

INFLUENCIA DE SEÑALIZADORES DEL ESTRÉS EN HORTALIZAS Y SU RELACIÓN CON ANTIOXIDANTES

JOSÉ HUGO RANCAÑO ARRIOJA

T E S I S

*Presentada como requisito parcial para
Obtener el grado de:*

**MAESTRO EN CIENCIAS
EN HORTICULTURA**



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
“ANTONIO NARRO”
PROGRAMA DE GRADUADOS**

*Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.
Marzo de 2005*

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO

SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO

**INFLUENCIA DE SEÑALIZADORES DEL ESTRÉS EN
HORTALIZAS Y SU RELACIÓN CON ANTIOXIDANTES**

TESIS POR

JOSÉ HUGO RANCAÑO ARRIOJA

Elaborada bajo la supervisión del comité particular de asesoría y
aprobada como requisito parcial, para optar al grado de

**MAESTRO EN CIENCIAS
EN HORTICULTURA**

COMITÉ PARTICULAR

Asesor Principal

Dr. Homero Ramírez Rodríguez

Asesor

Dr. Adalberto Benavides Mendoza

Asesor

Dra. Rosalinda Mendoza Villarreal

Asesor

M.C. Emilio Padrón Corral

Dr. Jerónimo Landeros Flores
Subdirector de Postgrado

Buenavista, Saltillo, Coahuila, Marzo de 2005

AGRADECIMIENTOS

A la **Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro**, Por su planta docente y su cuerpo de investigadores, por sus instalaciones y servicios. Gracias por el apoyo económico durante mi estancia en el Colegio de Graduados.

Al **Dr. Homero Ramírez Rodríguez**, por el valioso tiempo que dedicó a la supervisión durante todo el desarrollo de este trabajo de investigación, en el invernadero, en el laboratorio y en la escritura del mismo. Por señalarme errores y aciertos en mi actividad académica y de investigación, por las sugerencias y recomendaciones. Por su apoyo y corrección en momentos difíciles.

A la Dra. **Rosalinda Mendoza Villarreal**, por su asesoría en la determinación de antioxidantes en extractos de hortalizas, lo cual no tiene precedentes en esta universidad. Y por la revisión y sugerencias en la escritura del documento.

Al **Dr. Adalberto Benavides Mendoza**, por sus sugerencias en el invernadero y para el laboratorio. Por permitirme asomarme a este fascinante campo de la ciencia que es el estrés oxidativo, la señalización del estrés y los sistemas antioxidantes, así como la amplia gama de aplicaciones de estos conceptos en áreas como la medicina, la ciencia de los alimentos y la agricultura.

Al **M. C. Emilio Padrón Corral** por su valiosa asesoría en el diseño experimental y en el análisis estadístico en la realización de este estudio.

A la **M. C. Saret Alonso Corona**, por su gran apoyo, en la realización de este escrito y por su valiosa amistad como compañera de generación.

Al **Ing. José de la Cruz Bretón**, por su apoyo en la siembra y manejo de los cultivos en el invernadero.

A **Adrián Delgadillo Mendoza**, estudiante de licenciatura por su colaboración en el manejo de los cultivos y su apoyo en el análisis de laboratorio.

DEDICATORIA

Al que es, **Yahvé**, mi Dios, por darme la vida, a **Jesucristo** por permitirme conocer al Padre y al Espíritu Santo por darme la fortaleza y sostenerme cada día.

A mi esposa, **Dolores Castillo Alvarado**, por su amor, paciencia, presencia y apoyo durante estos dos años de estudio y diez años de matrimonio.

A mis hijos **Ulises y Saúl Rancaño Castillo**, por sus sonrisas, por su amor, por motivarme a la superación. Y por el privilegio de vivir la experiencia y la responsabilidad de la paternidad

A mi padre **Reveriano Rancaño Juárez**, por su amor y sus desvelos durante mi infancia.

A mi madre **Lydia Arrijo Valerdi**, por sembrar en mí, durante mi infancia, la semilla de la palabra de Dios, y por inculcarme la convicción de la superación por medio de la educación.

A mis hermanos: **Everardo Aarón, Carolina, Efraín y Neftalí Rancaño Arrijo**, por compartir raíces, sangre, infancia y juventud.

A mis compañeros y amigos: **Juán David, Rocío, Jesús (oax), Álvaro, Antero, Daniel, Guillermo, Jesús Ángeles, Alejandro**, por su participación y apoyo en alguna etapa durante el desarrollo de este trabajo de investigación, ya sea en el invernadero, en el laboratorio o auxiliándome con la computadora.

COMPENDIO

**Influencia de señalizadores del estrés en hortalizas y su
relación con antioxidantes**

POR

JOSÉ HUGO RANCAÑO ARRIOJA

MAESTRIA

HORTICULTURA

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO**

Buenavista, Saltillo, Coahuila. Marzo 2005

Dr. Homero Ramírez Rodríguez. -Asesor-

Palabras clave: Hortalizas, señalizadores, antioxidantes.

Con el propósito de conocer sus efectos en el nivel de antioxidantes y parámetros fenotípicos en hortalizas, se aplicaron señalizadores del estrés en acelga (*Beta vulgaris* L.), cv. Fordhock, coliflor (*Brassica oleracea* var. Botritis), cv. Snow Ball, brócoli (*Brassica oleracea* var. Italica), cv. Di Cico y repollo (*Brassica oleracea* var. Capitata) cv. Copenhagen Market, cultivadas bajo invernadero en la primavera de 2004. Se realizaron aspersiones con soluciones de ácido salicílico (AS) 10^{-6} M, ácido benzoico (AB) 10^{-6} M, quitosán (Q), al 1

por ciento, y un testigo sin aplicación. Se evaluó el efecto de los señalizadores del estrés sobre la altura de planta, longitud de raíz, número de hojas, peso fresco y peso seco de de la misma.

El nivel de antioxidantes se determinó mediante el método de la "CAET" (Capacidad Antioxidante Equivalente a Trolox) también conocido como método del ABTS[®] (catión radical 2,2- Azinobis- (3- etilbenzotiazolin-6-sulfonato). El comportamiento de las hortalizas fue diferente debido a la especie tanto para los parámetros fenotípicos, como para el nivel de antioxidantes. Se encontró interacción entre los señalizadores del estrés y las especies estudiadas. Sin embargo, la influencia de los señalizadores en la mayoría de las variables no mostró una tendencia consistente. La altura de la planta y la longitud de raíz, no fueron afectadas por los señalizadores del estrés en ninguna de las hortalizas. El número de hojas se incrementó solamente en repollo al aplicar AB. El peso fresco total y de la parte aérea fue superior solo en repollo cuando se aplicó AB; El peso seco de la raíz aumento en acelga con la aplicación de AB, en coliflor los señalizadores indujeron una disminución del mismo. El peso seco de las hortalizas aumentó cuando se aplicó AB y disminuyó al aplicar AS y Q. Solamente acelga y repollo mostraron un incremento en la capacidad antioxidante total en respuesta a las aplicaciones de AS y Q, respectivamente. En coliflor no se registró ningún efecto de los tratamientos; mientras que en brócoli se encontró una disminución de la capacidad antioxidante total al aplicar los señalizadores del estrés.

ABSTRACT

STRESS SIGNALLING INFLUENCE IN VEGETABLES AND THEIR ANTIOXIDANTS RELATHIONSHIPS

BY

JOSÉ HUGO RANCAÑO ARRIOJA

MAESTRIA

HORTICULTURA

**UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO**

Buenavista, Saltillo, Coahuila. March 2005

Dr. Homero Ramírez Rodríguez. - Adviser -

Key words: Vegetables, signalling substances, antioxidants.

Vegetables growing under greenhouse in spring 2004 were sprayed with chemical stress signalling substances, with the purpose to know their effects on the antioxidants levels and phenotypical parameters. Swiss chard (*Beta vulgaris* L.), cv. L.), cv. Fordhock, cauliflower (*Brassica oleracea* var. Botritis), cv. Snow ball, broccoli (*Brassica oleracea* var. Italica), cv. Di Cico and cabbage (*Brassica oleracea* var. Capitata) cv. Copenhagen market, were sprayed during the spring

of 2004 with salicylic acid (SA) 10^{-6} M, benzoic acid (BA) 10^{-6} M and chitosan (CH) 1 percent. Control plants were unsprayed. The plant height, leaf number, root length, fresh weight and dry weight were evaluated. The antioxidant level was determined by the "TEAC" (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) assay, also called ABTS (radical cation 2, 2'-Azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonate) assay. Each stress signalling substance showed a different effect in each crop in both, antioxidant level and phenotypical parameters. It was found interaction between compounds and horticultural species. However, the effect of chemicals in most variables evaluated did not show a consistent trend: the plant height and root length were not affected in any of vegetables studied. Leaf number was increased only in cabbage when BA was sprayed. Root fresh weight was increased in Swiss chard with the BA application. In cauliflower this parameter was decreased: whereas in broccoli and cabbage no significant difference was found. Total fresh weight and aerial fresh weight were higher only in cabbage when was sprayed BA. Dry weight was increased with the BA; while SA and CH application caused a reduction in dry weight. Swiss chard and cabbage showed an increase in total antioxidant capacity in response to the SA and Q spraying. None treatment effect was found in cauliflower. Broccoli showed a reduction in the total antioxidant capacity in any chemical treatment.

INDICE DE CONTENIDO

	PÁGINA
INTRODUCCIÓN	1
Objetivos.....	4
Hipótesis.....	4
REVISION DE LITERATURA	5
Estrés oxidativo.....	5
Radicales libres	6
Sistema antioxidante.....	7
Antioxidantes Primarios.....	7
Antioxidantes Secundarios.....	7
Antioxidantes Terciarios.....	7
Los antioxidantes de la dieta	7
Carotenoides.....	7
Flavonoides.....	8
Compuestos fenólicos.....	8
Sulforafano.....	8
Indoles.....	9
Capacidad antioxidante de frutas y hortalizas.....	9
Señalizadores del estrés.....	10
Ácido salicílico.....	10
Ácido benzoico.....	10
Quitosán.....	11
Métodos para medir antioxidantes.....	12
Método de la capacidad antioxidante equivalente a Trolox....	13
ARTICULO	15
CONCLUSIONES	39
LITERATURA CITADA	40

INTRODUCCIÓN

Cada año aumenta el número de personas que sufren enfermedades crónicas en los países en desarrollo. El creciente desarrollo urbano ha provocado la migración de los habitantes de zonas rurales hacia las ciudades. Los habitantes de las ciudades son más propensos a seguir dietas muy energéticas, ricas en grasas saturadas y carbohidratos refinados. El cambio en la dieta, combinado con un modo de vida sedentario, provoca graves consecuencias para la población urbana principalmente. Las enfermedades crónicas, como el cáncer, arteriosclerosis, diabetes, enfermedades respiratorias, daño al hígado, artritis reumatoide, cataratas, enfermedades inflamatorias del intestino, desórdenes del sistema nervioso central, mal de Parkinson, SIDA, etc., están relacionadas con el ataque de radicales libres (Rodríguez *et al.*, 2001; Devasagayam *et al.*, 2004) los cuales son moléculas altamente reactivas generadas por las reacciones bioquímicas de oxidoreducción que ocurren como parte del metabolismo celular normal, y por la exposición a contaminantes del medio ambiente, que afectan las macromoléculas en el organismo. En el año 2001 estas enfermedades representaron aproximadamente el 59% de los 56,5 millones de defunciones registradas en todo el mundo (FAO, 2003). Muchos de los metabolitos secundarios sintetizados en las plantas, son una fuente de compuestos con

capacidad antioxidante para combatir o para prevenir el daño causado por los radicales libres. La mayoría de estos compuestos están relacionados con pigmentos y vitaminas tales como, carotenoides, polifenoles, tocoferoles y vitamina C entre otros.

Durante los últimos veinte años, los consumidores y los productores agrícolas han comenzado a reconocer que los productos hortofrutícolas no solamente participan en la nutrición básica, sino que, también aportan beneficios para la salud. De esta manera se han incorporado al vocabulario cotidiano palabras tales como fitoquímicos, alimentos funcionales, nutraceuticos, antioxidantes, etc. A partir de 1995 ha surgido un mercado de este tipo de productos el cual es grande, es global, esta en expansión y se ha dirigido hacia un consumidor creciente que entiende que la dieta está ligada a enfermedades degenerativas y relacionadas con el envejecimiento, al aumento del costo de los cuidados de la salud, y a los avances en la tecnología de alimentos y nutrición (Oomah y Mazza, 2000).

Prior y Cao (2000), presentan los resultados de varias evaluaciones que realizaron junto con otros autores, en estudios anteriores. Midieron la capacidad antioxidante en frutas y hortalizas con el método automatizado ORAC (Oxygen radical absorbance capacity) y encontraron que ciruelos, pasas, arandanos azules, arandanos agrios y zarzamoras tuvieron una capacidad antioxidante alta, mayor a $20 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ de equivalente Trolox (ET). Las fresas, frambuesas rojas, ajo, col rizada, y espinaca tuvieron una capacidad antioxidante media, entre 10 y $20 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ de ET. Mientras que muchas hortalizas, de amplio consumo tales como cebolla, maíz, coliflor, papa, camote dulce, repollo, hoja de

lechuga, zanahoria, ejote, tomate, calabaza amarilla, melón dulce, apio, y pepino tuvieron una baja capacidad antioxidante menor a $5 \mu\text{mol.g}^{-1}$.

Kalt y Kushad (2000), señalan que el aumento de los niveles de antioxidantes de la dieta de frutas y hortalizas en precosecha, es un área de gran interés y representa una oportunidad para los investigadores agrícolas, por otra parte Benavides *et al.* (2002), mencionan que es posible manipular los mecanismos de defensa de las plantas y los niveles de fitoquímicos antioxidantes específicos por medio de la ingeniería genética, la manipulación ambiental, o la aplicación exógena de evocadores químicos que actúan como señalizadores y promotores de oxidación controlada.

El ácido salicílico, el ácido benzóico y el quitosán son compuestos que han sido reconocidos como sustancias señalizadoras del estrés o elicitores (Inbar *et al.*, 1998). La presencia de estos compuestos activa los sistemas antioxidantes y de defensa celular contra el estrés abiótico y biótico (López-Delgado, 1998; Pastori y Foyer 2002), además de cumplir algunas funciones de regulación del desarrollo (Raskin, 1992).

Considerando la importancia de las hortalizas como alimentos funcionales para mejorar la salud de la población, ayudar en la diversificación de los productores, y contribuir al incremento de las ventas de productos de alto valor en los nichos de mercado en México y en el ámbito mundial, se planteó la realización del presente trabajo, cuyos objetivos son los siguientes:

Objetivo

Comparar los niveles de antioxidantes en acelga, coliflor, brócoli y repollo como respuesta a la aplicación de ácido salicílico, ácido benzóico, y quitosán. Así como su efecto en parámetros fenotípicos de estos cultivos.

Hipótesis

La aplicación de señalizadores del estrés modifica los parámetros fenotípicos y el nivel de antioxidantes en hortalizas.

REVISIÓN DE LITERATURA

Estrés oxidativo

El estrés oxidativo y la protección antioxidante, son de interés en agronomía, la ciencia de los alimentos y la medicina. El estrés oxidativo es un estado celular en el cual se encuentra alterada la homeostasis óxido-reducción intracelular, es decir el balance entre prooxidantes y antioxidantes. Este desbalance se produce a causa de una excesiva producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) y/o por deficiencia en los mecanismos antioxidantes, conduciendo a un daño celular.

Se ha estimado que aproximadamente un 2 por ciento del oxígeno consumido por un organismo normal formará ERO de las cuales varias son radicales libres. Cuando la generación de ERO sobrepasa las barreras de defensa antioxidantes del organismo, se produce un daño por lesión química de las estructuras biológicas y a este proceso se le denomina estrés oxidativo. El daño oxidativo que estas especies pueden producir en las macromoléculas biológicas es de graves consecuencias. Reaccionan con lípidos, proteínas, carbohidratos y ADN en el interior de las células y con componentes de la matriz extracelular, por lo que pueden desencadenar un daño irreversible que si es muy extenso, puede llevar a la muerte celular. Entre las numerosas patologías

asociadas a estrés oxidativo están las dos principales causas de muerte en países desarrollados: la arteriosclerosis y el cáncer; también se ven favorecidas otras condiciones patológicas como cataratas y artritis (Elejalde, 2001).

Radicales libres

En los últimos años se ha registrado gran interés por los radicales libres y la función que cumplen en el organismo. Un radical libre es cualquier especie química, con existencia propia, que contenga electrones desapareados en los orbitales que participan de los enlaces químicos. Así, cuando un orbital contiene un único electrón, se dice que ese electrón está desapareado. Los radicales libres pueden ser formados tanto por la pérdida como por la ganancia de un electrón. En el primer caso se trata de una oxidación y en el segundo, de una reducción. También se forman radicales cuando se rompe la unión covalente entre dos átomos, de modo que los dos electrones que son compartidos por la unión se separan, y queda uno en cada átomo. Sea cual fuere el mecanismo de la formación de un radical, el electrón en más o en menos desestabiliza al átomo, ya que aumenta su contenido energético y lo torna muy reactivo. Como su tendencia espontánea es volver al estado de menor energía, cediendo o recibiendo electrones, reacciona rápidamente con otros átomos o moléculas que se encuentren cerca. Las principales especies de radicales libres que se presentan en el cuerpo humano incluyen: radical superóxido ($\dot{\text{O}}_2^-$), radical hidroxilo ($\text{OH}\dot{\text{}}$), radical óxido nítrico ($\text{NO}\dot{\text{}}$) y radical peróxido ($\text{ROO}\dot{\text{}}$) (Rodríguez *et al*, 2001).

Sistema Antioxidante

Antioxidantes primarios. Conformado por súper oxido dismutasa, catalasa, glutathion peroxidasa, ceruloplasmina, transferrina, ferritina previenen la formación de nuevas especies de radicales libres (De Rosa, 1998).

Antioxidantes secundarios. Incluyen vitamina E, vitamina C, polifenoles, beta-caroteno, ácido úrico, bilirrubina, albúmina, los cuales, remueven los radicales libres recién formados, antes de que puedan iniciar la cadena de reacciones. Esas cadenas de reacciones pueden encabezar el daño a la célula y la formación de radicales libres (Halliwell y Gutteridge, 1990).

Antioxidantes terciarios. Constituido por enzimas reparadoras del ADN, como metionina sulfoxido reductasa, que reparan las estructuras celulares dañadas por el ataque de los radicales libres. (Rodríguez *et al*, 2001).

Los antioxidantes de la dieta

Carotenoides. Son los pigmentos responsables de los colores de muchas frutas y hortalizas rojas, verdes, amarillos y anaranjados. Los carotenoides constituyen una familia grande de fitoquímicos, los cuales pueden incluir alfa-caroteno, beta-caroteno, luteína, licopeno, criptoxantina, cantaxantina, zeaxantina, y otros. Los carotenoides protegen el cuerpo al disminuir el riesgo de enfermedades del corazón, ataque, ceguera, y ciertos tipos de cáncer. También pueden ayudar a retrasar los procesos de envejecimiento, reducen las complicaciones asociadas con diabetes, y mejoran las funciones de los

pulmones (Olson, 1999). Las frutas y las hortalizas de color verde oscuro, amarillo, naranja o rojo contienen carotenoides.

Flavonoides. Los flavonoides son otra familia grande de fitoquímicos protectores encontrados en frutas y hortalizas. Los flavonoides, también llamados bioflavonoides, neutralizan o inactivan radicales libres. Hay muchos tipos diferentes de flavonoides incluyendo resveratrol, antocianinas, quercetina, hesperidina, tangeritina, kaempferol, miricetina y apigenina. Los flavonoides se encuentran en una variedad de alimentos, tales como naranjas, kiwi, toronja, tangerina, bayas, manzanas, uva roja, vino tinto, brócoli, cebolla y té verde (Beecher, 2003).

Compuestos fenólicos. Los compuestos fenólicos pueden reducir el riesgo de enfermedades del corazón y ciertos tipos de cáncer. Los compuestos fenólicos se pueden encontrar en bayas, ciruela pasa, uva roja y jugo de uva roja, kiwi, pasas, manzana y jugo de manzana y tomates. El ácido elágico es un compuesto fenólico que puede reducir el riesgo de ciertos tipos de cáncer y disminuir los niveles de colesterol (Meier *et al.*, 1999). El ácido elágico se encuentra en uvas rojas, kiwi, arandano azul, frambuesa, fresas, zarzamoras y pasas.

Sulforafano. El sulforafano pertenece a una clase de fitoquímicos llamados isotiocianatos. El sulforafano puede reducir el riesgo de cáncer de colon. Las crucíferas, hortalizas tales como germinados de brócoli, brócoli, coliflor, kale,

germinados de col de Bruselas, repollo, col china, nabos y nabos verdes contienen sulforafano.

Indoles. Esta familia de fitoquímicos puede reducir el riesgo de ciertos tipos de cáncer, incluyendo cáncer de mama (Murillo y Mehta, 2001). Los indoles se encuentran en crucíferas, tales como brócoli, coliflor, kale, germinados de col de Bruselas, repollo, col china, berro, y nabos y nabo verde.

Capacidad antioxidante de frutas y hortalizas

Recientemente Prior *et al.* (2004) publicaron una nueva lista del análisis mas amplio que han realizado con mas de cien alimentos, incluyendo hortalizas, frutas, nueces, frutas secas, especias, créales y otros alimentos. A continuación se muestran los primeros veinte alimentos que mostraran la capacidad antioxidante más alta por porción:

Lugar	Alimentos	Lugar	Alimentos
1	Frijoles rojos pequeños secos.	11	Fresas.
2	Arandanos azules silvestres.	12	Manzana Red Delicious
3	Frijoles rojos Kidney.	13	Manzana Granny Smith.
4	Frijoles pintos.	14	Nuez pecanera.
5	Arandanos azules cultivados.	15	Cerezas dulces
6	Arandanos agrios	16	Ciruelas negras
7	Alcachofas cosidas.	17	Papas cosidas

8	Zarzamoras.	18	Frijoles negros secos
9	Ciruela europea.	19	Ciruela japonesa
10	Frambuesa	20	Manzanas Gala

Señalizadores del estrés

Acido salicílico. El ácido salicílico es un compuesto fenólico derivado del ácido benzóico involucrado en el metabolismo secundario de las plantas. Los fenoles juegan un papel esencial en el crecimiento, desarrollo y en la interacción de la planta con el ambiente y con otros organismos. Cuando las células, órganos o plantas completas son sometidas a la acción de alguna clase de estrés, sea este biótico o abiótico, su concentración se eleva. En estas situaciones el ácido salicílico participa en forma importante en la cascada de señalización que da lugar a las respuestas de adaptación en ambientes extremos, a la expresión de los sistemas de control de daño oxidativo así como a la inducción de la resistencia sistémica adquirida en el caso de patogénesis (Raskin, 1992). López *et al*, (1998) encontraron que el ácido salicílico 10^{-4} y 10^{-6} molar aumentaron el número de granos en 4 y 1.3 por espiga en relación al testigo en trigo.

Acido benzóico. El ácido benzóico, es un ácido fenólico que se considera como precursor del ácido salicílico (Raskin, 1992), el cual está muy distribuido en la naturaleza en estado libre, o en forma de derivados sencillos, como sales, esteroides y amidas. El benjuí (del *Styrax benzoin*) puede contener hasta 20 por ciento de ácido benzóico, en estado libre o en combinaciones que se

descomponen fácilmente por calentamiento. La resina acaroide (de la *Xanthorrhoea hastilis*) contiene de 4.5 a 7 por ciento. Se encuentran proporciones más pequeñas del ácido libre en productos naturales de índole muy diversa: la corteza del cerezo negro silvestre, el castóreo, los arándanos (que contienen de 0.029 a 0.098 por ciento), las ciruelas, el clavo maduro y el aceite volátil de anís. La frambuesa, la grosella y el fruto de la *Gaylussacia baccata* (especie de arándano) contienen ácido benzoico o compuestos muy afines. Benavides (2002), menciona que con aplicaciones de ácido benzoico 10^{-4} M, se consiguió un aumento significativo en la tolerancia a la carencia de agua en plántulas de repollo y tomate.

Quitósán. El quitósán es un polímero de quitina, la cual es un homopolímero presente en los caparazones de crustáceos, moluscos, en las cutículas de los insectos y también se presenta en forma natural en la pared celular de algunos hongos, donde se sintetiza a través de varias reacciones enzimáticas que ocurren en estos microorganismos, y tiene la capacidad de asociarse a lípidos. (Rathke *et al.*, 1994).

El efecto de una película de quitosán en el pardeamiento enzimático de frutos de litchi (*Litchi chinensis* Som), fue estudiado por Zhang y Quantick (1997) quienes reportaron que cubiertas de películas de quitosán disminuyeron cambios en los contenidos de antocianinas, flavonoides y fenoles totales, también disminuyó el incremento en la actividad de polifenoloxidasas e inhibió parcialmente el aumento en la actividad de peroxidasa.

Salvador *et al.* (1999) recubrieron aguacate cultivar Hass con quitosan y lograron conservar los frutos en buen estado hasta por 6 meses, logrando además inhibir el crecimiento de los microorganismos que causan la antracnosis y la pudrición del pedúnculo.

La actividad del quitosán para activar los mecanismos de defensa de las plantas lo convierte en una alternativa potencial atractiva para el manejo inocuo de los patógenos y posiblemente del estrés abiótico en cultivos, tanto en condiciones de manejo intensivo como en terrenos marginales.

Métodos para medir antioxidantes

La generación de radicales libres está relacionada con la oxidación de lípidos y sustratos biológicos, por tanto, es importante la búsqueda de métodos para la determinación del secuestro de especies de radicales. Los principales métodos utilizados con este fin en ambos sustratos, hidrosolubles y liposolubles, se basan en el secuestro de radicales: superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radicales peróxilo ($HOCL$), radicales hidroxilo (HO^{\cdot}) y secuestro de radicales peróxilo (ROO^{\cdot}), entre los que destacan los métodos que usan azo-compuestos para la generación de radicales peróxilo, tales como el método del "TRAP" (Total Radical Trapping Antioxidant Parameter) y el método del "ORAC" (Oxygen-Radical Absorbance Capacity); secuestro del catión radical 2,2- Azinobis- (3- etilbenzotiazolin-6-sulfonato) o método del ABTS o del "TEAC" (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity); secuestro del radical estable

2,2-difenil-1-picrilhidrazil o método del DPPH: Y secuestro del radical cation N, N-dimetil-pufenilendilamina o método del DMPD. Actualmente, a pesar de la diversidad de métodos existentes, hay una gran necesidad de estandarizar estos métodos para la determinación de la actividad antioxidante. La búsqueda de métodos más específicas, que proporcionen una información química que sea directamente relacionada con el deterioro oxidativo de alimentos y muestras biológicas, podría ser el objeto de futuras investigaciones (Sánchez-Moreno, 2002).

Método de la capacidad antioxidante equivalente a Trolox. Este método es conocido como Método de la Capacidad Antioxidante Equivalente a Trolox TEAC (*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*) o método ABTS. Se basa en la inhibición de la absorbancia del catión radical 2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonato) (ABTS^{•+}), el cual tiene un espectro de absorción a una longitud de onda característica mostrando una absorción máxima principal a 415 nm, y una absorción máxima secundaria a 660, 734 y 820 nm. El método original se basó en la activación de metmioglobina, actuando como peroxidasa, con H₂O₂ mediante la formación del radical ferrilmioglobina, el cual entonces oxida el compuesto fenotiazina ABTS, formando el catión radical ABTS^{•+}

El uso normal de Trolox, como un estándar permite al ensayo ser llamado TEAC; los resultados son expresados como equivalentes Trolox, que es la concentración de la solución Trolox (mmol/L) con un potencial antioxidante equivalente a 1.0 mmol/L de solución de la sustancia bajo investigación.

Ya que, el catión radical $ABTS^{\cdot+}$ se puede disolver en un medio acuoso y en un medio de etanol acidificado (Arnao *et al.*, 1998) este ensayo es capaz de probar la actividad antioxidante de compuestos hidrofílicos y lipofílicos. Este método se ha utilizado para se evaluaron los efectos antioxidantes en hortalizas y plantas medicinales chinas (Chen *et al.*, 2004), en colectas de albahaca (Javanmardi *et al.*, 2003), y en frutos tropicales (Guan y Whiteman, 2005) entre otros cultivos.

INFLUENCIA DE SEÑALIZADORES DEL ESTRÉS EN HORTALÍZAS Y SU RELACIÓN CON ANTIOXIDANTES

H. Ramírez ^{1¶}; J. H. Rancaño-Arrijoa¹; A. Benavides-Mendoza¹; R. Mendoza-Villarreal²; E. Padrón-Corral³.

¹Departamento de Horticultura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. Correo-e: homeror@terra.com.mx (¶ Autor responsable).

²Departamento de Ciencias Básicas. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.

³Centro de investigación en Matemáticas Aplicadas. Universidad Autónoma de Coahuila.

RESUMEN

Con el propósito de conocer sus efectos en el nivel de antioxidantes y parámetros fenotípicos en hortalizas, se aplicaron señalizadores del estrés en acelga (*Beta vulgaris* L.), cv. Fordhock, coliflor (*Brassica oleracea* var. Botritis), cv. Snow Ball, brócoli (*Brassica oleracea* var. Italica), cv. Di Cico y repollo (*Brassica oleracea* var. Capitata) cv. Copenhagen Market, cultivadas bajo invernadero en la primavera del año 2004. Se realizaron aspersiones con soluciones de ácido salicílico (AS) , 10^{-6} M, ácido benzoico (AB) , 10^{-6} M, quitosán (Q), al 1 %, y un testigo sin aplicación. Se evaluó el efecto de los señalizadores del estrés sobre la altura de planta, longitud de raíz, número de hojas, peso fresco y peso seco de de la misma. El nivel de antioxidantes se determinó mediante el método de la "CAET" (*Capacidad Antioxidante Equivalente a Trolox*) también conocido como método del ABTS[®] (catión radical 2,2- Azinobis- (3- etilbenzotiazolin-6-sulfonato). El comportamiento de las hortalizas fue diferente debido a la especie tanto para los parámetros fenotípicos, como para el nivel de antioxidantes. Se encontró interacción entre

los señalizadores del estrés y las especies estudiadas. Sin embargo, la influencia de los señalizadores en la mayoría de las variables no mostró una tendencia consistente. La altura de la planta y la longitud de raíz, no fueron afectadas por los señalizadores del estrés en ninguna de las hortalizas. El número de hojas se incrementó solamente en repollo al aplicar AB. El peso fresco total y de la parte aérea fue superior solo en repollo cuando se aplicó AB; El peso seco de la raíz aumento en acelga con la aplicación de AB, en coliflor los señalizadores indujeron una disminución del mismo. El peso seco de las hortalizas aumentó cuando se aplicó AB y disminuyó al aplicar AS y Q. Solamente acelga y repollo mostraron un incremento en la capacidad antioxidante total en respuesta a las aplicaciones de AS y Q, respectivamente. En coliflor no se registró ningún efecto de los tratamientos; mientras que en brócoli se encontró una disminución de la capacidad antioxidante total al aplicar los señalizadores del estrés.

PALABRAS CLAVE ADICIONALES: Hortalizas, antioxidantes, señalizadores.

STRESS SIGNALLING INFLUENCE IN VEGETABLES AND THEIR ANTIOXIDANTS RELATHIONSHIPS

SUMMARY

Vegetables growing under greenhouse in spring 2004 were sprayed with chemical stress signalling substances, with the purpose to know their effects on

the antioxidants levels and phenotypical parameters. Swiss chard (*Beta vulgaris* L.), cv. Fordhock, cauliflower (*Brassica oleracea* var. Botritis), cv. Snow ball, broccoli (*Brassica oleracea* var. Italica), cv. Di Cico and cabbage (*Brassica oleracea* var. Capitata) cv. Copenhagen market, were sprayed during the spring of 2004 with salicylic acid (SA) 10^{-6} M, benzoic acid (BA) 10^{-6} M and chitosan (CH) 1 %. Control plants were unsprayed. The plant height, leaf number, root length, fresh weight and dry weight were evaluated. The antioxidant level was determined by the "TEAC" (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) assay, also called ABTS (radical cation 2, 2'-Azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonate) assay. Each stress signalling substance showed a different effect in each crop in both, antioxidant level and phenotypical parameters. It was found interaction between compounds and horticultural species. However, the effect of chemicals in most variables evaluated did not show a consistent trend: the plant height and root length were not affected in any of vegetables studied. Leaf number was increased only in cabbage when BA was sprayed. Root fresh weight was increased in Swiss chard with the BA application. In cauliflower this parameter was decreased: whereas in broccoli and cabbage no significant difference was found. Total fresh weight and aerial fresh weight were higher only in cabbage when was sprayed BA. Dry weight was increased with the BA; while SA and CH application caused a reduction in dry weight. Swiss chard and cabbage showed an increase in total antioxidant capacity in response to the SA and Q spraying. None treatment effect was found in cauliflower. Broccoli showed a reduction in the total antioxidant capacity in any chemical treatment.

ADDITIONAL KEY WORDS: vegetables, antioxidants, signalling substances.

INTRODUCCIÓN

Las frutas y hortalizas utilizadas en la alimentación humana, aportan agua, vitaminas, minerales y fibra, que sumados al consumo de cereales, leguminosas y alimentos de origen animal, complementan el requerimiento diario para una alimentación correcta, que permita a las personas gozar de un pleno bienestar biológico, psicológico y social.

El cuerpo humano está sujeto al ataque de radicales libres, los cuáles son moléculas altamente reactivas generadas por las reacciones bioquímicas de oxido- reducción (redox) que ocurren como parte del metabolismo celular normal, y por la exposición a contaminantes ambientales como luz ultravioleta, y humo de cigarro. Las principales especies de radicales libres son: radical superoxido (\dot{O}_2^-), radical hidroxilo ($OH\dot{}$), radical oxido hiponitroso ($NO\dot{}$) y radical peroxilo ($ROO\dot{}$). Una vez formados, los radicales libres atacan las estructuras celulares dentro del cuerpo, y provocan enfermedades degenerativas asociadas con el envejecimiento, como el cáncer, arteriosclerosis, diabetes, enfermedades respiratorias, daño al hígado, artritis reumatoide, cataratas, enfermedades inflamatorias del intestino, desórdenes del sistema nervioso central, mal de Parkinson, SIDA, etc. (Rodríguez *et al.*, 2001; Devasagayam *et al.*, 2004).

Estudios epidemiológicos demuestran que el consumo de frutas y hortalizas tiene un efecto protector en muchos pacientes que han sobrevivido a estas enfermedades, ya que han mostrado una relación inversamente

proporcional entre el consumo de hortalizas y la incidencia de estos desórdenes (Ames *et al.*, 1993; Steinmetz y Potter, 1996; Ness y Powels, 1997; Joshipura *et al.*, 1999; Tang *et al.*, 2000). Actualmente se ha encontrado que muchos metabolitos secundarios sintetizados en las plantas, son una fuente de compuestos con capacidad antioxidante tales como tocoferoles, carotenoides, flavonoides, y vitamina C entre otros. Por lo que recientemente se ha determinado el nivel de antioxidantes en frutas, hortalizas, especias, plantas medicinales, y en alimentos procesados (Prior y Cao, 2000; Tosun *et al.*, 2003). Sin embargo, la literatura referente al impacto de prácticas agrícolas que modifiquen los niveles de metabolitos secundarios en las plantas, como los antioxidantes, es escasa (Asami *et al.*, 2003). Por otra parte Kalt y Kushad (2000) señalan que el incremento en precosecha, de los niveles de antioxidantes de la dieta en frutas y hortalizas es un área de gran interés y representa una oportunidad para los científicos de la agricultura. Benavides *et al.* (2002) mencionan que es posible manipular los mecanismos de defensa de las plantas y los niveles de fitoquímicos antioxidantes específicos por medio de la ingeniería genética, con la manipulación ambiental, o con la aplicación exógena de evocadores químicos que actúan como señalizadores y promotores de oxidación controlada. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue comparar los niveles de antioxidantes en acelga, coliflor, brócoli y repollo como respuesta a la aplicación de ácido salicílico, ácido benzoico, y quitosán. Así como su efecto en el crecimiento y desarrollo de estos cultivos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal y condiciones de cultivo

Este trabajo de investigación se desarrolló en un invernadero de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro en Saltillo, Coahuila, México, durante el período de enero a julio del 2004. Se utilizaron semillas certificadas de acelga (*Beta vulgaris* L.), cv. Fordhock, coliflor (*Brassica oleracea* var. Botritis), cv. Snow Ball, brócoli (*Brassica oleracea* var. Italica), cv. Di Cico y repollo (*Brassica oleracea* var. Capitata) cv. Copenhagen Market. Estas, se sembraron en cinco cajas de poliestireno de doscientas cavidades con sustrato de peat moss PREMIER BX el 28 de enero del 2004. Las plántulas fueron trasplantadas en invernadero el 23 de febrero, en bolsas de plástico negro de 25 X 30 cm con sustrato de peat moss y arena (1:2). El cultivo fue manejado de acuerdo al paquete tecnológico utilizado en el Departamento de Horticultura (Benavides, 2002).

Las bolsas se establecieron en camas de 0.90 X 13 m a una densidad de población inicial de 32 plantas por m² éstas se reacomodaron durante el desarrollo del cultivo hasta alcanzar una densidad de población de 16 plantas por m².

Diseño experimental y tratamientos

Se utilizó un diseño completamente al azar con arreglo factorial A X B en donde los factores fueron las hortalizas A: acelga, coliflor, brócoli y repollo, y

los señalizadores del estrés B: ácido salicílico (AS), 10^{-6} M, ácido benzoico (AB), 10^{-6} M, quitosán (Q), al 1 %, y el testigo sin aplicación, con cuatro repeticiones para el análisis de los parámetros hortícolas y dos para el análisis de antioxidantes. Se utilizó la prueba de Tukey para estimar diferencias estadísticas.

Las aplicaciones se iniciaron cuando las plántulas alcanzaron 8 y 10 hojas verdaderas, el 18 de marzo y se continuaron haciendo cada dos semanas hasta el 30 de mayo. En cada aplicación de los tratamientos se agregó el surfactante líquido nonifenol (10) polioxietilénico (Pego Del) a razón de 1 ml·Litro⁻¹ de agua. El proceso experimental se dividió en dos fases:

Fase I. Influencia en el comportamiento hortícola

Las variables evaluadas fueron: altura de la planta, número de hojas por planta y peso fresco y peso seco total, de la parte aérea y de la raíz. Con excepción del peso seco, todas las variables referidas se determinaron secuencialmente en una serie de operaciones al momento de la cosecha: el número de hojas se determinó separando la hoja completa, desde el punto de inserción con el tallo de la planta, con una navaja Bahco K-AP-1; la altura de la planta se midió desde la base del tallo hasta el crecimiento apical con una cinta métrica Pretul escala 0-3 m y los resultados se registraron en cm. Enseguida, las plantas se seccionaron en su componente aérea (hojas y tallos) y subterránea (raíz) para pesarlas por separado. El peso de las plantas se midió en una balanza Ohaus® Modelo No. 2, 729,434 con capacidad para 2610 g. Posteriormente, las plantas se colocaron en bolsas de papel y se secaron en

un horno de secado Lindberg/blue® Modelo Nave Gravity Oven con capacidad para mantener una temperatura de 4° C hasta 260 ° C. Las plantas se secaron a 65 ° C durante 48 horas.

Fase II. Antioxidantes.

Cuando las plantas en cada especie alcanzaron la madurez fisiológica (Ramírez *et al*, 2005), se seleccionaron hojas de cada tratamiento cortándose la primera hoja más joven totalmente expandida. Se tomaron dos repeticiones por cada tratamiento consistiendo en 4 hojas cada una, por lo que se analizaron un total de 32 muestras, evitando las plantas orilleras, para total competencia. Las muestras, se depositaron en bolsas de polietileno transparente de 10 X 15 cm previamente etiquetadas y se guardaron en un termo con hielo. Posteriormente se trasladaron al laboratorio para su análisis.

En el laboratorio se tomaron las hojas y se seccionaron en tres partes. De la parte central de cada muestra, se pesaron 5 g, se colocaron en un mortero, previamente congelado, al que se le agregó 10 ml de buffer de fosfatos con pH = 7 y se molió vigorosamente. El extracto obtenido se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos. La determinación de la concentración de antioxidantes se hizo mediante la utilización del kit “Total Antioxidant Status Kit Assay” de Calbiochem (Miller *et al.*, 1993), que consta de una solución buffer (de fosfato salino); cromógeno (Metmioglobina y ABTS® (catión radical 2,2- Azinobis- (3- etilbenzotiazolin-6-sulfonato)); sustrato (peroxido de hidrógeno estabilizado) y como estándar se utilizó el análogo de la vitamina E Trolox (6-Hidroxi-2, 5, 7,8-tetrametil croman-2-ácido carboxílico) 1.7 mM.

Adicionalmente se utilizó un espectrofotómetro Leitz Modelo 340-800, con capacidad para medir absorbancia a 600 nm, celdas de 1cm de longitud; una centrifuga Clay Adams Modelo 420225, un termo-baño Felisa[®] Modelo FE 373 para controlar la temperatura (a 37 °C), un potenciómetro Hanna Modelo pH 212, y una balanza AND Modelo HR-200. Para realizar el análisis de las muestras se prepararon los tres reactivos incluidos en el kit de la siguiente manera: al cromógeno y al sustrato se le agregaron 10 ml y 7.5 ml de buffer con pH de 7.0 respectivamente; al estándar se le agregó 1ml de agua destilada.

Medición de antioxidantes en hojas

El espectrofotómetro se ajustó a 600 nm y el sustrato diluido (H_2O_2) y el cromógeno se equilibraron a 37 ° C exactamente 5 minutos antes de usarse. Primero se preparó un blanco agregando 20 μ l de agua doblemente desionizada en una celda más 1ml del cromógeno. En otra celda, se agregó 20 μ l del estándar (Trolox) más 1ml de cromógeno, y se leyó la absorbancia inicial en ambas celdas. Posteriormente se analizaron los extractos de hojas de los cuatro cultivos, colocando 20 μ l de extracto, mas 1 ml de cromógeno para cada muestra, después se añadieron 200 μ l del sustrato (H_2O_2) diluido a cada celda, se mezclaron bien y se tomó el tiempo de inicio simultáneamente. La absorbancia (A) se midió después de tres minutos del desarrollo de color. La temperatura se mantuvo a 37 ° C durante toda la prueba. Para calcular los niveles de antioxidante en las muestras se usó la concentración del estándar Trolox (1.7mM) de acuerdo al kit utilizado. Se determinó el gradiente de A para

las muestras, el estándar y el blanco: $\Delta A = A - A_0$. Después se calculó la Capacidad Antioxidante Equivalente a Trolox ("CAET) en cada muestra usando la fórmula siguiente:

$$\text{"CAET"} \text{ (mM)} = \frac{1.7\text{mM} \cdot (\Delta A \text{ del blanco} - \Delta A \text{ de la muestra})}{(\Delta A \text{ del blanco} - \Delta A \text{ del estándar})} (10 \text{ mg}^{-1} \text{ de p. fresco})$$

El resultado de cada muestra se expresó como mM de Equivalente Trolox $\cdot \text{mg}^{-1}$ de peso fresco de muestra.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Comportamiento hortícola.

Los resultados de los efectos de las aspersiones de AS, AB y Q, en cada hortaliza se presentan en el Cuadro 1. Posteriormente se presenta el efecto de cada especie hortícola (Cuadro 2), así como el efecto de cada uno de los señalizadores del estrés (Cuadro 3) sobre la misma variable.

Se encontró que la altura de planta no fue afectada por los señalizadores del estrés en ninguna de las hortalizas, solamente se observaron diferencias por efecto de la especie ($P \geq 0.05$): brócoli mostró la mayor altura, seguido por acelga, coliflor y repollo (Cuadro 1 y 2), tampoco se encontró efecto general de los señalizadores (Cuadro 3).

El número de hojas formadas en respuesta a las aplicaciones de los señalizadores del estrés no mostró diferencias significativas ($P \leq 0.05$) en acelga,

coliflor y brócoli. Sin embargo, en repollo aumentó aproximadamente 10 hojas cuando se aplicó ácido benzóico, pero, disminuyó 11 y 17 hojas cuando se aplicaron Q y AS respectivamente, en relación al testigo ($P \leq 0.05$) (Cuadro 1). El número de hojas fue mayor en repollo, con aproximadamente 8, 18 y 26 hojas más por planta que coliflor, brócoli y acelga, por efecto de la especie ($P \leq 0.05$) (Cuadro 2). El efecto de AB fue superior al testigo por 4 hojas mientras que Q y AS fueron estadísticamente iguales entre sí, pero inferiores al testigo en 4 y 5 hojas, respectivamente en el conjunto de las hortalizas ($P \leq 0.05$) (Cuadro 2).

La longitud de la raíz no fue afectada por la aplicación de los señalizadores del estrés, solamente se registraron pequeñas diferencias por efecto de cada especie de hortaliza: repollo mostró una longitud de raíz 4.46 cm mayor que acelga y 5.15 cm mayor que brócoli y coliflor ($P \leq 0.05$) (Cuadro 1 y 2). El efecto general del conjunto de señalizadores sobre la longitud de raíz en cada especie fue estadísticamente igual ($P \leq 0.05$) (Cuadro 3).

El peso fresco total y el peso fresco de la parte aérea de la planta no fueron afectados por los señalizadores del estrés en acelga, coliflor y brócoli. Sin embargo, en repollo se observó un aumento del peso fresco total de 157 g cuando se aplicó AB, y una disminución de 113 y 213 g al aplicar Q y AS respectivamente. El peso fresco de la parte aérea en esta hortaliza mostró un comportamiento similar a la variable anterior al superar 135 g al testigo cuando se aplicó AB, pero disminuyó 94 y 177 g respectivamente, cuando se aplicaron Q y AS, en relación al testigo ($P \leq 0.05$) (Cuadro 1). Por efecto de la especie, acelga y coliflor mostraron el mayor peso fresco total y de la parte aérea, con 233 y 166 g más por planta, respectivamente, que brócoli y repollo. El AB

provocó un peso fresco total igual al testigo mientras que Q y AS provocaron una disminución de 86 g con respecto al testigo. El peso fresco de la raíz de acelga y brócoli no fue afectado por los señalizadores del estrés; en coliflor se encontró que el efecto de Q y AB fue estadísticamente igual ($P \leq 0.05$), pero disminuyó en 24 g el peso fresco de raíz, y AS lo redujo 37 g con relación al testigo; mientras que en repollo el AB fue el mejor tratamiento al superar en 23 g al testigo, los efectos de Q y AS fueron inferiores al testigo en 20 y 37 g respectivamente (Cuadro 1). Acelga y coliflor mostraron el mayor peso fresco de raíz al superar por 57 g a brócoli y repollo; mientras que por efecto de los señalizadores en el total de las hortalizas el AB provocó un aumento de 9 g, pero Q y AS una disminución de 8 y 16 g respectivamente.

No se registró interacción entre las especies de hortalizas y los señalizadores del estrés sobre el peso seco total y de la parte aérea de las hortalizas (Cuadro 1). Sin embargo, si se observó diferencia al hacer la comparación de medias de los factores: Coliflor fue la hortaliza con mayor peso seco total, al superar con 17, 27 y 68 g a acelga, brócoli y repollo respectivamente; el AB provocó un aumento de peso seco total de 4 g superior al testigo, mientras que Q y AS provocaron una disminución de 10 y 18 g respectivamente, en relación al testigo ($P \leq 0.05$) (Cuadro 2 y 3). Coliflor también fue la hortaliza con mayor peso seco de la parte aérea, con 12, 27 y 53 g más que brócoli, acelga y repollo, el cual mostró un valor de aproximadamente la mitad de las hortalizas anteriores; el AB provocó un aumento de peso seco de la parte aérea en 3 g superior al testigo, mientras que Q y AS provocaron una disminución de 9 y 12 g respectivamente, en relación al testigo ($P \leq 0.05$) (Cuadro 2 y 3). El peso seco de la raíz fue

estadísticamente igual en brócoli y en repollo; en acelga, se encontró que el peso seco de raíz aumentó 8 g al aplicar AB, Q fue estadísticamente igual al testigo y AS disminuyó 2 g En coliflor se encontró que las aplicaciones de AB, Q y AS disminuyeron el peso seco de la raíz 7, 11 y 16 g con relación al testigo ($P \leq 0.05$) (Cuadro 1). Acelga mostró el mayor peso seco de raíz, 20 g más que coliflor y 25 g más que brócoli y repollo por efecto de la especie ($P \leq 0.05$) (Cuadro 2). El efecto de los señalizadores del estrés en el conjunto de las hortalizas mostró que AB fue estadísticamente igual al testigo, y Q y AS disminuyeron 2 y 6 g respectivamente el peso seco de raíz ($P \leq 0.05$) (cuadro 3).

Los resultados obtenidos en este estudio coinciden con lo que reportan Jung *et al.*, (2004), quienes aplicaron ácido benzóico, salicílico, caféico, clorogénico, ferúlico, p-hidroxibenzóico y vinílico a concentraciones de 50, 100, 150, 200 y 400 μM en la solución nutritiva, y encontraron que a las concentraciones más altas todos los compuestos redujeron significativamente tanto el peso fresco, como el peso seco en plantas de tomate, y no obtuvieron un patrón claro relacionado a las dosis con respecto al número de hojas y longitud de plantas. Por el contrario, San Miguel *et al.*, (2000) aplicaron AS en concentración de 10^{-4} , 10^{-6} , 10^{-8} y 10^{-10} M en *Pinus patula* y encontraron aumentos del peso fresco de los tallos en un 33 y 30 % con AS 10^{-8} y 10^{-6} M, respectivamente. Por otra parte, Barka *et al.*, (2004), al aplicar dosis bajas de quitosán indujeron un aumento en el crecimiento de plántulas de *Vitis vinifera* y encontraron que la mejor concentración fue de 1.75 % (v/v), aumentó el peso seco de brotes y de raíz, aumentó la longitud del tallo y el número de nudos. También aumentó 33% el peso fresco de la raíz y de 45 a 54 % el peso seco de

la misma. Estas respuestas divergentes posiblemente se deban a la sensibilidad de los cultivos de acuerdo al genotipo, ya que se ha encontrado en coliflor que el número de hojas varía de 21 a 98 en un rango de genotipos (Wurr *et al.*, 1982). Sin embargo, la base fisiológica de esta respuesta no ha sido bien identificada.

Nivel de antioxidantes en hortalizas

El método utilizado se basa en la habilidad de los antioxidantes contenidos en las muestras de los extractos de hortalizas para inhibir la oxidación del catión radical ABTS[®] a ABTS^{®.+} por metmioglobina (una peroxidasa). Debido a que el kit utilizado en este estudio mide la capacidad antioxidante efectiva del extracto, una concentración alta puede implicar una mayor capacidad antioxidante de la muestra (Guan y Whiteman., 2005). A continuación se presentan los resultados del efecto de los señalizadores del estrés en cada una de las hortalizas estudiadas: en la Figura 1 se muestra que en acelga, AS provocó la capacidad antioxidante total más alta, y superior al testigo en un 3.51 %. Q y el testigo mostraron un comportamiento estadísticamente igual ($P \leq 0.05$). Mientras que AB provocó un efecto desfavorable al mostrar el nivel más bajo, de 8.33 % inferior al testigo. En coliflor (Figura 2) no se encontraron diferencias significativas al aplicar los señalizadores del estrés ($P \leq 0.05$), por lo que no se registró ningún efecto de los tratamientos. En la Figura 3 se observa que en brócoli los señalizadores del

estrés tuvieron un efecto desfavorable, ya que el efecto del AB, Q y AS mostraron una disminución del 4.15 %, 6.30 % y 14.37 % respectivamente con respecto al testigo ($P \leq 0.05$). En repollo (Figura 4) se mostró una respuesta favorable a la aplicación de Q, se encontró una capacidad antioxidante total 85.74 % superior al testigo, mientras que el efecto de la aplicación de AS y AB fue estadísticamente igual ($P \leq 0.05$).

Debido a que los antioxidantes han sido estudiados por una variedad de disciplinas desde la ciencia clínica hasta la ciencia de los polímeros, se ha generado una gran cantidad de métodos, de 25 a 100, lo que hace difícil comparar los resultados y crea una necesidad de estandarización de los mismos (Felton, 2004). Sin embargo, los valores encontrados en esta investigación coinciden con lo que reportan Alonso *et al.*, (2004) al usar el método ABTS[®] para medir la capacidad antioxidante en muestras de brandis (0.5 – 5.6 mM Trolox) y vinagres (0.1 – 2.9 mM Trolox) derivados de Jerez. Por otra parte Gil, (2000) al evaluar la capacidad antioxidante en jugo de granada encontró valores de 2 a 18 mM Trolox. La capacidad antioxidante de frutas y hortalizas puede ser influenciada por factores genéticos, así como por el medio ambiente, Prior, *et al.*, (1998) encontraron diferencias de hasta 3.3 veces entre especies y cultivares de arandano y fresa. También encontraron diferencias de 2, 6 y hasta 10 veces en la capacidad antioxidante entre cultivares de espinaca, pimiento verde y brócoli, respectivamente. Esta variabilidad entre hortalizas puede ser explicada por la influencia de la especie y el cultivar. El efecto de las soluciones de AS, AB y Q no mostró una tendencia clara en el nivel de antioxidantes en las hortalizas, por lo que en el futuro se deberá explorar un

rango de varias concentraciones, además de incluir otras variables como la determinación de polifenoles totales, la cual es un indicador importante del estado antioxidante en frutas y hortalizas.

Cada señalizador del estrés mostró un efecto particular en cada hortaliza, las Figuras 1 a 4 muestran que al aplicar AS 10^{-6} M se encontraron diferencias significativas ($P \leq 0.05$) entre las cuatro hortalizas estudiadas: acelga mostró el valor de la capacidad antioxidante total más alta de todos los tratamientos, seguida por coliflor y brócoli mientras que repollo mostró un valor tan bajo equivalente a la mitad del valor de acelga. Cuando se aplicó AB 10^{-6} M, se encontró que acelga, coliflor y brócoli mostraron la mejor respuesta al registrar los valores de la capacidad antioxidante total más elevados, los cuales fueron estadísticamente iguales ($P \leq 0.05$) y que repollo presentó el valor más bajo de todos los tratamientos (Figura 1 a 4). Cuando se aplicó Q el efecto sobre la capacidad antioxidante total fue estadísticamente igual ($P \leq 0.05$) para las cuatro hortalizas a pesar de que repollo mostró el valor numérico más alto. Al comparar las medias de los valores de la capacidad antioxidante total en los testigos. Se encontró que acelga, coliflor y brócoli mostraron los valores más altos, los cuales fueron estadísticamente iguales ($P \leq 0.05$), mientras que repollo mostró el valor más bajo: de aproximadamente la mitad de las demás hortalizas (Figuras 1 a 4). Lo anterior coincide al observar el efecto de la especie sobre el nivel de antioxidantes: en la Figura 5 se muestra que acelga, coliflor y brócoli presentaron las capacidades antioxidantes totales más altas, las cuales fueron estadísticamente iguales ($P \leq 0.05$); repollo mostró una capacidad antioxidante total 33.37 % menor a los cultivos anteriores. En la Figura 6 se muestra el

efecto de los señalizadores del estrés: las aplicaciones de quitosán aumentaron 9.52 % la capacidad antioxidante total de las hortalizas estudiadas, mientras que el ácido salicílico y el ácido benzoico provocaron una disminución del 3.81 % y 6.91 % con relación a los testigos ($P \leq 0.05$).

CONCLUSIONES

En base a los resultados de ésta investigación y bajo las condiciones en que se realizó, se concluye que la aplicación de los señalizadores del estrés provocan un efecto diferente en cada hortaliza: Las aplicaciones de ácido salicílico 10^{-6} M reducen el número de hojas, el peso fresco y peso seco en repollo, aumentan la capacidad antioxidante en acelga y la reducen en brócoli. Las aplicaciones de ácido benzoico 10^{-6} M aumentan el número de hojas y el peso fresco en repollo, aumentan el peso seco de raíz en acelga, disminuyen el peso fresco y peso seco de raíz en coliflor, y disminuyen la capacidad antioxidante en acelga y brócoli. Las aplicaciones de quitosán al 1 % disminuyen el número de hojas y peso fresco y peso seco en repollo, disminuyen la capacidad antioxidante en brócoli y la aumentan en repollo.

LITERATURA CITADA

- ALONSO, A. M.; CASTRO, R.; RODRIGUEZ, M.C.; GUILLEN, D. A.; BARROSO, C. G. 2004. Study of the antioxidant power of brandies and vinegars derived from Sherry wines and correlations with their content in polyphenols. *Food Research International* 37:715-721.
- AMES, B. M.; SHIGENA, M.K.; HAGEN, T.M. 1993. Oxidants, antioxidants and the degenerative disease of aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 7915-7922.
- ASAMI, K. D; HONG, Y. J.; BARRETT, D. M.; MITCHEL, A. E. 2003. Comparison of the Total Phenolic and Ascorbic Acid Content of Freeze-Dried and Air-Dried Marionberry, Strawberry, and Corn Grow Using Conventional, Organic, and Sustainable Agricultural Practices. *J. Agric. Food Chem.* 51: 1237-1241.
- BARKA, E. A; EULLAFFROY, P.; CLEMENT, C; VERNET, G. 2004. Chitosan improves development, and protects *Vitis vinifera* L. against *Botrytis cinera*. *Plant Cell Rep.* 22: 608-614.
- BENAVIDES, M. A. 2002. *Ecofisiología y Bioquímica Del Estrés de las Plantas*. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. pp. 193-195.
- FELTON, J. M. 2004. LC-Now for Antioxidants. *Today's Chemist at work*. American Chemical Society. Pp 20-24.
- GIL, M. I.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A.; HESS-PIERCE, B.; HOLCROFT, D. M.; KADER, A. A. 2000. Antioxidant Activity Pomegranate Juice and Its Relationship with Phenolic Composition Processing. *J. Agric. Food Chem.* 48: 4581-4589.

- GUAN, T. T.; WHITEMAN, M. 2005. Antioxidant Activities of Some Tropical Fruits. *Free Radical Biology and Medicine*. En prensa.
- JOSHIPURA, K. J.; ASCHERIO, A.; MANSON, J. E.; STAMPFER, M. J.; RIMM, E. B.; SPEIZER, F. E.; HENNEKENS, CH.; SPIEGELMAN, D.; WILLET, W. C. 1999. Fruit and vegetable intake in relation to risk of ischemic stroke. *J. Amer. Med. Assn.* 282(13):1233-1239. Resumen.
- JUNG, V.; OLSSON, E.; CASPERSEN, S.; ASP, H.; JENSÉN, P.; ALSANIUS, B.W. 2004. Response of young hydroponically grown tomato plants to phenolic acids. *Scientia Horticulturae*. 100: 23-37. Resumen.
- KALT, W; KUSHAD, M. M. 2000. The Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Plants and Human Health: Introduction to the Colloquium. *HortScience*. 35(4): 572.
- MILLER, N. J.; RICE-EVANS, C.; DAVIES, M. J.; GOPINATHAN, V.; MILNER, A. 1993. A novel method for measuring antioxidant capacity and its applications to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical Science* 84(4):407-412. Resumen.
- NESS, A. R.; POWELS, J.W. 1997. Fruit and vegetables, and cardiovascular disease: A review. *Inter. J. Epidemiol.* 26(1):1-13. Resumen).
- PRIOR, R. L.; CAO, G.; MARTIN, A.; SOFIC, E.; MCEWEN, J.; O'BRIEN, C.; LISCHNER, N.; EHLENFELDT, M.; KALT, W.; KREWER, G.; MAINLAND, C.M. 1998. Antioxidant capacity as influenced by total phenolic and anthocyanin content, maturity and variety of *Vaccinium* species. *J. Agr. Food Chem.* 46: 2686-2693.

- PRIOR, R. L; CAO, G. 2000. Antioxidant Phytochemicals in Fruits and Vegetables: Diet and Health Implications. Hortscience. 35(4): 588-591.
- RAMÍREZ, H.;PERALTA, M. M. R.; BENAVIDES M. A.;SANCHEZ, L. A.; ROBLEDO, T. V.; HERNANDEZ, D. J. 2005. Efectos de Prohexadiona-Ca en Tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) y su Relación con Giberelinas y Citocininas. Revista Chapingo Serie Horticultura. En prensa.
- RODRIGUEZ, P. J. M; MENDEZ, L. J. R; TRUJILLO, Y. 2001. Radicales Libres en la Biomedicina y el Estrés Oxidativo. Rev. Cubana Med Milit 30(1): 36-44.
- SAN MIGUEL, R.; GUTIERREZ, M; LARQUÉ-SAAVEDRA, A. 2003. Salicylic Acid Increases the Biomasa Accumulation of *Pinus patula*. Southern Journal of Applied Forestry 27 (1): 52-54. Resumen.
- STEINMETZ, K. A.; POTTER, J. D.1996. Vegetables, fruit, and cancer prevention: a review. J Am Diet Assoc. 96(10):1027-39. Resumen.
- TOSUN, I.; USTUN, N.S. 2003. An Investigation about Antioxidant Capacity of Fruit Nectars. Pakistan Journal of Nutrition 2(3):167-169.
- WURR, D. C. E.; FELLOWS, J.R.; CRISP, P.1982. Leaf and curd production in cauliflower varieties cold-treated before transplanting. Journal of Agricultural Science. 99: 425-432.

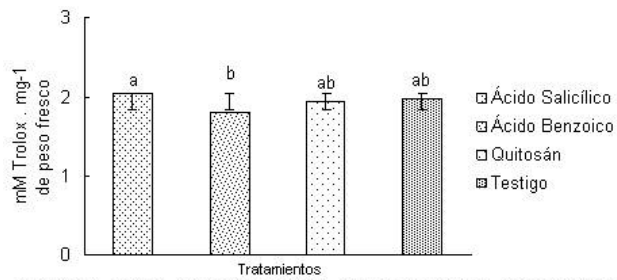


Figura 1. Efecto de señalizadores del estrés sobre la capacidad antioxidante equivalente a trolox (CAET) en extractos de acelga cv. Copenhagen Market. Letras iguales significan igualdad de acuerdo a la prueba de Tukey a una $P \leq 0.05$.

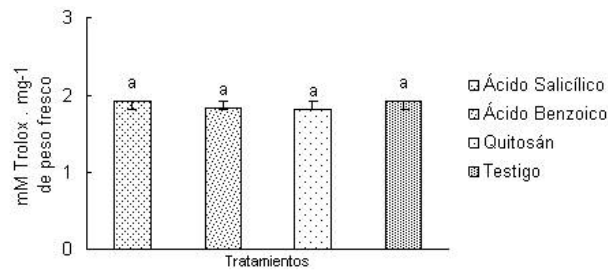


Figura 2. Efecto de señalizadores del estrés sobre la capacidad antioxidante equivalente a Trolox (CAET) en extractos de coliflor cv. Snow ball. Letras iguales significan igualdad de acuerdo a la prueba de Tukey a una $P \leq 0.05$.

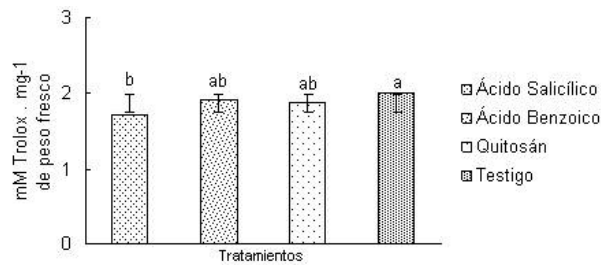


Figura 3. Efecto de señalizadores del estrés sobre la capacidad antioxidante equivalente a Trolox (CAET) en extractos de brócoli cv. Di Cicco. Letras iguales significan igualdad de acuerdo a la prueba de Tukey a una $P \leq 0.05$.

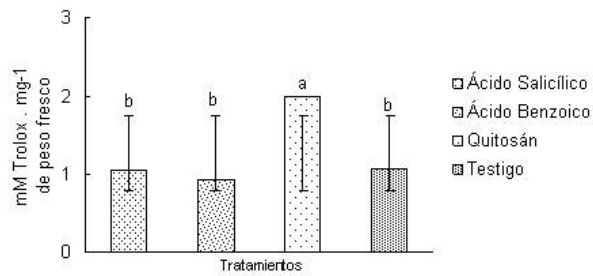


Figura 4. Efecto de señalizadores del estrés sobre la capacidad antioxidante equivalente a Trolox (CAET) en extractos de repollo cv. Copenhagen Market. Letras iguales significan igualdad de acuerdo a la prueba de Tukey a una $P \leq 0.05$.

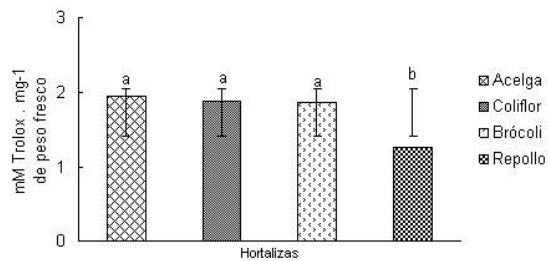


Figura 5. Capacidad antioxidante equivalente a Trolox (CAET) en extractos de acelga, coliflor, brócoli y repollo por efecto de cada especie. Letras iguales significan igualdad de acuerdo a la prueba de Tukey a una $P \leq 0.05$.

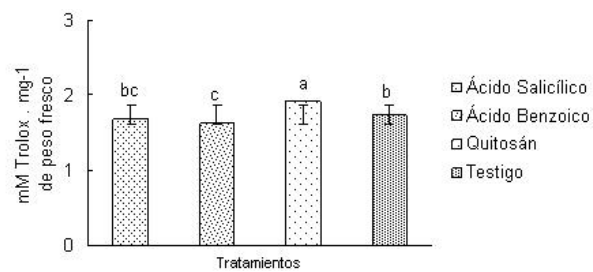


Figura 6. Efecto de señalizadores del estrés sobre la capacidad antioxidante equivalente a Trolox (CAET) en extractos de hortalizas. Letras iguales significan igualdad de acuerdo a la prueba de Tukey a una $P \leq 0.05$.

CUADRO 1. Efecto de aplicaciones foliares de los señalizadores del estrés: ácido salicílico (AS), ácido benzóico (AB), quitosán, (Q) y testigo (T), sobre parámetros fenotípicos de cuatro hortalizas en Saltillo, Coahuila, México 2004. Cada valor representa la media de cuatro plantas.

Tratamiento	ALT (cm)	NH	LR (cm)	PFT (g)	PFA (g)	PFR (g)	PST (g)	PSA (g)	PSR (g)
Acelga									
AS 10 ⁻⁶ M	57.69 ^{NS}	15.50 a ^Z	30.50 ^{NS}	852.00 a	697.95 a	154.00 a	101.00 ^{NS}	68.25 ^{NS}	32.75 b
AB 10 ⁻⁶ M	53.97 ^{NS}	14.75 a	35.63 ^{NS}	873.25 a	705.85 a	167.25 a	128.00 ^{NS}	85.00 ^{NS}	42.25 a
Q al 1 %	57.72 ^{NS}	15.25 a	37.00 ^{NS}	931.00 a	755.35 a	175.75 a	115.00 ^{NS}	75.75 ^{NS}	39.25 ab
Testigo	60.20 ^{NS}	13.75 a	31.00 ^{NS}	836.75 a	682.88 a	153.75 a	112.50 ^{NS}	77.50 ^{NS}	34.75 ab
Coliflor									
AS 10 ⁻⁶ M	33.73 ^{NS}	30.25 a	33.13 ^{NS}	838.75 a	699.35 a	139.50 b	108.50 ^{NS}	88.25 ^{NS}	19.75 c
AB 10 ⁻⁶ M	28.75 ^{NS}	34.75 a	30.00 ^{NS}	896.50 a	738.18 a	158.25 ab	147.25 ^{NS}	118.25 ^{NS}	28.50 ab
Q al 1 %	32.60 ^{NS}	30.25 a	33.50 ^{NS}	855.50 a	708.08 a	147.00 ab	121.50 ^{NS}	96.75 ^{NS}	24.75 bc
Testigo	31.75 ^{NS}	31.75 a	34.75 ^{NS}	958.75 a	782.18 a	176.75 a	148.00 ^{NS}	112.00 ^{NS}	35.75 a
Brócoli									
AS 10 ⁻⁶ M	72.30 ^{NS}	21.50 a	36.50 ^{NS}	630.50 a	533.17 a	97.50 a	104.50 ^{NS}	94.25 ^{NS}	9.75 a
AB 10 ⁻⁶ M	70.13 ^{NS}	23.25 a	30.75 ^{NS}	710.50 a	594.48 a	116.00 a	108.75 ^{NS}	91.00 ^{NS}	17.25 a
Q al 1 %	67.85 ^{NS}	19.75 a	31.75 ^{NS}	601.00 a	506.35 a	94.50 a	97.50 ^{NS}	84.75 ^{NS}	12.25 a
Testigo	69.20 ^{NS}	24.00 a	32.13 ^{NS}	634.25 a	535.60 a	98.75 a	108.50 ^{NS}	97.25 ^{NS}	10.75 a
Repollo									
AS 10 ⁻⁶ M	15.58 ^{NS}	28.00 c	38.45 ^{NS}	479.50 c	404.93 c	74.50 c	52.00 ^{NS}	41.00 ^{NS}	10.75 a
AB 10 ⁻⁶ M	19.50 ^{NS}	55.25 a	38.30 ^{NS}	849.75 a	716.18 a	133.50 a	70.50 ^{NS}	58.00 ^{NS}	12.00 a
Q al 1 %	19.13 ^{NS}	33.75 c	38.30 ^{NS}	579.25 bc	487.85 bc	91.00 bc	62.75 ^{NS}	49.75 ^{NS}	12.50 a
Testigo	15.25 ^{NS}	44.50 b	36.90 ^{NS}	692.50 ab	581.53 ab	111.00 ab	69.50 ^{NS}	54.50 ^{NS}	14.75 a

^Z Valores con la misma letra dentro de columnas, son estadísticamente iguales de acuerdo a la prueba de Tukey a una $P \leq 0.05$.

^{NS} Diferencias no significativas por columna.

ALT: Altura de planta; NH: Número de hojas; LR: Longitud de raíz; PFT: Peso de materia fresca total; PFA: Peso fresco aéreo; PFR: Peso de materia fresca de raíz; PST: Peso de materia seca total; PSA: Peso seco aéreo; PSR: Peso de materia seca de raíz.

CUADRO 2. Parámetros fenotípicos de cuatro hortalizas en respuesta al efecto general de señalizadores del estrés, en Saltillo, Coahuila, México 2004. Cada valor representa la media de dieciséis plantas.

Hortalizas	ALT (cm)	NH	LR (cm)	PFT (g)	PFA (g)	PFR (g)	PST (g)	PSA (g)	PSR (g)
Acelga	57.39 b ^Z	14.81 d	33.53 ab	873.25 a	710.51 a	162.69 a	114.19 b	76.63 c	37.25 a
Coliflor	31.71 c	31.75 b	32.84 b	887.38 a	710.97 a	155.38 a	131.31 a	103.81 a	27.19 b
Brócoli	69.87 a	22.13 c	32.84 b	644.06 b	542.40 b	101.69 b	104.81 b	91.81 b	12.50 c
Repollo	17.36 d	40.38 a	37.99 a	650.25 b	547.62 b	102.50 b	63.69 c	50.81 d	12.50 c

^Z Valores con la misma letra dentro de columnas, son estadísticamente iguales de acuerdo a la prueba de Tukey a una $P \leq 0.05$.

ALT: Altura de planta; NH: Número de hojas; LR: Longitud de raíz; PFT: Peso fresco total; PFA: Peso fresco aéreo; PFR: Peso fresco de raíz; PST: Peso seco total; PSA: Peso seco aéreo; PSR: Peso de seco de raíz.

CUADRO 3. Efecto de aplicaciones foliares de los señalizadores del estrés: ácido salicílico (AS), ácido benzóico (AB), quitosán, (Q) y testigo (T), sobre parámetros fenotípicos de cuatro hortalizas en Saltillo, Coahuila, México 2004. Cada valor representa la media de dieciséis plantas.

Tratamiento	ALT (cm)	NH	LR (cm)	PFT (g)	PFA (g)	PFR (g)	PST (g)	PSA (g)	PSR (g)
AS 10 ⁻⁶ M	44.82 ^{NS}	23.81 b ^Z	33.53 a	700.19 b	583.85 b	116.38 c	91.50 c	72.94 c	18.25 b
AB 10 ⁻⁶ M	43.08 ^{NS}	32.00 a	32.84 a	832.50 a	688.70 a	143.75 a	113.63 a	88.06 a	25.00a
Q al 1 %	44.32 ^{NS}	24.75 b	32.78 a	741.69 b	614.41 ab	127.06 bc	99.25 bc	76.75 bc	22.19 ab
Testigo	44.10 ^{NS}	28.50 ab	37.99 a	780.56 a	645.54 ab	135.06 ab	109.63 ab	85.31 ab	24.00a

^Z Valores con la misma letra dentro de columnas, son estadísticamente iguales de acuerdo a la prueba de Tukey a una $P \leq 0.05$.

^{NS} Diferencias no significativas por columna.

ALT: Altura de planta; NH: Número de hojas; LR: Longitud de raíz; PFT: Peso de fresco total; PFA: Peso fresco aéreo; PFR: Peso fresco de raíz; PST: Peso de seco total; PSA: Peso seco aéreo; PSR: Peso de seco de raíz.

CONCLUSIONES

En base a los resultados de ésta investigación y bajo las condiciones en que se realizó, se concluye que la aplicación de los señalizadores del estrés provocan un efecto diferente en cada hortaliza: Las aplicaciones de ácido salicílico 10^{-6} M reducen el número de hojas, el peso fresco y peso seco en repollo, aumentan la capacidad antioxidante en acelga y la reducen en brócoli. Las aplicaciones de ácido benzoico 10^{-6} M aumentan el número de hojas y el peso fresco en repollo, aumentan el peso seco de raíz en acelga, disminuyen el peso fresco y peso seco de raíz en coliflor, y disminuyen la capacidad antioxidante en acelga y brócoli. Las aplicaciones de quitosán al 1 por ciento disminuyen el número de hojas y peso fresco y peso seco en repollo, disminuyen la capacidad antioxidante en brócoli y la aumentan en repollo.

LITERATURA CITADA

- Beecher, G. R. 1999. Overview of Dietary Flavonoids: Nomenclature, Occurrence and Intake. *Environ Health Perspect.* 107 Suppl 1:109-14.
- Benavides, M. A. 2002. *Ecofisiología y Bioquímica Del Estrés de las Plantas.* Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. pp. 193-195.
- Chen, I. C. H. Chang, H. C. H.; Yang, H. W.; Chen, G. L. 2004. Evaluation of Total Antioxidant Activity of Several Popular Vegetables and Chinese Herbs: A Fast Approach with ABTS/H₂O₂/HRP System in Microplates. *Journal of Food and Drug Analysis.* 12(1):29-33.
- Devasagayam, T. P.A.; Tilak, J. C.; Boldoor, K. K.; Sane, K. S.; Ghaskadbi, S. S.; Lele, R. D. 2004. Free Radicals and Antioxidants in Human Health: Current Status and Future Prospects. *JAPI* 52:794-804.
- De-Rosa, J. F. 1998. Estado actual de la terapéutica antioxidante: oxidación y antioxidación. *Rev Fed Arg Cardiol* 27: 496-498.
- Elejalde, J. I. G. 2001. Estrés oxidativo, enfermedades y tratamientos antioxidantes. *An. Med. Interna.* 18(6):326-335.
- FAO, 2003. Nuevo informe sobre dieta, nutrición y prevención de enfermedades crónicas. United Nations Food and Agriculture Organization (FAO). Rome.
- Guan, T. T.; Whiteman, M. 2005. Antioxidant Activities of Some Tropical Fruits. *Free Radical Biology and Medicine.* En prensa.
- Halliwell B.; Gutteridge J. 1990. The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch Biochem Biophys.* 280(1):1-8.
- Javanmardi, J.; Stushnoff, C.; Locke, E.; Vivanco, J.M. 2003. Antioxidant activity and total phenolic content of Iranian *Ocimum* accessions. *Food Chemistry* 83:547-550.

- Kalt, W; Kushad, M. M. 2000. The Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Plants and Human Health: Introduction to the Colloquium. *HortScience*. 35(4): 572.
- López-Delgado, H.; Dat, J.; Foyer, C.; Scott, I. 1998 Induction of thermotolerance in potato microplants by acetylsalicylic acid and H₂O₂. *J. Exp. Bot.* 49: 713-720.
- Meier D. O., Schlatter J. M. S, Frischknecht P. 1999. Selected phenolic compounds in cultivated plants: ecologic functions, health implications, and modulation by pesticides. *Environ Health Perspect.* 107 Suppl 1:109-14.
- Murillo, G. Mehta R.G. 2001. Cruciferous Vegetables and Cancer Prevention. *Nutrition and Cancer*. 41, (1,2): 17-28
- Oomah, B. D.; Mazza, G. 1999. Health benefits of phytochemicals from selected Canadian crops. *Trends Food Sci. Technol.* 10:1-6.
- Olson JA. 1999. Carotenoids and human health. *Arch Latinoam Nutr.* 49(3 Suppl 1):7S-11S.
- Pastori G. M.; Foyer, C. H. 2002. Common components, networks, and pathways of cross-tolerance to stress. The central role of “redox” and abscisic acid-mediated controls. *Plant Physiol.* 129:460-468.
- Prior, R. L.; Cao, G. 2000. Antioxidant Phytochemicals in Fruits and Vegetables: Diet and Health Implications. *Hortscience* 35(4):588-592.
- Prior, R.L., Wu, X., Beecher, G., Holden, J., Haytowitz, D., Gebhardt, S. E. 2004. Lipophilic And Hydrophilic Antioxidant Capacities Of Common Foods In The United States. *Journal of Agricultural And Food Chemistry.* 52(12):4026-4037.
- Raskin, I. 1992. Role of salicylic acid in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 43: 439-463.
- Rathke, T.D. and S.M. Hudson. 1994. Review of chitin and chitosan as fiber and film formers. *J.M.S. Rev. Macromol. Chem. Phys.* C34:375-437.
- Rodríguez, P. J. M; Mendez, L. J. R; Trujillo, Y. 2001. Radicales Libres en la Biomedicina y el Estrés Oxidativo. *Rev. Cubana Med Milit* 30(1): 36-44.

- Salvador, L.; Miranda, S. P.; Aragon, N; Lara, V. 1997. Recubrimiento de quitosán en aguacate. *Revista de la Sociedad Química de México*. 43(1):18-23.
- Sánchez-Moreno, C. 2002. Review: Methods Used to Evaluate the Free Radical Scavenging Activity in Foods and Biological Systems. *Food Sci Tech Int*. 8(3):121-137.
- Zhuang, D.; Quantick, C. 1997. Effects of chitosan coating on the enzymatic browning and assay during post-harvest storage of litchi fruit. *Post-harvest Biol. Technol*. 12:195-202.