008).

2 JUSTIFICACIÓN

El presente trabajo tiene como finalidad prolongar la vida útil de anaquel en mango, esto se hace para poder prevenir el problema de antracnosis que se presenta comúnmente en el fruto la cual causa severos daños fisicoquímicos y sensoriales, esto se lleva a cabo con ayuda de un extracto obtenido a base de brócoli.

El brócoli es una de las crucíferas que se consume en gran cantidad a nivel mundial, esta planta es una de las que posee un elevado contenido de glucosinolatos y también tiene propiedades anticancerígenas, han demostrado tener diferentes actividades biológicas, cómo son la antiinflamatoria, antioxidante además de ser considerado como la hortaliza con mayor valor nutritivo por unidad de peso, Además de su utilización al estado fresco, esta hortaliza presenta excelentes características para procesamiento en la forma de producto congelado. Este contiene vitamina A y C potasio y fibra las plantas crucíferas tienen demasiados beneficios a la salud.

En este caso presente el brócoli solo se utiliza la parte comestible y el resto se utiliza como desperdicio o en algunos casos se implementa como alimento para los animales, lo cual genera grandes pérdidas económicas muy importantes a nivel industria, la finalidad es poder sacar beneficios de las hojas, tallos en los cuales encontramos glucosinolatos estos son moléculas nitroazufrados que ayudan a prevenir la degradación del fruto de mango.

2.1 OBJETIVOS

2.1.1 Objetivo general

Extraer, purificar y cuantificar glucosinolatos de brócoli para el control de *Colletotricum gloesporoides* en condiciones *in vitro*.

2.1.2 Objetivos específicos

- Extraer los glucosinolatos utilizando un diseño de experimentos 3^3 , con agua:metanol en 3 diferentes concentraciones, tres temperaturas y tres tiempos diferentes.
- Purificar los glucosinolatos mediante el sistema SPD.
- Cuantificar los glucosinolatos mediante espectrofotometría.
- Determinar la inhibición *in vitro* de *C. gloesporioides* en un sistema antibiograma utilizando los glucosinolatos extraídos de brócoli.

2.2 HIPÓTESIS

La generación de un extracto de glucosinolatos a partir de flores a base de brócoli inhibirá el crecimiento *in vitro* de *Colletotrichum gloesporoides* causante de la antracnosis del mango.

3 REVISIÓN DE LITERATURA

3.1 Brócoli

El brócoli (*Brassica olearacea* L. var *Itálica*), tiene sus orígenes en las costas del mediterráneo y Asia Occidental, encontrándose en la actualidad en Grecia, Turquía y Siria, para después ser llevada a España, Francia, Holanda, Dinamarca e Inglaterra. Su nombre proviene del italiano “broco” referenciando al brote, una parte comestible de la planta (Jaramillo y Díaz, 2006). En la actualidad, la temperatura media de las regiones donde se cultiva es de 18 a 23 °C. En 2011, la FAO reconoció a China como el principal productor de Brassica con una producción anual de más de ocho millones de toneladas por año (ton/año) (FAOSTAT, 2011)



Figura 1. Cultivo de brócoli, del departamento de horticultura de la uaaan imagen propia

Las poblaciones le dan un alto valor a este alimento, no solo por sus buenas características organolépticas, sino por sus excelentes beneficios a la salud como sus propiedades antioxidantes, antimicrobianas, bactericidas y anticancerígenas (Ares *et al.*, 2015).

Es una hortaliza utilizada a nivel mundial y esta es perteneciente a la familia de Brassicaceae, la cual es una familia que contiene una completa taxonomía y sistemática la cual está compuesta por 341 géneros y 3977 especies. La cual se puede distinguir fácilmente de otras familias de plantas con flores, esto es debido a la presencia de una corola cruciforme (cuatro pétalos dispuestos en forma de cruz) (Franzke *et al.*, 2011).

3.2 Requerimientos del cultivo

Este cultivo tiene un inicio el cual es por almacigo y posteriormente un trasplante al igual que sus temperaturas optimas varían entre los 16 a 21 °C esto va dependiendo del cultivar. La planta y la pella son muy sensibles a las heladas, pero si llegan a resistir las altas temperaturas, para obtener una mejor cosecha de brócoli debe ser en suelos con pH óptimos entre ellos la neutralidad o también pueden ligeramente ácidos con un promedio de (pH = 6,5 y 7,0) (Del Pino, 2014).



Figura 2. condiciones óptimas para el desarrollo de cultivo de brócoli imagen tomada de google

3.3 Morfología de la planta

La planta de brócoli es de una naturaleza herbácea con un tallo principal cuyo diámetro es aproximadamente de 2 y 6 cm, de 20 a 50 cm de largo, la parte superior del tallo está limitada por el desarrollo de la inflorescencia principal, las únicas ramificaciones que llega a tener presentes son las inflorescencias secundarias que las encontramos presentes en los nudos superiores.

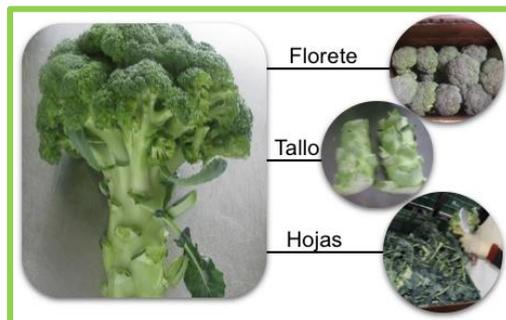


Figura 3. morfología de la planta desarrollada, imagen tomada del artículo de Impacto de las tecnologías de procesamiento del brócoli sobre compuestos fotoquímicos relevantes en salud humana: una revisión

Esta hortaliza llega a tener aproximadamente de 15 a 30 hojas grandes, la cuales miden 50 cm en promedio y 30 cm de ancho la superficie de las hojas presenta una cutícula cerosa bastante desarrollada e impermeable.

Las inflorescencias de tipo pella es un corimbo, esto llega a estar conformado por numerosas flores las cuales en estado inmaduro constituye la parte comestible de esta hortaliza a la pella es conocida como cabeza y esta se denomina como florete esto es el conjunto de flores individuales.

3.4 Conservación del brócoli y sus compuestos de interés

La necesidad de la conservación de las verduras Brassica surge por su naturaleza estacional y perecedera, la disponibilidad de poder contar con estos alimentos para consumo posterior y de entrega a distancias largas de las áreas agrícolas. Los productos alimentarios de Brassica antes de ser llevados al consumidor son procesados por diversos tratamientos postcosecha que incluyen corte, picado, refrigeración y almacenamiento (Nugrahedí et al., 2015).

3.5 Vida útil o vida postcosecha

El brócoli tiene una vida aproximada de tres a cuatro semanas con una temperatura de almacenamiento de 0° c y con una humedad relativa aproximada mayor a un porcentaje del 95% pero esto es tan solo con un almacenamiento de tres a cuatro días con una temperatura de 24° c (Wang, 1977).

Las hortalizas que se encuentran pertenecientes a la familia de Brassicaceae, contienen un amplio rango de tasa de senescencia e

intensidades respiratorias, se ha encontrado que la calidad postcosecha del brócoli varía considerablemente entre los diferentes cultivares, tanto como las prácticas de cultivo y otro factor también depende de cómo se llegue a realizar la fertilización nitrogenada (Kader,2002)

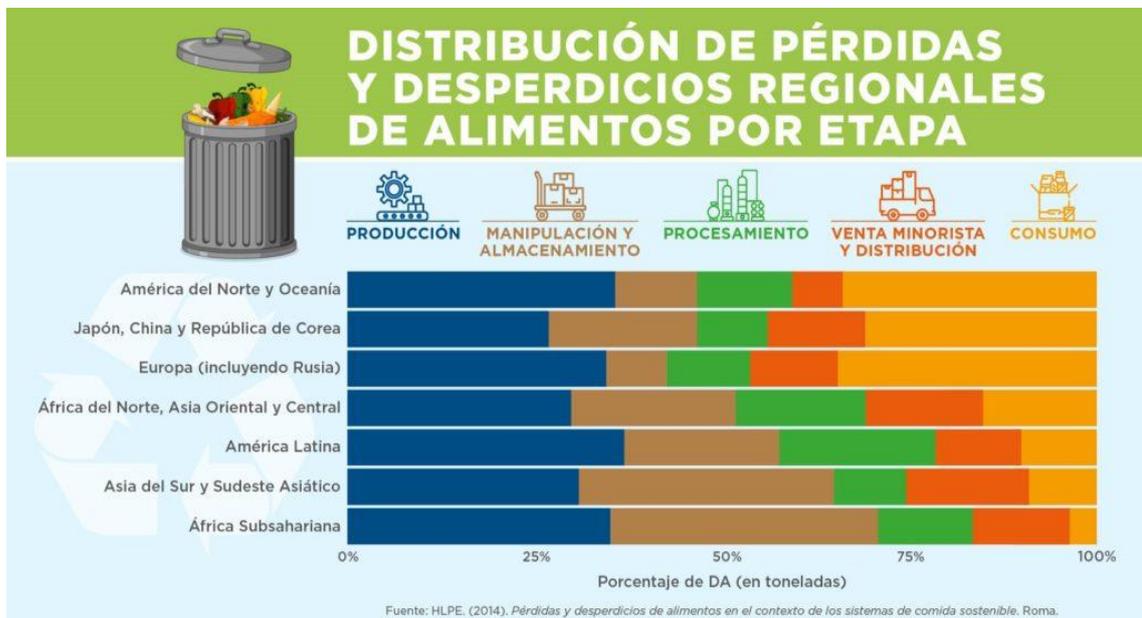


Figura 4. Distribución De Pérdidas Y Desperdicios Del Brócoli imagen tomada de la página de mi cultivo con Bayer

3.6 CLASIFICACIÓN TAXONOMÍA DE BRÓCOLI (BRASSICA OLERACEA L. VAR ITÁLICA)

Reino: Plantaje

División: Angiospermas, magnoliophita

Clase: Dicotyledonea Magnoliophita

Orden: Crucíferas (Brassicales)

Familia: Crucífera (Brassicaceae)

Género: Brassica (Brassica)

Especie: (oleácea)

Subespecie: *Coliflor*

Cronquist (1981)

3.7 Glucosinolatos (GLS).

Los GLS de la familia de plantas Brassicaceae son compuestos que contienen nitrógeno y azufre, resultantes de la unión de un azúcar reductor y donde el azufre no cuenta con hidrato de carbono (aglicona) (Schonhof *et al.*, 2004), son contribuyentes del aroma y el sabor de las Brassicaceae; esto está bajo su poder biológico que incrementa luego de ser hidrolizados (Lampe, 2003). Los GLS son estables normalmente en el interior de las células vegetales, pero, cuando sufren daños las células y tejidos vegetales, comenzarán a ser hidrolizados (Gu *et al.*, 2012).



Figura 5. alimentos de donde provienen los glucosinolatos imagen obtenida de la página de Martha duran

El transcurso del proceso de hidrólisis de los GLS consta de dos etapas: (1) la mirosinasa se unirá covalentemente con el residuo de glucosa del glucosinolato liberando aglicona, conocido como el paso de glicosilación (Avato *et al.*, 2013; Rask *et al.*, 2000); (2) se libera la glucosa y la enzima se activará en presencia de una molécula de agua, conocida como desglicosilación. La aglicona puede ser el inestable y transformarse a ácido tihidroxima-O-sulfónico para luego convertirse en IC. Los IC formados de los GLS con un grupo adherido derivado de fenilalanina o metionina, a un pH cercano a neutro, no sufren ninguna transformación adicional. A diferencia, los IC se estarán sometiendo a ciclización a oxazolidina-2-tionas. Los IC de los GLS con cadena lateral indol (derivada del triptófano) se convertirán en alcoholes (Patyra *et al.*, 2016; Grubb *et al.*, 2006).

Todos los glucosinolatos son almacenados en la vacuola celular de la planta y estos se transportan por medio del floema y estos pueden ayudar a la planta a defenderse de los organismos que se alimentan de ella.

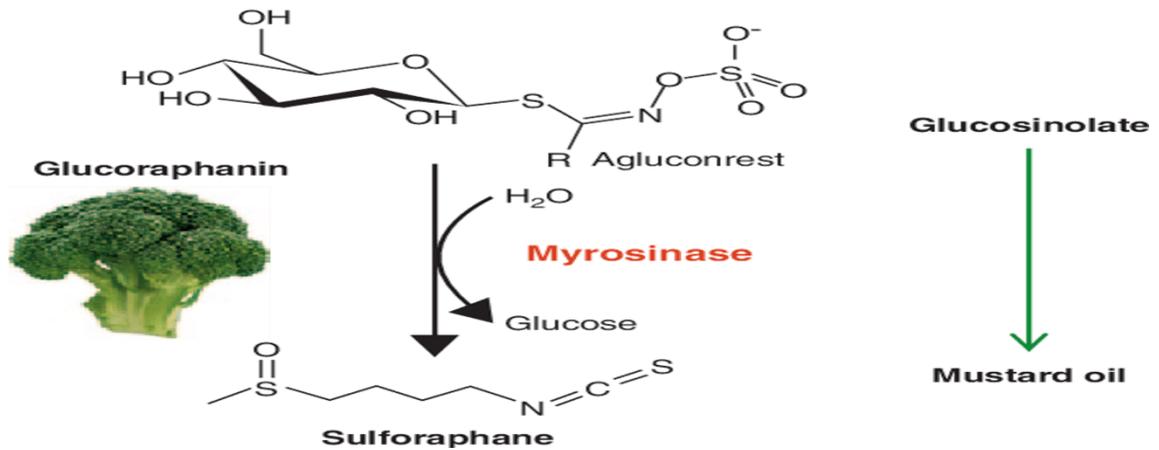


Figura 60. Los glucosinolatos presentan propiedades antifúngicas por lo que su uso como agente bio fungicida ya ha sido reportada (Moreno, 2008)

3.8 MANGO

El mango es una de las especies indudablemente de mayor importancia dentro de la familia Anacardiáceas, junto por su distribución mundial; tiene una gran importancia económica se encuentra dentro del rango de uno de los 5 frutos más consumibles en el mundo, basados en las estadísticas realizadas por la FAO en el año 2005 este es producido en 70 países (Galán Sauco, 1997).

Es uno de los frutos con muy alto potencial económico en el extranjero y para México representa un alto valor monetario (FAO, FAOSTAT, 2006).



Figura 7. A) variedad más comerciable de mango, B) diferentes procesos de maduración ambas imágenes fueron tomadas de google

3.8.1 Usos:

Esta fruta es ingerida como fruta fresca tanto como en jugos, helados, dulces, mermeladas y conservas, el mango es considerado como una fruta altamente saludable por su elevado contenido de agua (86.1%) (siap, 2016).



Figura 8. productos derivados a base de mango imagen tomada del artículo alimentos vegetales autóctonos iberoamericanos subutilizados

3.8.2 Valor nutricional

El mango también es una importante fuente de fibra, siendo particularmente soluble en MP (pectinas, almidones) e insoluble en MC (ligninas y hemicelulosa). Por último, el mango también se caracteriza por presentar un contenido elevado de vitaminas y minerales (tales como ácido ascórbico, tiamina, riboflavina, niacina y β -carotenos

Tabla 1. información nutrimental y compuestos fenólicos en fruta fresca

contenido	fruta fresca
azúcares totales	11,9g/100g
proteínas solubles	6g/100g
lípidos	5.9g/100
compuestos fenólicos	100mgEAG/100g
fibras solubles	40g/100g
Actividad antioxidante (ABTS) CD50	sugEAG/mL

Fuente, Claudia Verónica Lazarte y María E. Fátima Nader-Macías

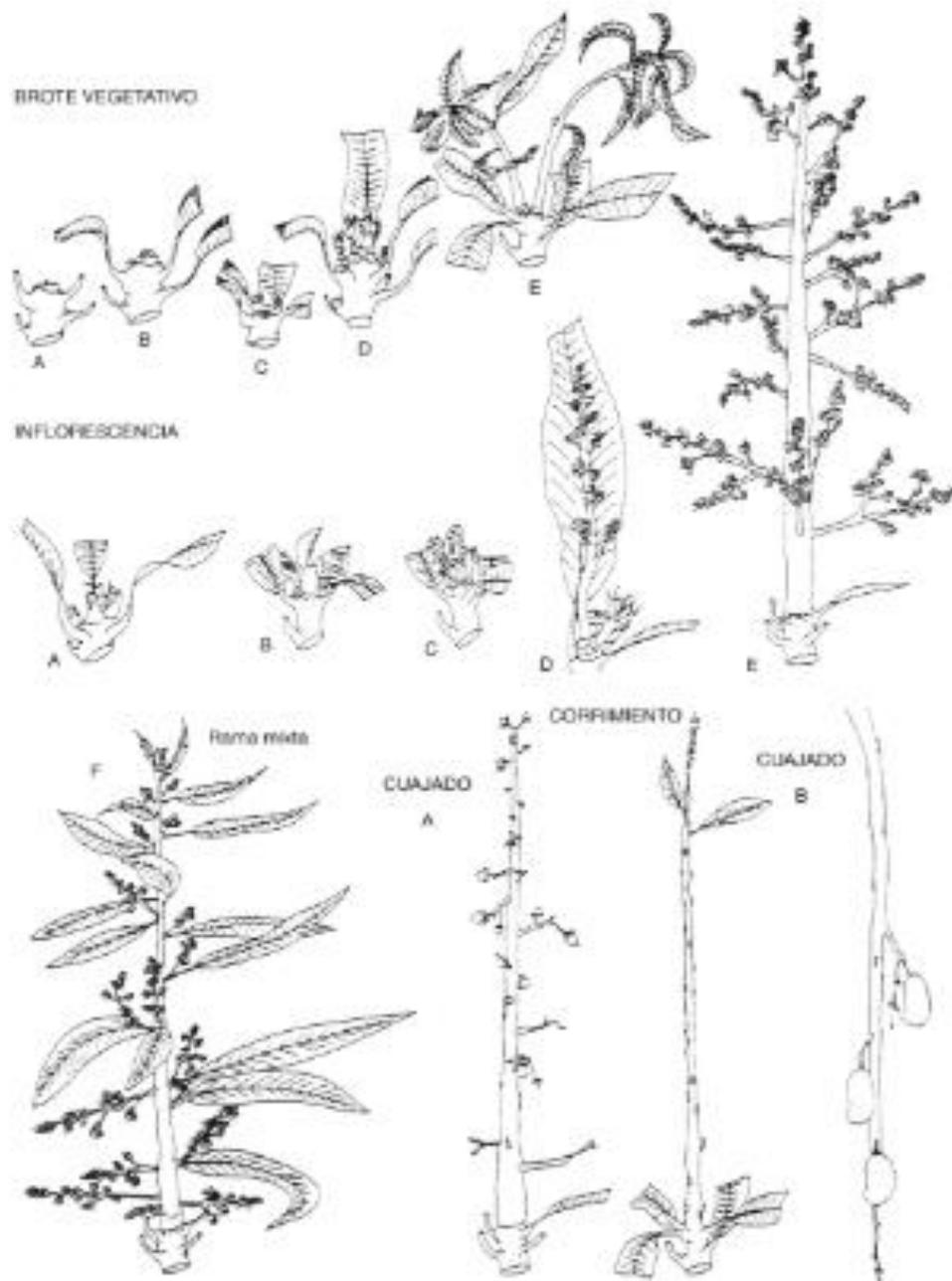


Figura 9. desarrollo de las etapas de la planta de mango, desde la floración hasta la obtención del futo imagen SEGÚN (aubert y lossois, 1972)

Tabla 2. composición nutrimental promedio de pulpa de mango (x100g)

Macronutrientes (g)		Minerales		vitaminas (mg)			
Agua	83.5	Ca	11	AA	36.4	A(EqR)	54
Proteína	0.8	Fe	0.16	Tiamina	0.03	A(IU)	1082
Grasa	0.4	Mg	10	Riboflavina	0.04	E	0.9
CHOS	15	P	14	Niacina	0.67	K	4.2
Fibra	1.6	K	168	B6	0.12	D	0
Azúcares	13.7	Na	1	Folatos (g)	43	B12	0
Energía (Kcal)	60	Zn	0.09				

(Mangos, Raw: 09176); Carbohidratos (CHOS)

3.8.3 Clasificación Taxonómica

Clase: Dicotyledonea

Subclase: Rosidae

Orden: Sapindales

Suborden: Anacardiineae

Familia: Anacardiaceae

Género: *Mangifera*

Especie: *Indica*

(Dar *et al.*, 2016)

4 MATERIALES Y METODOS

4.1 Tratamiento de muestras de Brócoli

Las muestras de brócoli cosechadas, se obtuvieron del departamento de Horticultura de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, sin tratamiento alguno, con 100 días de crecimiento. Posteriormente, las muestras fueron llevadas al laboratorio para su posterior análisis; tallos, hojas e inflorescencias, fueron seleccionados para posteriormente córtalos finamente uno por uno, en el caso de los tallos con un grosor de 1 cm aproximadamente, las hojas en tiras lo más finas posibles y en el caso de las inflorescencias en trozos de 2 cm en promedio, posterior a los cortes las muestras fueron lavadas con agua suficiente, seguido de un secado en toallas de papel para finalmente llevarlos a congelar y liofilizar hasta peso constante para eliminar el agua contenida en el brócoli.



Figura 10. a) recolección de cultivo de cien días sin tratamiento tomado del departamento de horticultura B) desprendimiento d hojas y flores de brócoli para procesarlo C) materia vegetal lista para llevar a cabo el proceso de liofilización imágenes propias.

4.2 Extracción de glucosinolatos

Se utilizó un diseño de experimento de 3^3 con las siguientes variables que se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. variables determinadas para el experimento

variable	T (°C)	t (min)	C (v/v)
Hojas	25	30	60:40
Tallos	47.5	90	70:30
Flores	70	150	80:20

En el caso de las muestras se pesaron 20 gramos de cada: tallos, hojas e inflorescencias, se colocaron sobre un mortero para homogeneizar las muestras, con mucho cuidado se colocó la muestra ya molida en frascos de vidrio adicionando 5 mL de solución metanol/agua en las tres proporciones mencionadas, pasando este tiempo se evaporó el metanol en una estufa a 70 °C, el residuo se centrifugó, congeló y liofilizó hasta peso constante, las muestras se guardaron en el congelador a 4 °C hasta su utilización.

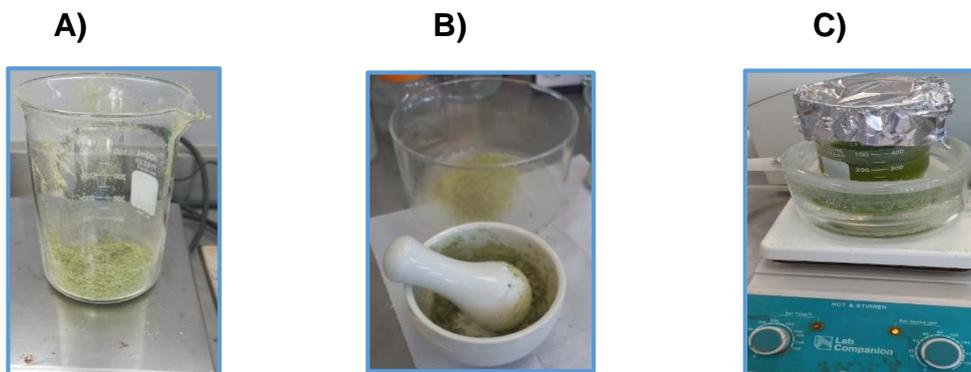
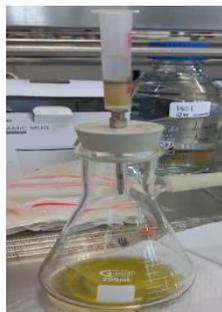


Figura 11. A) peso de muestra ya liofilizada B) realizar una molienda y posteriormente un tamizado C) calentar la muestra a baño maría con la solución de metanol imágenes propias.

4.3 Purificación de Glucosinolatos

El proceso de determinación de glucosinolatos comenzó con la purificación del extracto. Primeramente, se realizó un pretratamiento del extracto centrifugando (Centrifuga VALED PRIME, EUA).

El primer paso fue la purificación del extracto con cartuchos LC-SAX (Supelco®, Analytical Products, EUA), el cartucho fue colocado en una aguja de jeringa en un corcho, se utilizó como tapón en un matraz de vacío conectado a una bomba de vacío ROCKER 300, AC 100 V-120 V, Taiwán; para una rápida filtración. Con la bomba activa, el cartucho fue primeramente activado 5 mL de metanol puro para desplazar el n-Hexano, posteriormente 10 mL de agua desionizada (agregando uno tras otro lentamente), después se agregaron 3 mL de extracto y se añadió 10 mL de solución de metanol al 3% v/v para eliminar sustancias que pueden estar retenidas y que no son de interés y, finalmente, se realizó una elución con 3 mL de metanol puro, colocando un tubo de ensaye para recuperar el extracto purificado.



A)



B)

Figura 12. purificación del extracto con la ayuda de un cartucho LC-SAX(SUPELOO) B) recolección del extracto ya purificado imágenes propias

4.4 Preparación de soluciones

Después de la centrifugación, se tomaron 0.2 mL de la purificación tratada con PVPP y se mezclaron con 0.2 mL de hidróxido de sodio 2 M, incubándolo por 30 min. Posteriormente, se añadió 30 μ L de ácido clorhídrico concentrado y se centrifugó a 4000 rpm por 10 min. Para la medición espectrofotométrica se tomaron 100 μ L de la purificación tratada y se mezcló con 100 μ L de solución de ferrocianuro 2 mM en buffer fosfato 0.2 M, pH 7. Finalmente, se midió la absorbancia de la solución a 420 nm antes de 15 s, utilizando como blanco el buffer de fosfato 0.2 M, pH 7.

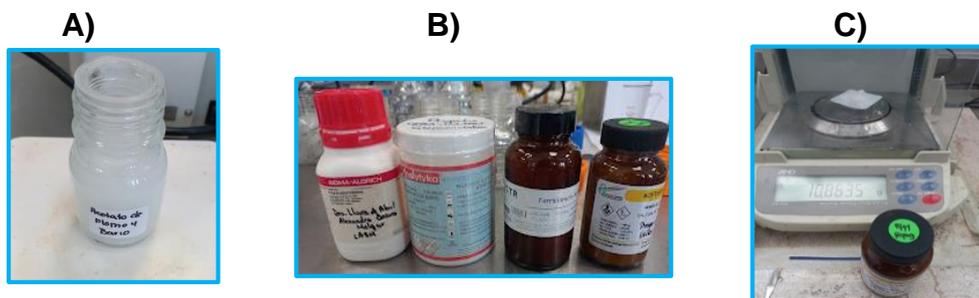


Figura 13. A) etiquetado de recipientes para GUARDAR NUESTRAS soluciones ya preparadas B) reactivos con los que se prepararan soluciones C) pesar los gramos requeridos de cada reactivo, imágenes propias



Figura 14. preparación de soluciones, (imagen propia)

4.5 Purificación

En un tubo de ensaye se colocaron 3 mililitros de liofilizado adicionando 700µL de buffer de acetato 0.2M con pH de 4.2 a temperatura ambiente se agitó por 15 min.

Pasando el tiempo se colocaron 100 µL de acetato de plomo y bario a 0.5M; se realizó una agitación en vortex, una vez agitado se añadieron 50mg de pvpp (polivinil polipirrolidona) y se incubó por 10 min a temperatura ambiente, después de esto se agregaron 100 µL de sulfato de sodio 2M y se centrifugó a 1300 revoluciones por 5 min a temperatura ambiente.

Posterior al tiempo de la centrifugación, se tomaron 0.2 µL de la purificación tratada con pvpp y se mezclaron con 0.2 de hidróxido de sodio 2M incubándolo por 30 min a temperatura ambiente.

pasando el tiempo se añadió 30µL de ácido clorhídrico concentrado para cortar la reacción y se centrifugó a 2000rpm por 10 min. Para llevar a cabo la medición espectrofotométrica se tomaron 100 µL de la purificación tratada y se mezclaron con 100 µL de solución de ferrocianuro 2Mm en buffer de fosfato 0.2 con pH de 7; finalmente se midió la absorbancia de la solución a 420 nm antes de 15 segundos, utilizando como blanco el buffer de fosfato 0.2M con pH de 7.

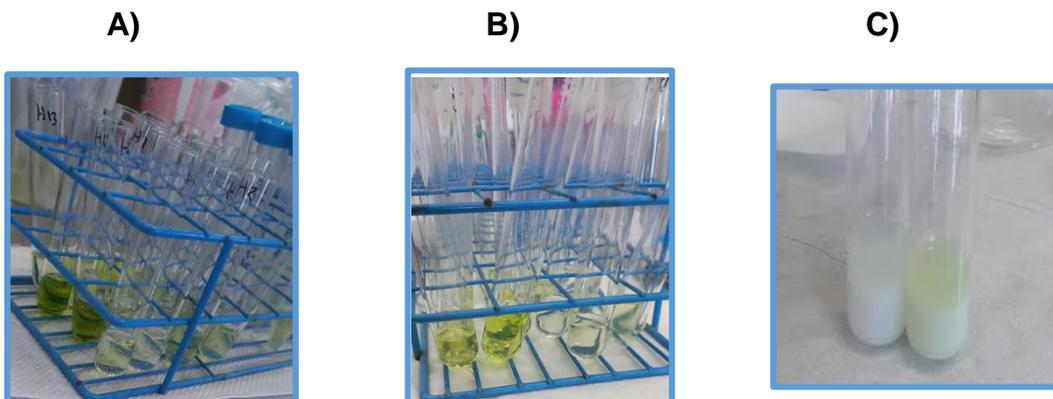


Figura 15.A) colocar tres mililitros de extracto de brócoli, B) añadir cien microlitros de acetato de plomo. C) cortar la reacción con treinta micro litros de ácido clorhídrico concentrado, imagen propia.

4.5.1 Acondicionamiento

Se realizó antes de preconcentrar la muestra, acondicionando al soporte un volumen determinado de un disolvente que sea afín con la fase estacionaria. Para C₁₈, se recomendó agregar n-hexano 3mL para que las cadenas de octadecilo se extiendan y posteriormente se añadieron 5mL de metanol, una excelente interface entre la matriz de la muestra y el adsorbente.

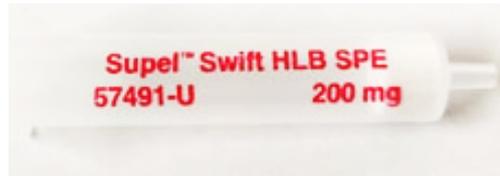


Figura 16. cartucho LC-SAX (Supelco®)

4.5.2 Adsorción

Se pasó la muestra a través del soporte con ayuda de succión mediante una bomba de vacío. Debe tenerse especial cuidado con el volumen de infiltración, el cual se define como el volumen de muestra que pudo pre concentrarse sin perder más del 5% de analitos.

4.5.3 Lavado

Se eliminaron interferencias adsorbidas en la fase solida a través de disoluciones de una condición apropiada. Para C₁₈ se utilizó agua con metanol en un 5 a 20 V/V, aproximadamente.

4.5.4 Elución

Se removieron los glucosinolatos mediante la adición de 3 mL de metanol puro. Esta elución se liofilizó y guardo en congelación a 4°C para posteriormente realizar su cuantificación. metanol

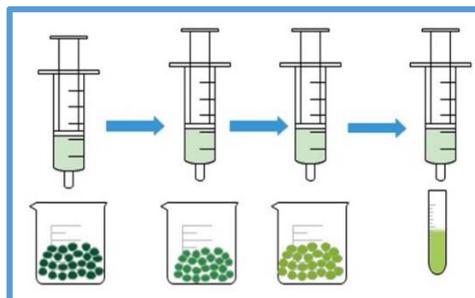


Figura 17. Ilustración del proceso de acondicionamiento ilustración propia

4.6 Cuantificación de glucosinolatos mediante la técnica de espectrofotometría

En la siguiente grafica nos muestra el resultado obtenidos de la prueba espectrofotométrica

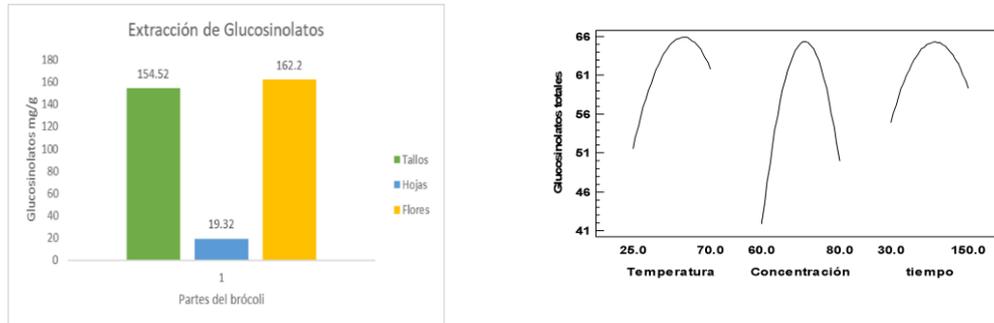


Figura 18. gráfico de barras de la extracción de los glucosinolatos, la mayor cantidad de glucosinolatos se obtuvo de las flores y las variables que mayor impacto tienen sobre la extracción de glucosinolatos

4.7 Inoculación del Hongo a Partir de mango

Se preparó el medio de cultivo PDA donde se pesaron 39 gr de medio de cultivo sólido para previamente hidratar en un litro de agua, esto se realizó con ayuda de una parrilla eléctrica para poder calentarlo.

Una vez que se encontraba listo el medio de cultivo ya bien hidratado, con la ayuda de una autoclave se procedió a esterilizar, junto con las cajas Petric y el resto del material que íbamos a utilizar, una vez dentro de nuestra autoclave se procedió a llevar a cabo la esterilización.

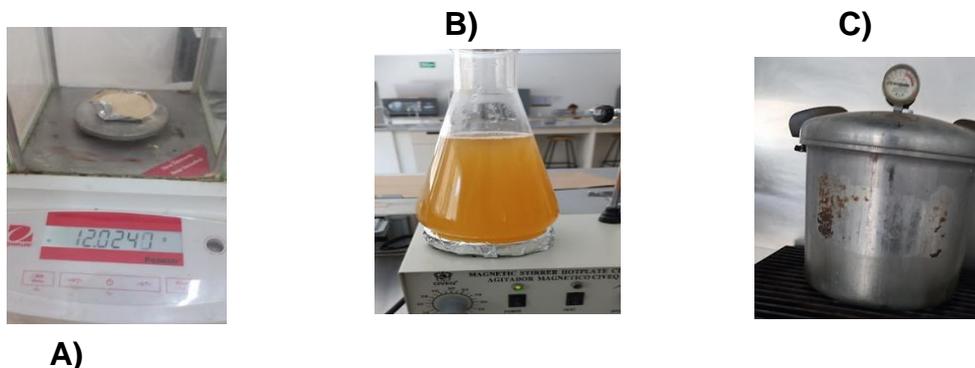


Figura 19.A) pesar la cantidad indicada para preparar el medio de cultivo, B) hidratar el medio de cultivo en un litro de agua, C) esterilizar el medio de cultivo en una autoclave, imagen propias

El tejido vegetal del mango dañado se cortó en trozos muy finos, se colocaron en un vaso de precipitados para después realizar un triple lavado con hidróxido de sodio 1:10 previamente esterilizado; junto con agua destilada estéril, una vez listos colocamos las muestras en una sanita estéril en la parte interior para retirarles el exceso de agua oprimiéndolos con la palma de nuestra mano, una vez secos los pasamos a una nueva sanita estéril para dejarlos reposar durante 24 horas.

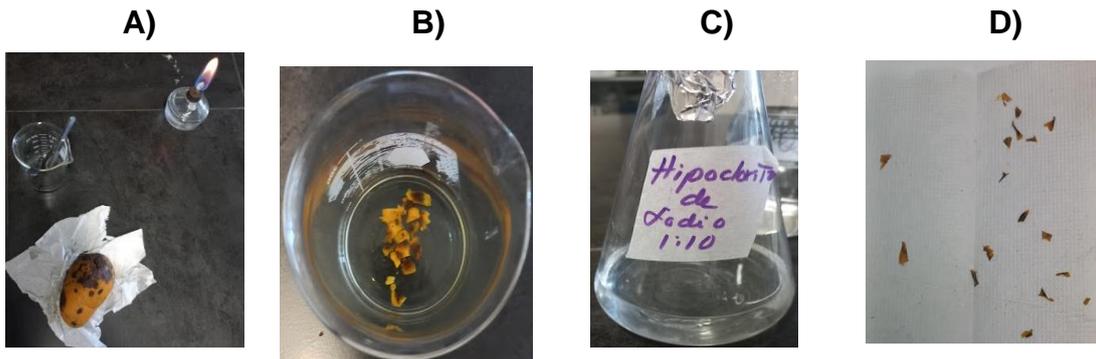


Figura 20. a) muestra de mango contaminada de antracnosis, b) tejido vegetal finamente extraído para sembrar, c) solución de hipoclorito de sodio para hacer un triple lavado al tejido, d) poner a secar el tejido en una sanita estéril, imágenes propias.

Una vez secos procedimos a sembrar donde colocamos 2 trozos de muestra en cada extremo de una caja Petri con medio de cultivo, posterior a esto procedemos a sellar la caja Petri, una vez sembradas las cajas se colocaron en la incubadora y se dejaron 24 horas a una temperatura de 25°C con una humedad relativa del 20% para que bajo estas condiciones inicie la proliferación del hongo, pasado las primeras 24 horas procedimos a voltear las cajas con cuidado para que la humedad que se les genere en la parte inferior de las cajas Petri no afecte al crecimiento del hongo, donde puede llegar a desarrollarse alguna bacteria, se continua con estas condiciones hasta observar el crecimiento de los acérvulos para poder realizar la primera purificación.

Una vez que se alcanzó el crecimiento deseado de los acérvulos (2 semanas después de la inoculación), se realizó la primera purificación donde se utilizó un sacabocados para poder cortar las muestras y con una aguja de disección retiramos nuestra nueva muestra para colocarlo en una caja Petri

nueva, donde la muestra con crecimiento tiene que colocarse en el medio de cultivo para su nuevo desarrollo.

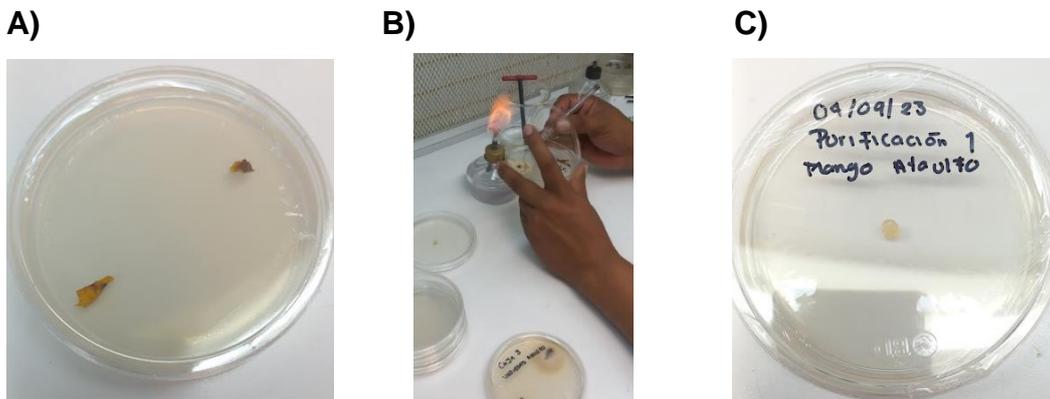


Figura 21. Siembra de tejido vegetal en medio de cultivo para purificación, b) primera purificación de la cepa del hongo *colletotrichum*, c) segunda siembra de la primera purificación del hongo.

Se dejó desarrollar las cepas para poder realizar la última purificación estas crecen de manera más rápida y así posteriormente poder llegar a realizar la identificación de que hongo estamos trabajando.



Figura 22. crecimiento de la sepa de la primera purificación del hongo, imagen propia.

4.8 Identificación del hongo

La identificación del hongo se realizó de manera visual y con apoyo de un microscopio compuesto esto se hizo esterilizando la zona de trabajo donde usamos mecheros de alcohol, agujas de disección para poder romper los acérvulos desarrollados del hongo en estudio.

Las agujas de disección se procedieron a quemar esto se realizó con el fin para poder evitar contaminaciones, una vez teniendo la muestra la

colocamos en un porta objetos donde se le añadió una gota de azul algodón y posteriormente se cubrió con un cubre objetos.

Después de eso se llevó al microscopio y se empezó a analizar con un lente de 10D, para comenzar a identificar las estructuras del hongo y después pasamos al lente de 40 D y ahí se observó la estructura completa del hongo. Y pudimos determinar que se trataba de *Colletotrichum gloesporoides* con la ayuda de las claves de (Barnett y Hunter, 1998).

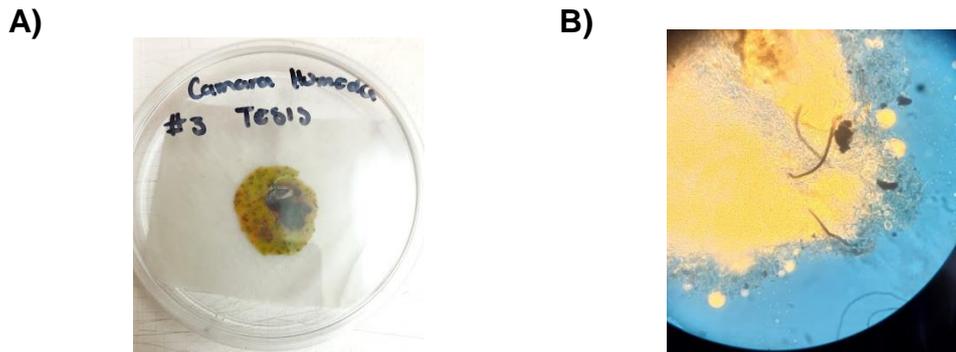


Figura 23. A) acondicionamiento de cámara húmeda para tomar la muestra de un conidio, B) muestra al microscopio para observar la cepa del hongo.

4.9 Antibiograma de glucosinolatos

Para observar la eficacia de inhibición de los glucosinolatos esto se llevó a cabo, donde con ayuda de un antibiograma fue sumergido en el extracto de brócoli obtenido, previamente estéril para evitar contaminaciones

Se colocó dentro de una caja petric donde se encontraba sembrada con medio de cultivo PDA posteriormente se colocó el antibiograma ya con extracto y de lado le colocamos un sepa de hongo *Colletotrichum gloesporoides* ya purificado, esto es para prevenir contaminaciones y apariciones de bacterias externas al hongo.

Una vez sembradas nuestras cajas y sellado se llevaron a guardar en una cámara de humedad donde se monitorearon cada 24 horas para observar el crecimiento de la cepa donde tenían una humedad relativa del 20% y así mismo observar el funcionamiento del extracto.

A)



B)

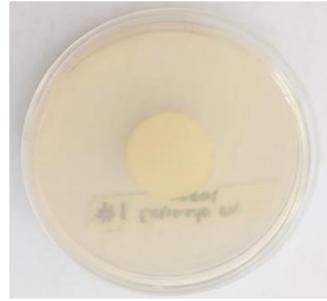


Figura 24. Antibiograma como agente preventivo para evitar crecimiento del hongo imágenes propias.

5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Obtención de glucosinolatos

Los glucosinolatos se extrajeron de un diseño de experimento de 3^3 donde esto se hizo con ayuda de metanol. Para eso como primer paso se hizo una deshidratación de materia prima, con esto se realizó una molienda de materia prima la cual fueron 20gr de floretes. Para después llevarlo a calentar en baño maría a una temperatura de 70°C con un tiempo de duración de 150 minutos, con una concentración de 70:30.

Posteriormente de tener el extracto listo se procedió a centrifugar para poder guardarlo en un recipiente protegiéndolo contra la luz y así evitar el deterioro de glucosinolatos.

A)



B)

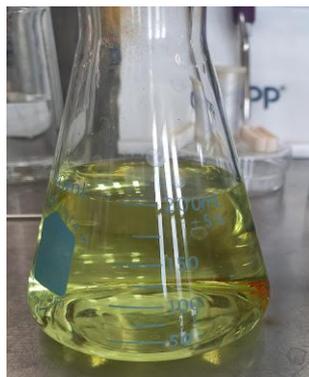
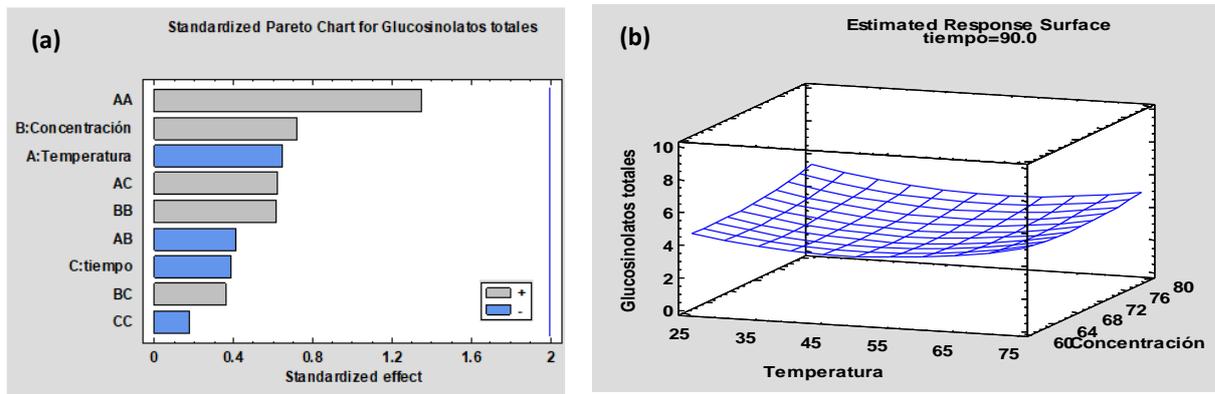


Figura 25. A) calentar 20 gr de muestra con etanol a una temperatura de 70°C con un tiempo de 150 min, B) recolección de extracto ya centrifugado y purificado imágenes propias

5.2 Cuantificación de glucosinolatos

La cuantificación se realizó por el método de espectrofotometría se evaluaron las extracciones de glucosinolatos extraídos de flores, tallos y hojas evaluando el efecto de la temperatura, concentración de metanol y el tiempo de extracción. La figura 26 nos muestra los resultados obtenidos del diseño de experimentos realizado de los tallos de brócoli en el cuál las variables que mayor impacto tienen son la temperatura y la concentración, de acuerdo con la curva de nivel el tiempo que mejor resultados muestra es el de 90 minutos.



Main Effects Plot for Glucosinolatos totales

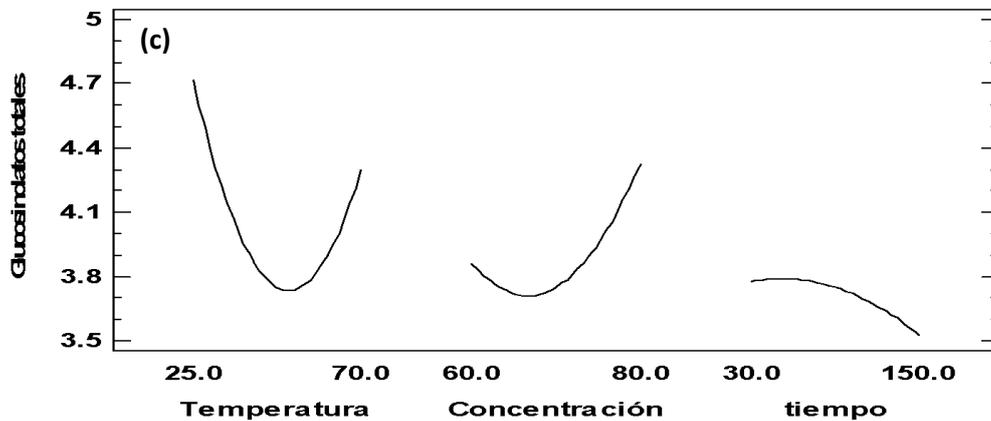


Figura 26. efecto de las variables sobre la concentración final de glucosinolatos, (b) resumen del efecto de las variables sobre la extracción de los glucosinolatos, (c) curva de nivel del efecto de las variables sobre la extracción de glucosinolatos, todo esto s

La figura 27 se muestran los resultados obtenidos de la extracción de glucosinolatos de las hojas de brócoli y de acuerdo con el diseño de experimentos ninguna de las variables tiene un efecto significativo sobre la extracción.

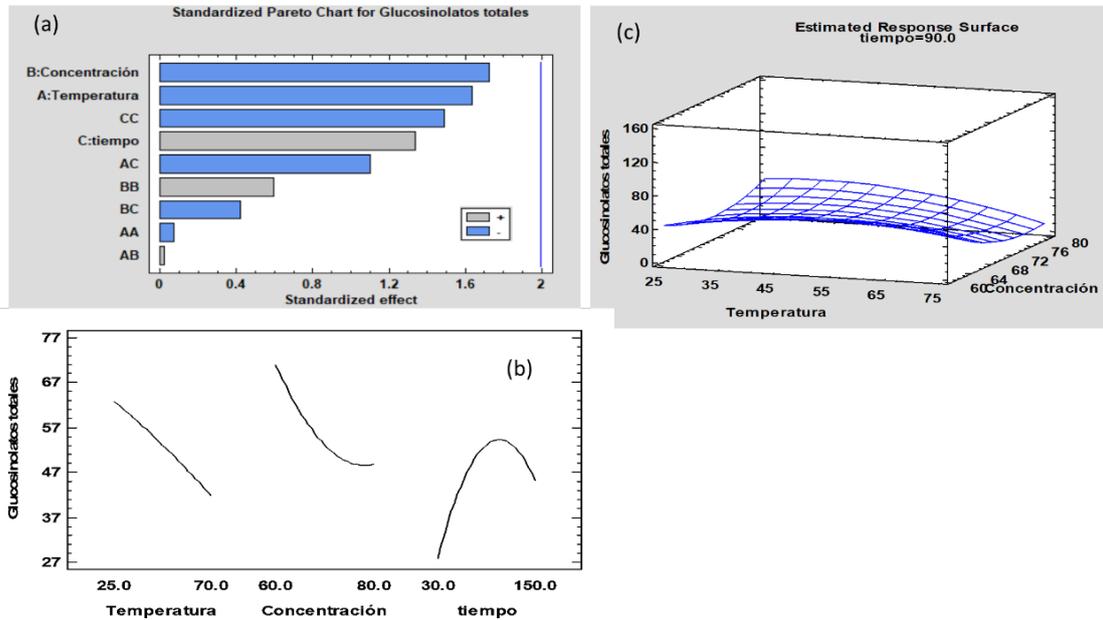


Figura 27. (a) Efecto de las variables sobre la concentración final de glucosinolatos obtenidos en las hojas, (b) resumen del efecto de las variables, (c) curva de nivel del efecto de las variables

La figura 28 muestra los resultados obtenidos de la extracción de los glucosinolatos obtenidos a partir de las flores de brócoli, se muestran los resultados obtenidos del diseño de experimentos donde observamos que la concentración es la variable que mayor impacto tiene sobre la extracción de glucosinolatos.

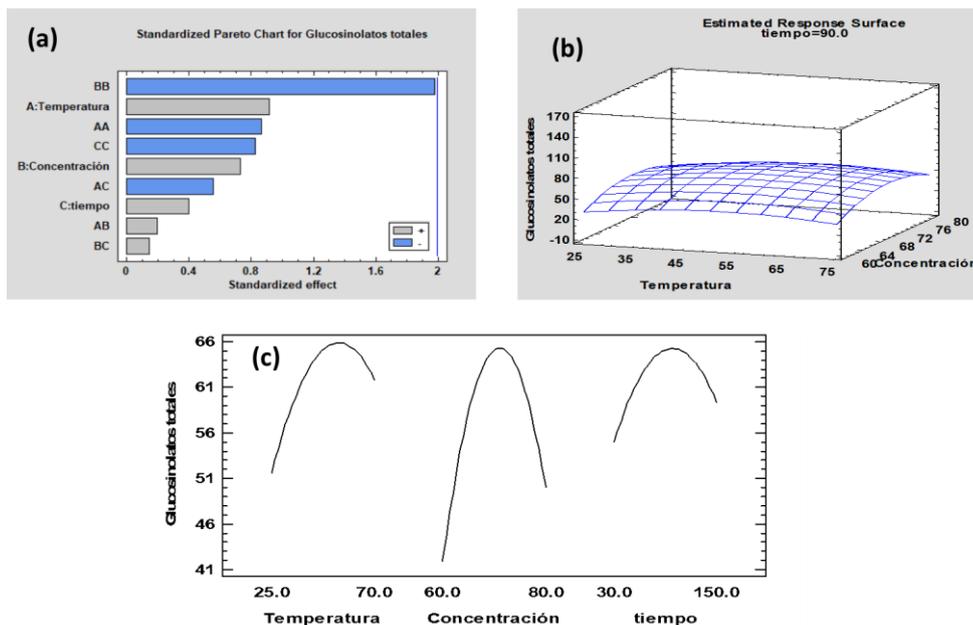


Figura 28. (a) efecto de las variables sobre la concentración final de glucosinolatos obtenidos en los floretes, (b) resumen del efecto de las variables, (c) curva de nivel del efecto de las variables

De acuerdo con los resultados obtenidos que se muestran en la figura 29 son las flores y la concentración de metanol las variables que influyen en el contenido de glucosinolatos, los valores que mejor resultados indicaron son, la extracción en flores, a una temperatura de 70°C, concentración de metanol de 70:30 metanol: agua (v/v) y un tiempo de 150 min.

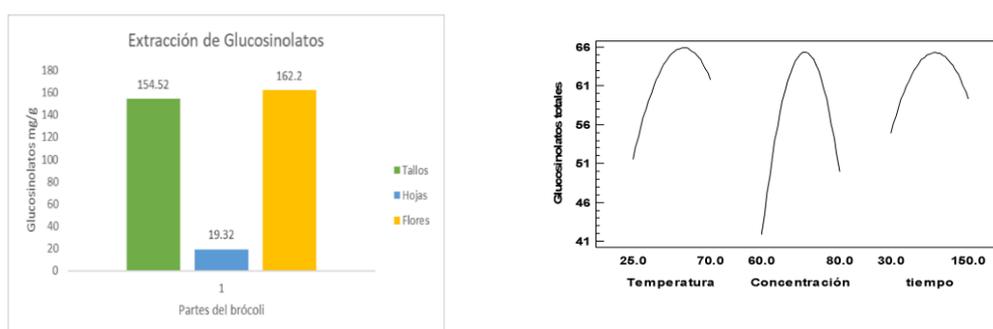


Figura 29. gráfico de barras de la extracción de los glucosinolatos, la mayor cantidad de glucosinolatos se obtuvo de las flores y las variables que mayor impacto tienen sobre la extracción de glucosinolatos

5.3 Identificación del hongo

Se pudo identificar a *Colletotrichum* de acuerdo a la observación de los acérvulos subepidérmicos y cerosos en forma de cojín, típicamente con setas oscuras en el borde o entre los conidióforos; conidióforos simples alargados; conidios hialinos, de 1 célula, ovoides a oblongos a falcados, los cuales correspondieron a los reportados por Barnett y Hunter, (1998).



Figura 30. (A) sección de acérvulo de un portaobjetos: conidióforos, conidios y setas del cultivo

Al respecto Shear & Wood (1907); Ocfemia & Agati (1925), reportaron que el nombre de *Colletotrichum gloesporoides* fue nombrado por primera vez en Italia en el año de Penzig (1882), un espécimen de este tipo fue recolectado de *Citrus* en Italia, en la literatura antigua se utilizaba para asociar a hongos con diversas enfermedades de los cítricos, y algunas otras especies morfológicamente similares con algunos otros huéspedes. Por el contrario, los primeros artículos que se escribieron fueron cuestionados por que existía una gran similitud en la morfología.

Por otra parte, Sutton, (1992); Cannon *et al.* (2000), reportaron que es un patógeno perteneciente al orden de los melanconiales, el cual llega a infectar desde monocotiledóneas hasta dicotiledóneas, el hongo de *C. gloesporoides* es un fitopatógeno muy común y ampliamente distribuido por todo el mundo. Este suele ser un hongo muy abundante en las regiones que suelen ser tropicales y subtropicales (CAB internacional 2005).

5.4 Antibiograma

Como resultado obtenido tenemos que el extracto de brócoli obtenido de las inflorescencias funciona en un 76%, esto se determinó por medio de la siguiente ecuación

$$\text{Efecto inhibición \%} = \frac{\text{medida diametro halo de inhibicion}}{\text{medida halo de inhibicion integral positivo}} \times 100$$

$$\text{Efecto inhibición \%} = 76\%$$

6 CONCLUSIONES

La extracción de glucosinolatos a partir de brócoli para prevenir la antracnosis en mango es una estrategia interesante que aprovecha las propiedades inactivas de estos compuestos. Los glucosinolatos, presentes en las crucíferas como el brócoli, se han estudiado por sus efectos antimicrobianos y propiedades que podrían ayudar a combatir patógenos, como los que causan la antracnosis en el mango, producida por *Colletotrichum*. Tienen propiedades antifúngicas, lo que podría ser útil en el control biológico de enfermedades postcosecha como la antracnosis. Al extraer estos compuestos de fuentes como el brócoli, se podría crear un tratamiento natural que no solo proteja el mango de la infección, sino que también sea más amigable con el medio ambiente en comparación con el uso de pesticidas químicos. La efectividad de esta estrategia depende de factores como la concentración de glucosinolatos en el brócoli, la forma de extracción y la aplicación en las condiciones específicas del mango.

Se logró la obtención de glucosinolatos extraídos de las flores de brócoli, tras la purificación se obtuvieron 168 mg/g de muestra y que nuestro extracto funcionara en un 76%.

7 REFERENCIAS

- Aubert, B. y P. Lossois. 1972. Considerations sur la phenologie des espèces fruitieres arbustive. *Fruits*, 27 (4): 269-286
- Arauz, L.F. 2000. Mango anthracnose: Economic impact and current options for integrated management. *Plant Disease* 84:600-611.
- Ares, A. M., Bernal, J., Nozal, M. J., Turner, C., y Plaza, M. (2015). Fast determination of intact glucosinolates in broccoli leaf by pressurized liquid extraction and ultra-high-performance liquid chromatography coupled to quadropole time-of-flight mass spectrometry. *Food Research International*, 76, 498–505. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.06.037>
- Avato P, D'Addabbo T, Leonetti P, Argentieri MP. (2013). Nematicidal potential of Brassicaceae. *Phytochemistry Reviews*, 12(4), 791-802. [://doi.org/10.1007/s11101-013-9303-7](https://doi.org/10.1007/s11101-013-9303-7)
- Baker, K.F., and Cook, R.J. 1974. *Biological Control of Plant Pathogens*. W. H. Freeman Co., San Francisco, California, USA. 433 p.
- Becerra-Leor, E.N. 1995. Enfermedades de cultivo de mango.pp. 83-101. En: I. Mata Beltrán y R. Mosqueda Vázquez (eds.). *La Producción de Mango en México*. Noriega Editores. México, D.F. 159 p.
- Brewer, M. S., Begum, S., y Bozeman, A. V. A. (1994). Characteristics of frozen broccoli, 18(1995), 479–493.
- CAB International, 2005. *Crop protection Compendium, 2005 Edition*. Wallingford, U.K: CAB International. cabicompendium.org/cpc.
- Castro, C. I. E. (2011). Universidad de cuenca. Universidad de Cuenca, (Síndrome Irlen), 167. Recuperado de <file:///C:/Users/CTRIST~1/AppData/Local/Temp/TECN07.pdf>
- Cronquist, A.L. 1981. *An integrated system of classification of flowering plants*. Columbia University Press. New York. ISBN 0-231-03880-1
- Conway W.S., Sams, C.E., Abbott, J.A., and Bruton, B.D. 1991. Postharvest calcium treatment of apple fruit to provide broad-spectrum protection gagaainst postharvest pathogens. *Plant Disease* 75:620-622.
- Dar, M. S., Oak, P., Chidley, H., Deshpande, A., Giri, A., y Gupta, V. (2016). Nutrient and flavor content of mango (*Mangifera indica* L.) cultivars: an appurtenance to the list of staple foods *Nutritional Composition of Fruit Cultivars* (pp. 445-467): Elsevier.
- Del Pino, M. (2014). *Guía de cultivo y manejo del Brócoli*. Curso de Horticultura y Floricultura. FCAyF. Material editado por el Centro de Estudiantes de la Facultad de Cs. Agrarias y Forestales.

- Dodd, J.C., R. Bugante, I. Koomen, P. Jeffries y M.J. Jeger. 1991b. Pre- and post-harvest control of mango anthracnose in the Philippines. *Plant Pathology* 40:576-583.
- FAO, FAOSTAT. 2006. Comercio. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación <http://faostat.fao.org/site/345/default.aspx>; 21 de enero de 2008
- Franzke, A., Lysak, M. A., Al-Shehbaz, I. A., Koch, M. A., Mummenhoff, K. (2011). Cabbage family affairs: the evolutionary history of Brassicaceae. *Trends in plant science*, 16(2), 108- 116.
- Galán Sàuco, V. 1997. Mango World Production (outside Israel, Egypt and India). *Acta Horticulturae*, 455: 1-6.
- García, A.M. 1976. Enfermedades de las plantas en la república mexicana. Editorial Limusa, México, D.F. 75 p.
- González G. 2005. Aplicación de Ultrasonidos para la estabilización de sistemas alimentarios. En: II Congreso de Desarrollo Agroindustrial. Instituto Universitario de la Paz UNIPAZ. Barrancabermeja. 1-5.
- Gu ZX, Guo QH, Gu YJ. (2012). Factors influencing glucoraphanin and sulforaphane formation in brassica plants: a review. *Journal of Integrative Agriculture*, 11(11), 1804-1816. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(12\)60185-3](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(12)60185-3)
- Gutiérrez-Alonso, J. G., Gutiérrez-Alonso, O., Nieto Ángel, D., Téliz-Ortiz, D., Zavaleta-Mejía, E., y Delgadillo-Sánchez, F. 2004. Manejo Integrado de la Antracnosis [*Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc.] del Mango (*Mangifera indica* L.) durante la Postcosecha. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 22(3): 395–402.
- Hernández, A. N., Bautista, S., Velázquez, M. G., y Hernández, A. 2007. Uso de microorganismos antagonistas en el control de enfermedades postcosecha en frutos. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 25(1): 66–74. http://www.scielo.org.mx/pdf/rmfi/v25n1/v25n_1a9.pdf
- Inis Winde, Ute Wittstock, 2011. Insect herbivore counter adaptations to the plantglucosinolate–myrosinase system, *vPhytochemistry*, Volume 72, Issue 13, September, Pages 1566-1575.
- Jaramillo J, Díaz CA. (2006). El cultivo de las crucíferas. Brócoli, coliflor, repollo y col china. (Eds.), Corpoica. Rionegro, Antioquia, Colombia.
- Kader, A. A. (2002). Postharvest technology of horticultural crops (Vol. 3311). University of California Agriculture and Natural Resources.
- Loaiza, J. E. and Rivera, G. 2000. Potencial biocida de extractos de *Gliricida psepium* contra patógenos del cultivo de la papaya. *Agron. Costarric.* 1:29-36.

- Martínez-Romero D., M. Serrano, G. Bailén, F. Guillén, P. J. Zapata, J. M. Valverde, S. Castillo, M. Fuentes and D. Valero (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.
- Mejía, L. C., Rojas, E. I., Maynard, Z., Van Bael, S., Arnold, A. E., Hebbar, P., Samuels, G., Robbins, N., Herre, E. A. 2008. Endophytic fungi as biocontrol agents of *Theobroma cacao* pathogens. *Biological Control*. 46(1): 4–14. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2008.01.012>
- Mendoza, C. B., M. N. Moreno, M. Weil, F. Elango. 2007. Evaluación del efecto de extractos vegetales sobre el crecimiento in vitro de *Phytophthora palmivora* Butl. y *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. *Tierra Tropical*. 3(1): 81-89.
- Moss M. O. (2002) Mycotoxin review 1. *Aspergillus* and *Penicillium*. *Mycologist* 16:116-119.
- Nugrahedhi PY, Verkerk R, Widianarko B, Dekker M. (2015). A mechanistic perspective on process-induced changes in glucosinolate content in Brassica vegetables: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*,55(6),823e838.<https://doi.org/10.1080/10408398.2012.688076>
- Olga N. Campas-Baypoli, Carolina Bueno-Solano, Diana M. Martínez-Ibarra, Francisco Camacho-Gil, Alma G. Villa- Lerma, Jesús R. Rodríguez-Núñez, Jaime López-Cervantes, Dalia I. Sánchez- Machado. 2009. Contenido de sulforafano (1-isotiocianato-4-(metilsulfinil)-butano) en vegetales crucíferos. *Archivos Latinoamericanos de Nutrition*. Vol 59, 95– 100.
- Ong, M. K., y Ali, A. 2015. Antifungal action of ozone against *Colletotrichum gloeosporioides* and control of papaya anthracnose. *Postharvest Biology and Technology*. 100: 113–119. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2014.09.023>
- Orozco, S. M., V. M. Medina U., J. J. Velázquez M., J. Orozco R., E. Tapia R. J. A. Toledo M. 2007. Control químico de antracnosis (*Colletotrichum acutatum*) con aspersiones del fungicida Trifloxistrobin en limón mexicano. p. 125 In: Memoria de resúmenes 53ava reunión anual de la ISTH. Morelia, Michoacán, México.
- Panglossi, HV (2006) New developments in antioxidants research, nova publishers.
- Patyra E, Kowalczyk E, Kwiatek K. (2016). Anti-nutritional and health promoting properties of glucosinolates. *Życie Weterynaryjne*, 91(7), 516-520.

Planeación Agrícola Nacional 2017-2030 Este ejemplar forma parte del conjunto de 29 cuadernillos que complementan la investigación de la Planeación Agrícola Nacional 2017-2030

Ploetz, R.C., Zentmyer, G.A., Nishijima, W.T., Rohrbach, K.G., and Ohr, H.D. 1994. Compendium of Tropical Fruit Diseases. Mango. APS Press. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, USA. 88.p.

Primera edición, 2017 © D.R. 2017 por Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (sagarpa)

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

Rafael, E. M. 2018. Efectividad in vitro de *Trichoderma* spp., fitoextractos y fungicidas contra *Colletotrichum gloeosporioides*, patógeno del naranjo. Tesis de licenciatura. Colegio Superior Agropecuario del Estado de Guerrero. Cocula, Gro

Sutton, B.C. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. In *Colletotrichum: biology, pathology and control* (eds. J.A. Bailey and M.J. Jeger). CAB International: Wallingford., 1992;1-26.

Schonhof I, Krumbein A, Brückner, B. (2004). Genotypic effects on glucosinolates and sensory properties of broccoli and cauliflower. *Nahrung - Food*, 48(1), 25–33. <https://doi.org/10.1002/food.20030032>.

Shahidi F. Daun JK. De Clercq. 1997. Glucosinolates in Brassica oilseeds: Processing effects and extraction. *Antinutrients Phytochemicals in Food* 622:152- 170.

Shear CL, Wood AK (1907). Ascogenous forms of *Gloeosporium* and *Colletotrichum*. *Botanical Gazette* 43: 259–266.

Stauffer, B. A., A. Orrego F. y A. Aquino J. 2000. Selección de extractos vegetales con efecto fungicida/obactericida. *Revista de ciencia y tecnología*. 1(2): 29-33

Travis. (1999). Mashua. International Plant Genetic Resources Institute, pp. 1–65. Recuperado de https://www.biodiversityinternational.org/fileadmin/migrated/uploads/tx_news/Mashua_Tropaeolum_tuberosum_Ruiz_amp_Pav.880.pdf

USDA National Nutrient Database for Standard Reference. Beltsville, U.S.A.: USDA Nutrient Data Laboratory, and the Food and Nutrition Information Center and Information Systems Division of the National Agricultural Library. 2011 <http://ndb.nal.usda.gov/>. Consultado el 12 de Mayo del 2014

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

<http://www.publitech.com.ar/contenido/objetos/MANGO.pdf>

Wang, C.Y. (1977). Effect of aminoethoxy analog of rhizobitoxine and sodium benzoate on senescence of broccoli. *HortScience*, 12, 54–56.

Wittstock U. and B. A. Halkier (2002) Glucosinolate research in the Arabidopsis era. *Trends in Plant Science* 6:263-270.g

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

Zhang Y., Talalay P., 1992. Anticarcinogenic activities of organic isothiocyanates: chemistry and mechanisms, *Cancer Res.* 54 1976S–1981S.