



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

ESTUDIO DE LA SENESCENCIA POSTCOSECHA Y LA CALIDAD
NUTRICIONAL EN HOJAS DE KALE COSECHADAS EN
DISTINTOS ESTADIOS DE DESARROLLO

TRABAJO FINAL DE PROCESOS BIOTECNOLÓGICOS

ALEJANDRA GRICEL CAGLIARDI

Tutora: Estefanía Bernay

Directora: Victoria Casajús

AGRADECIMIENTOS

A Dios, a Jesús, al Espíritu Santo.

A mi mamá Edel Pierina Vega y mi papá Ricardo Daniel Cagliardi, que me apoyan incondicionalmente desde mis primeros segundos de vida.

A mi compañero de vida Geronimo Tactagi, que me banca en todas.

A mis hijos Ramiro y Gonzalo, mis amores, mis grandes maestros, mis motores.

A mi hermana Romina y mis hermanos Pablo, Bruno y German, sé que están, como sea y donde sea, pero están para todo. Mis cuñados Sabrina, Maxi y Lina.

A mis sobrinos Mateo, Celeste, Vera y Vytis. Son la alegría del alma.

A mis abuelos Victor, Ana, Ricardo y Elvira, A mis tíos Chachy, Sergio, Gustavo, Andre, Leo, Ricardo, Alicia, Clari, Dante, Toty. A mis primos Leo, Diego, Manu, Mati, Fran, Fede, Cande, Emi, Luchi, Naty, Herni. A mis suegros Ana María y Rodi.

A la Universidad Pública y Gratuita, profesores, jefes de trabajo práctico, ayudantes, no docentes, autoridades, al centro de estudiantes, buffet, bibliotecarios, los de la fotocopiadora, mis compañeros, los que hacen extensión. Sofi y Shir, mis tutoras. Rosana, Lau y las personas de ventanilla de alumnos. Al jurado Guido Mastrantonio y Matías Alegre.

Al Instituto de Fisiología Vegetal (INFIVE), por permitirme un lugar para realizar este trabajo.

A mi directora, mi Amiga, mi compañera Victoria Casajús. A mi tutora Estefy, a Romi, a Anto. Compañeros del INFIVE.

A mis amigas de siempre. Pame, Ailen, Dani, Flor, Mai, Agos, Marian, Anita. A mis amigos de toda la vida el Cuervo, Adri, Fran, Franquito, Dami, Mati, Juli, Nico. Mero.

A la Salud Pública y gratuita. Gracias a los doctores, enfermeros, y todo el personal que pasó por mi vida. A Male.

A mi comunidad de Santo Pedro y Pablo, a las monjitas Canossianas. A mis maestras de jardín, primaria, secundaria, compañeros de Refinería y petroquímica, compañeros de Y-TEC. Conocidos, vecinos, parientes, la colectividad Lituana.

Cada oración, cada pedido, cada favor, cada sonrisa regalada, cada palabra de aliento...

GRACIAS, GRACIAS, GRACIAS.

RESUMEN

El kale es una hortaliza de hoja verde perteneciente a la familia *Brassicaceae* ampliamente distribuida y consumida en todo el mundo, debido a su facilidad de cultivo, sus propiedades nutraceuticas y su alta capacidad antioxidante. La cosecha de las hojas de kale se puede realizar de manera manual, seleccionando las hojas externas y permitiendo continuar el crecimiento de la planta para sucesivas cosechas o cosechando la planta entera lo que incluye hojas en todos los estadios de desarrollo.

El objetivo del presente trabajo consistió en evaluar el efecto de la cosecha de hojas de kale en distintos estadios de desarrollo sobre la vida útil y la calidad nutricional de las hojas durante el almacenamiento postcosecha a 20 °C.

Para eso, se cosecharon hojas de kale en diferentes estadios de desarrollo: jóvenes, intermedias y maduras y se almacenaron durante seis días a 20 °C en oscuridad. En el día de la cosecha, y a los dos, cuatro y seis días de almacenamiento, se determinó el color superficial, la pérdida de peso, el contenido de fenoles y flavonoides totales, la capacidad antioxidante, azúcares totales y reductores, proteínas totales y solubles de las hojas jóvenes, intermedias y maduras. Asimismo, se midió la expresión de los genes asociados con el catabolismo de las clorofilas de estos tres estadios y en los mismos tiempos de muestreo.

El estadio de desarrollo de la hoja afectó la calidad visual, así como también el color superficial y el contenido de clorofilas. Las hojas jóvenes mostraron el mejor aspecto al finalizar el almacenamiento postcosecha, y en este tiempo no se encontraron diferencias en la pérdida de peso respecto a las hojas intermedias y maduras. Las hojas jóvenes exhibieron una menor tasa de degradación de la clorofila total, correspondiente a lo encontrado en la medida del color superficial; mientras que las hojas intermedias y maduras mostraron la mayor pérdida de contenido de clorofila y, por lo tanto, del color verde. Esto se vio reflejado en el análisis de la expresión de los genes de la vía de degradación de la clorofila, encontrando las mayores expresiones génicas en las hojas maduras e intermedias, mientras que las hojas jóvenes mantuvieron las menores expresiones génicas en todos los tiempos de muestreo.

Asimismo, se encontró un mayor contenido de fenoles y flavonoides totales, y la mayor capacidad antioxidante en las hojas jóvenes respecto a los otros estadios, tanto en el día de cosecha como durante el almacenamiento. Respecto al contenido de azúcares y proteínas, se encontró un mayor contenido de azúcares solubles y proteínas totales en las hojas jóvenes a lo largo del almacenamiento, correspondiente con un retraso en la senescencia postcosecha encontrado en este estadio.

El kale es un vegetal que proporciona una variedad de beneficios para la salud, y sus hojas senescen rápidamente a temperatura ambiente una vez que son cosechadas. Cosechar las hojas en un estadio de desarrollo joven podría ser una estrategia para extender la vida útil de este producto, así como también para consumir hojas con un mayor contenido de compuestos nutricionales.

ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN GENERAL	7
1.1 EL KALE	8
1.2 CICLO DE VIDA	9
1.3 VALOR NUTRICIONAL	9
1.4 PRODUCTIVIDAD	11
1.5 LA COSECHA	11
1.6 SENESCENCIA	12
1.7 PÉRDIDAS POSTCOSECHA	13
1.8 VIDA POSTCOSECHA DE KALE	14
2. OBJETIVOS	16
2.1 OBJETIVO GENERAL	17
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3. MATERIALES Y MÉTODOS	18
3.1 MATERIAL VEGETAL	19
3.2 TOMA DE MUESTRAS	20
3.3 PÉRDIDA DE PESO	20
3.4 COLOR SUPERFICIAL	20
3.5 CONTENIDO DE CLOROFILAS	21
3.6 EXTRACTOS ETANÓLICOS	22
3.7 CONTENIDO DE FENOLES TOTALES	22
3.8 CONTENIDO DE FLAVONOIDES TOTALES	23
3.9 CAPACIDAD ANTIOXIDANTE	23
3.9.1 MÉTODO ABTS	23
3.9.2 MÉTODO DPPH	24
3.10 CONTENIDO DE AZÚCARES	25
3.10.1 AZÚCARES TOTALES	25
3.10.2 AZÚCARES REDUCTORES	25
3.11 CONTENIDO DE PROTEÍNAS	26
3.11.1 PROTEÍNAS TOTALES	26
3.11.2 PROTEÍNAS SOLUBLES	26
3.12 EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL	26
3.13 CUANTIFICACIÓN E INTEGRIDAD DEL ARN TOTAL	27

3.14 PURIFICACIÓN DE ARN	28
3.15 SÍNTESIS DE ADN COMPLEMENTARIO	28
3.16 PCR A TIEMPO FINAL	29
3.17 DISEÑO DE PRIMERS PARA PCR REAL TIME	30
3.18 MEDIDA DE LA EXPRESIÓN GÉNICA	30
3.19 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	31
4. RESULTADOS	32
4.1 AVANCE DE LA SENESCENCIA	33
4.1.1 PÉRDIDA DE PESO	33
4.1.2 COLOR SUPERFICIAL	34
4.1.3 CONTENIDO DE CLOROFILAS TOTALES	35
4.2 COMPUESTOS CON CAPACIDAD ANTIOXIDANTE	37
4.2.1 FENOLES TOTALES	37
4.2.2 FLAVONOIDES TOTALES	38
4.2.3 CAPACIDAD ANTIOXIDANTE	39
4.3 CONTENIDO DE AZÚCARES	41
4.3.1 AZÚCARES TOTALES	41
4.3.2 AZÚCARES REDUCTORES	42
4.4 CONTENIDO DE PROTEÍNAS	43
4.4.1 PROTEÍNAS TOTALES	44
4.4.2 PROTEÍNAS SOLUBLES	45
4.5 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA	45
5. CONCLUSIONES GENERALES	50
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1 EL KALE

El kale (*Brassica oleracea* var. *sabellica*) es una hortaliza de hojas verdes, también conocido como col crespada o rizada, perteneciente a la familia *Brassicaceae*, al género *Brassica* y a la especie *B. oleracea* (Fahey, 2003, Raza et al., 2020). En las últimas décadas, el kale ha emergido como un protagonista destacado en el mundo de la alimentación saludable, ganando popularidad, tanto entre productores, vendedores, consumidores, así como en la comunidad culinaria. Este surgimiento ha sido impulsado en gran medida por la creciente conciencia sobre los beneficios nutricionales que ofrece esta hortaliza de hojas verdes, ya que es considerada un superalimento (Šamec et al., 2019). Dentro de esta familia, se encuentran otras hortalizas de gran valor agronómico y económico como son el repollo (*B. oleracea* var. *capitata*), coliflor (*B. oleracea* var. *botrytis*), brócoli (*B. oleracea* var. *italica*), nabo (*B. rapa* var. *rapa*), entre otras. Son hortalizas ricas en vitaminas, minerales y compuestos antioxidantes, y su consumo genera diversos beneficios para la salud humana, tales como la reducción del riesgo de enfermedades crónicas, y de diversos tipos de cáncer (Dragovic -Uzelac et al., 2009).

Morfológicamente, el kale tiene las hojas erectas de color verde a azul oscuro verdoso, muy rizadas, con bordes rugosos y ondulados y peciolo largo (Fig. 1.1). Esta planta alcanza entre los 30 cm y 40 cm de altura, aunque estas características varían dependiendo la variedad del kale.



Fig. 1.1: Morfología del cultivo de kale

1.2 CICLO DE VIDA

El desarrollo de la planta de kale sigue un ciclo de vida que involucra varias etapas, desde la siembra de las semillas hasta la cosecha de las hojas. La planta de kale comienza su ciclo de vida con la siembra de semillas en un sustrato adecuado, las semillas pueden ser sembradas directamente en el suelo o almácigo para los trasplantes posteriores. Después de la siembra, las semillas de kale germinan, y las plántulas emergen de la tierra. La planta de kale entra en una fase de crecimiento vegetativo, donde las hojas se expanden y la planta desarrolla una estructura de hojas más completa.

1.3 VALOR NUTRICIONAL

Las hortalizas de la familia *Brassicaceae* tienen un alto valor nutricional, en parte debido a la gran cantidad de compuestos antioxidantes que presentan como vitamina C, vitamina E, carotenoides, compuestos fenólicos, y flavonoides (Le et al., 2019). El kale es una excelente fuente de proteínas y minerales, como el potasio y una alta

biodisponibilidad del calcio (Satheesh y Fanta, 2020). Es además una excelente fuente de fibra (Tabla 1.1).

El kale es considerado un superalimento, por la abundancia de compuestos promotores de la salud o compuestos bioactivos. Estudios epidemiológicos han indicado que una dieta rica en vegetales de la familia *Brassicaceae* está asociada con una reducción en el riesgo de padecer distintos tipos de cáncer y enfermedades cardiovasculares. Estos beneficios para la salud se deben a la presencia de compuestos nutraceuticos como son los flavonoides y los glucosinolatos (Baladia, 2013, Faizal y Geelen, 2013), cuyos productos de hidrólisis tienen actividad anticancerígena ya que tienen la capacidad de inhibir determinadas enzimas del ciclo celular.

Tabla 1.1: Valor nutricional de kale cada 100 g de porción.

Fuente: <https://fdc.nal.usda.gov/fdc-app.html#/food-details/2345103/nutrients>

Energía	35 kcal	<i>Vitaminas</i>	
Agua	89,6 g	Vitamina C	93,4 mg
Proteína	2,92 g	Vitamina A	241 mg
Carbohidratos	4,42 g	Vitamina E	0,66 mg
Fibra	4,1 g	Vitamina K	390 mg
<i>Minerales</i>			
Ca	254 mg	Folato	62 mg
K	348 mg	Carotenos	2870 mg
Mg	32,7 mg	<i>Lípidos</i>	
Fe	1,6 mg	Total saturados	0,178 g
P	55 mg	Total monoinsaturados	0,104 g
Na	53 mg	Total poliinsaturados	0,673 g

La composición nutricional del kale puede variar ligeramente según la variedad específica y las diferentes condiciones precosecha, tales como los manejos de cultivo.

1.4 PRODUCTIVIDAD

La producción de kale aumentó significativamente de 3.994 a 6.256 hectáreas cosechadas en Estados Unidos (EE. UU.), en el período de 2007 a 2012 (USDA 2012). Asimismo, EE. UU. es el principal importador de esta hortaliza y se ha vuelto tan popular entre los consumidores de este país, que tiene un día nacional *Kale's day* (Šamec et al., 2019).

En Argentina, las principales variedades producidas son la col rizada verde y la col rizada morada. La mayor producción en nuestro país se realiza en el cinturón hortícola bonaerense y una parte menos en el cinturón marplatense. La información registrada por el Mercado Central (<http://mercadocentral.gob.ar>) indica que, en Argentina, el consumo de kale tiene una tendencia creciente desde el año 2017 hasta la actualidad, alcanzando unas 68 toneladas de producción en el año 2022. Aunque los ingresos al mercado siguen siendo bajos, estos han aumentado en aproximadamente un 400% en el último período.

1.5 LA COSECHA

Las hojas de kale son cosechadas entre cuatro a seis semanas después de ser trasplantadas, cuando alcanzan el tamaño y la textura deseada. Las hojas se pueden cosechar de manera selectiva, cosechando las hojas más externas y permitiendo que las partes centrales continúen creciendo para sucesivas cosechas. En otros casos se decide cosechar toda la planta, en las cuáles hojas con diferentes estadios de desarrollo quedan incluidos en la misma cosecha.

1.6 SENESCENCIA

En las plantas, el término senescencia se utiliza para aludir al deterioro estructural y funcional que sufren muchos órganos en la fase terminal de su desarrollo (Noodén, 1988a). Es un proceso altamente complejo y programado genéticamente, que sucede de manera ordenada y regulada y que se puede desencadenar por señales tanto externas como internas. La senescencia involucra una serie de cambios fisiológicos y bioquímicos que da como resultado la redistribución de nutrientes hacia los órganos en crecimiento como frutos y semillas (Noodén, 1988a). Más recientemente se ha definido el comienzo de la senescencia, al momento en que un tejido que anteriormente era un “destino” comienza a ser “fuente” dentro de la planta (Masclaux-Daubresse et al., 2017). Se ha mencionado que durante la etapa de senescencia ocurre la degradación de ácidos nucleicos, proteínas y, en el caso de tejidos verdes, clorofilas. Es un proceso controlado y regulado, en el cual las estructuras de las hojas pierden funcionalidad y se reciclan los nutrientes para ser removilizados entre los órganos de desarrollo, como hojas jóvenes, flores y granos. El patrón de senescencia natural de las plantas no siempre puede ser aplicable a productos cosechados, sin embargo, sí pueden existir similitudes (Pogson y Morris, 2004).

Una vez cosechada las hojas de kale, comienza la degradación de las clorofilas, característica de la senescencia foliar y por lo tanto la pérdida del color verde para comenzar el amarillamiento (Cantwell y Suslow, 2002; Ferrante et al., 2004). Las moléculas de clorofila (Clorofila *a* y *b*) se encuentran en las membranas tilacoidales dentro de los cloroplastos formando parte de los fotosistemas. Durante la senescencia, las membranas tilacoidales comienzan a ser desmanteladas y las moléculas de clorofilas degradadas. En plantas superiores, la clorofila *b* es primero convertida en clorofila *a* donde en pasos posteriores se degrada. Esta ruptura de la molécula es llevada a cabo por dos enzimas diferentes conocidas como clorofila *b* reductasa (CBR) e hidroximetil clorofila *a* reductasa (HCAR). Se ha descrito que CBR es codificada por dos genes, NON YELLOW COLORING1 (*NYC1*) y NYC1-LIKE (*NOL*) (Horie et al., 2009; Kusaba et al., 2007). Posteriormente, el magnesio de la clorofila *a* es removido por

STAY-GREEN (SGR) para obtener feofitina *a* que luego a través de la feofitinasasa (PPH) se convierte en feofórbido *a* resultando en catabolitos rojos de la clorofila (RCC) a través de PAO (Zhu et al., 2017) (Fig. 1.2).

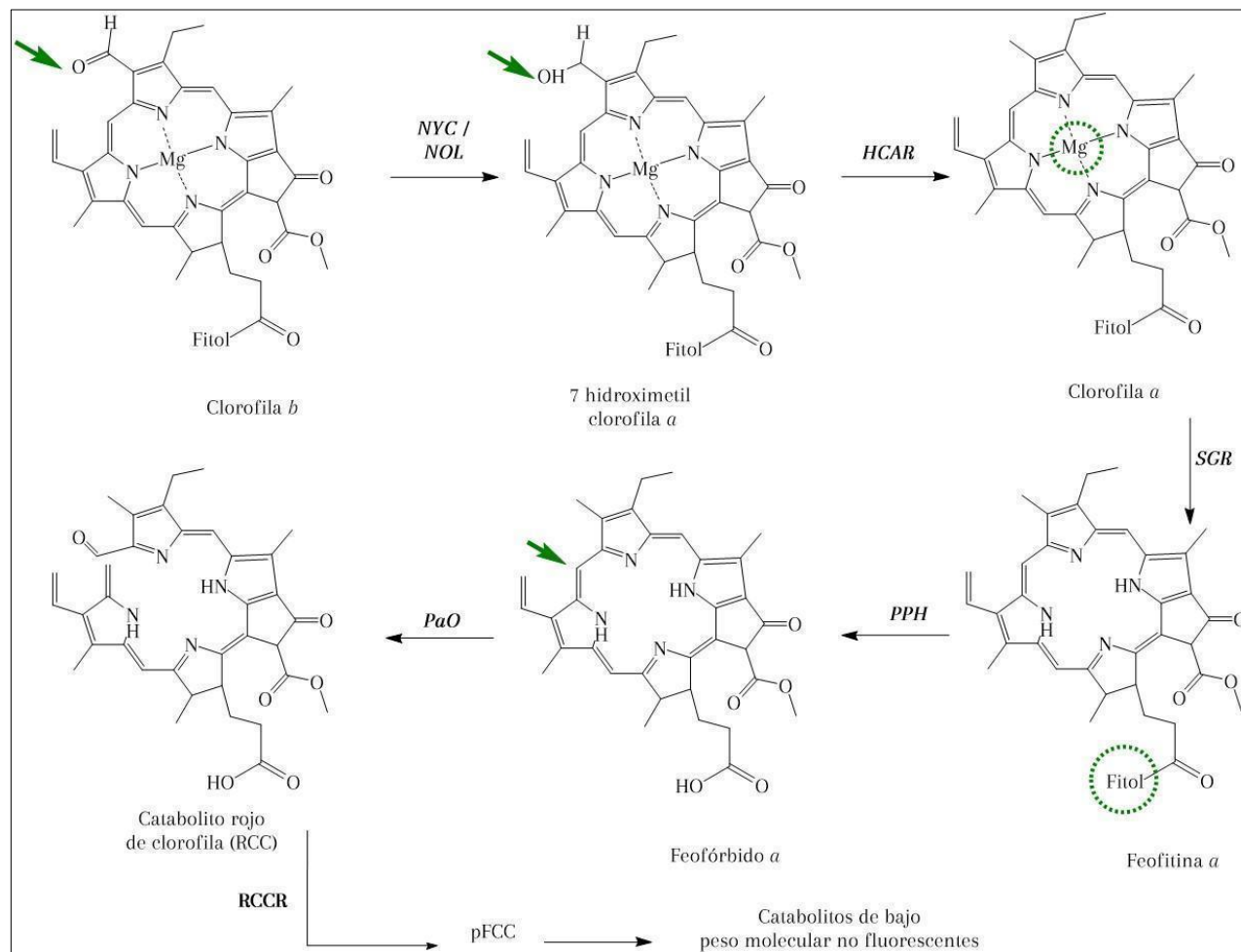


Figura 1.2: Vía de degradación de clorofila. Marcado en verde se indican los cambios que ocurren en la molécula en cada uno de los pasos.

1.7 PÉRDIDAS POSTCOSECHA

La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura o FAO por sus siglas en inglés *Food and Agriculture Organization*, define a la pérdida de alimentos como la disminución de la masa de alimentos comestibles en la parte de la cadena de suministro que conduce específicamente a los alimentos comestibles para el

consumo humano. Las pérdidas de alimentos constituyen una problemática mundial y tienen lugar en las etapas de producción, postcosecha y procesamiento de la cadena de suministro de alimentos (Parfitt et al., 2010). Se estima que un 13 % de los alimentos — el equivalente a 931 millones de toneladas o 120 kilogramos (kg) per cápita— se perdieron en 2021 en la cadena de suministro entre el momento posterior a su recolección y el de su llegada a las estanterías (FAO, 2023).

Las pérdidas de alimentos en los países industrializados son tan altas como en los países en desarrollo, pero hay que tener en cuenta que en los países en desarrollo más del 40 % de las pérdidas de alimentos se produce en las etapas de postcosecha y procesamiento, mientras que en los países industrializados más del 40 % de las pérdidas de alimentos se produce en la venta minorista y el consumo. Esta diferencia, probablemente se produce por un mayor desarrollo tecnológico en los países industrializados pero una mayor conciencia y aprovechamiento del consumidor en los países en vías de desarrollo.

Entre las estrategias para reducir la pérdida y el desperdicio de alimentos se pueden encontrar los ajustes en la producción, las mejoras tecnológicas en la manipulación postcosecha, mejorar las condiciones de almacenamiento y distribución; así como la difusión de información y los recordatorios de conducta para optimizar el consumo de alimentos, reducir el desperdicio alimentario y fomentar prácticas de economía circular (FAO, 2024). La búsqueda e investigación de diferentes estrategias postcosecha que permitan extender la vida útil de diferentes frutas y hortalizas tiene como objetivo principal contribuir a la disminución de la pérdida de alimentos.

1.8 VIDA POSTCOSECHA DE KALE

El almacenamiento y la calidad comercial de los productos cosechados dependen de la velocidad en el que se lleven a cabo los procesos de senescencia. Las hojas de kale tienen una corta vida postcosecha que se estima entre 7 – 10 días cuando son almacenadas a temperatura ambiente, dependiendo del cultivar, y otras condiciones (Pintos et al., 2023) pero incluso se produce un catabolismo extenso de la clorofila,

degradación de azúcares y pérdida de peso en pocos días (Sripong et al., 2018). Como la mayoría de las hortalizas de hojas verdes, la vida útil del kale puede ser ampliamente extendida cuando el almacenamiento es refrigerado. El kale es una hortaliza de hoja y con bordes sinuosos que posee una elevada relación superficie/volumen por lo que la tasa de transpiración es elevada (Lee et al., 2018). Una disminución de la tasa respiratoria produce la disminución de la pérdida del contenido de agua del producto, manteniendo la apariencia y la textura, y extendiendo la vida postcosecha de este producto. En estudios recientes, se ha demostrado que la aplicación de pulsos LEDs tanto blancos como rojos durante el almacenamiento postcosecha es una buena estrategia para retrasar la senescencia postcosecha de estas hojas (Bárcena et al., 2024).

Se conoce que son varios los factores precosecha que pueden influir en la calidad y la vida útil postcosecha de las frutas y hortalizas. Los factores precosecha para tener en cuenta, varían desde las condiciones medioambientales (temperatura, luz, irradiación UV, precipitaciones), prácticas agronómicas (fertilización, dosis de nitrógeno), el momento de la recolección y el índice de cosecha (Gil, 2015). Ha sido reportado que la cosecha del brócoli en distintos momentos del día afecta la vida útil de esta hortaliza, encontrándose que la cosecha en las últimas horas del día extiende la vida útil de este producto (Casajús et al., 2019). El estadio de desarrollo al momento de realizar la cosecha de diversas frutas y hortalizas es el factor principal que determina la vida útil y la calidad del producto cosechado (Elik et al., 2019). Definir el desarrollo ontogénico de la hoja en el momento de la cosecha es fundamental para determinar la vida útil y la calidad del producto.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la senescencia postcosecha y la calidad nutricional en hojas de kale cosechadas en distintos estadios de desarrollo.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Evaluar y comparar la senescencia postcosecha de hojas de kale con distintos estadios de desarrollo: jóvenes, intermedias y maduras.
- 2) Evaluar parámetros fisiológicos y de calidad nutricional en las hojas jóvenes, intermedias y maduras.
- 3) Analizar la expresión de genes involucrados en la vía de degradación de la clorofila en hojas de kale jóvenes, intermedias y maduras.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MATERIAL VEGETAL

Los cultivos de kale (*Brassica oleracea* var. *sabellica*) se realizaron según las prácticas convencionales en una producción local. Las hojas fueron cosechadas a primeras horas de la mañana y trasladadas inmediatamente al laboratorio para su posterior acondicionamiento. Se cosecharon hojas que se encontraban en distintos estadios de desarrollo: hojas jóvenes, intermedias y maduras. La ubicación en la planta y el tamaño de la hoja fueron los criterios aplicados para determinar el estadio de desarrollo (Fig 3.1).

- (1) Hojas jóvenes: internas – 20 cm
- (2) Hojas intermedias: posición central – entre 20 cm y 30 cm
- (3) Hojas maduras: externas - entre 35 cm y 40 cm



Figura 3.1: Clasificación de las hojas de kale según el estadio de desarrollo. Las hojas más internas y chicas son las hojas jóvenes, las hojas ubicadas en la posición central son aquellas llamadas intermedias y las hojas más externas y de mayor tamaño son las hojas maduras.

En el laboratorio, se colocaron dos hojas de kale por bandeja plástica perforada y se clasificaron según su estadio de desarrollo. Se almacenaron las hojas en oscuridad, a 20 °C y con un 90 – 95 % humedad relativa (HR) durante 6 días.

3.2 TOMA DE MUESTRAS

En el día de la cosecha (Día 0) y en los días 2, 4 y 6 de almacenamiento postcosecha a 20 °C se tomaron muestras de las hojas de los distintos estadios de desarrollo. Se registraron los pesos y el color superficial. Asimismo, las hojas se cortaron y se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido. Se almacenaron pulverizadas a – 20 °C para posteriores análisis.

3.3 PÉRDIDA DE PESO

Se registraron los pesos de las hojas al día 0 (peso inicial), 2, 4 y 6 de almacenamiento postcosecha. La pérdida de peso se calculó como:

$$\% \text{ pérdida de peso} = \left(\frac{\text{peso inicial} - \text{peso actual}}{\text{peso inicial}} \right) \times 100$$

3.4 COLOR SUPERFICIAL

Para la determinación del color superficial se utilizó un colorímetro (Minolta CR-400, Osaka, Japón), y se tomaron medidas en cuatro posiciones de cada una de las hojas, dos a cada lado de la nervadura central. Como se puede observar en la Figura 3.2 con el colorímetro se obtienen tres parámetros de un espacio de color llamado CIELAB: luminosidad (L^*) cuya escala va del 0 al 100, siendo 0 para el negro y 100 para el blanco; valor de a^* , que puede tomar valores positivos (rojos) o negativos (verdes) y valor de b^* cuyos valores positivos indican color amarillo y los negativos color azul. Como la senescencia del kale es evidenciada con la pérdida del color verde y la aparición del color amarillo, se utilizó el ángulo HUE, calculado de la siguiente manera:

$$HUE = \tan^{-1}\left(\frac{b}{a}\right) \quad \text{cuando } a \text{ y } b > 0$$

$$HUE = 180^\circ + \tan^{-1}\left(\frac{b}{a}\right) \quad \text{cuando } a < 0 \text{ y } b > 0$$

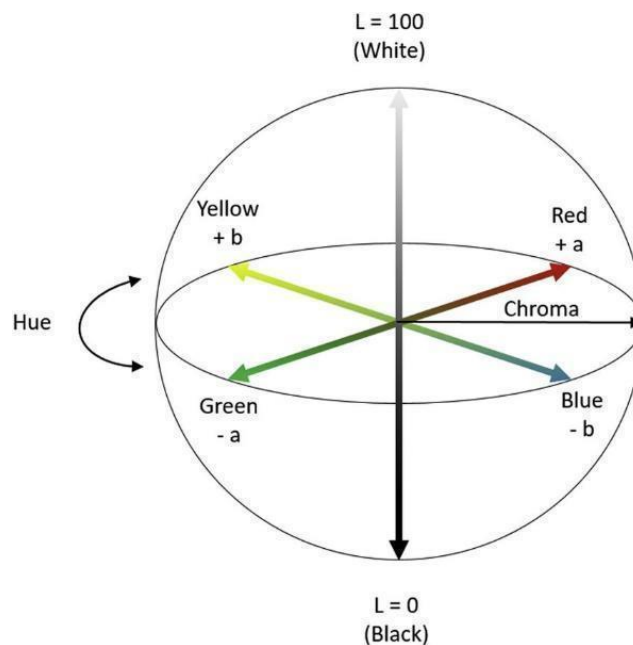


Figura 3.2: Representación esquemática del espacio de color CIELAB.

Adaptación de Ly et al., 2020.

3.5 CONTENIDO DE CLOROFILAS

Para determinar el contenido de clorofilas totales, se pesaron 20 mg del tejido pulverizado, se homogeneizaron en 2 mL de dimetilformamida (DMF) y se dejaron reposar durante toda la noche en oscuridad. Al día siguiente, los tubos se llevaron a la centrifuga durante 20 minutos a 12000 x g y se recuperaron los sobrenadantes en nuevos tubos. Se tomaron alícuotas de los mismos y se midieron las absorbancias a tres longitudes de onda: 664 nm, 647 nm y 480 nm. Para calcular el contenido de clorofila a, b y total se efectuaron los siguientes cálculos expresados como $\mu\text{g} / \text{mL}$ (Inskeep y Bloom, 1985):

$$\text{Clorofila } a = (12,7 \times A_{664}) - (2,79 \times A_{647})$$

$$\text{Clorofila } b = (20,7 \times A_{647}) - (4,62 \times A_{664})$$

$$\text{Clorofila total} = (8,08 \times A_{664}) + (17,9 \times A_{647})$$

Todas las medidas se realizaron por triplicado, y el contenido de clorofilas se expresó como mg por gr de tejido fresco.

La pérdida de clorofila se calculó como:

$$\% \text{ pérdida de clorofila} = \left(\frac{\text{clorofila inicial} - \text{clorofila final}}{\text{clorofila inicial}} \right) \times 100$$

3.6 EXTRACTOS ETANÓLICOS

Para la obtención de los extractos etanólicos, 200 mg de tejido pulverizado se mezclaron con 1 mL de etanol absoluto. La mezcla se homogeneizó y centrifugó durante 20 minutos a 12000 x g a 4 °C. Los sobrenadantes (Fig. 3.3) se utilizaron para medir el contenido de fenoles y flavonoides totales, capacidad antioxidante por el método ABTS y el método DPPH y azúcares totales y solubles.



Figura 3.3: Obtención de los extractos etanólicos de las hojas de kale. La obtención se realizó en los distintos tiempos de muestreo (día 0 - izquierda, 2, 4 y 6- derecha).

3.7 CONTENIDO DE FENOLES TOTALES

El contenido de fenoles totales se determinó mediante el método Folin-Ciocalteu según Costa et al., (2006) con algunas modificaciones. A 50 μ L del extracto etanólico se le añadieron 450 μ L de agua destilada y 100 μ L del reactivo de Folin-Ciocalteu (1:1 en agua destilada). Luego de 3 minutos, a la mezcla de reacción se le adicionó 500 μ L de

Na₂CO₃ 10% p/v, y se incubó en oscuridad durante 1 hora. Los tubos se centrifugaron a 12000 x g durante 10 minutos y se recuperaron los sobrenadantes. Se determinó la absorbancia a 760 nm y se estimó el contenido total de compuestos fenólicos utilizando ácido gálico como estándar. Este procedimiento se realizó por triplicado, tanto biológico como técnico y los resultados se expresaron como mg de equivalente de ácido gálico por gr de tejido fresco.

3.8 CONTENIDO DE FLAVONOIDES TOTALES

La determinación del contenido total de flavonoides se realizó mediante un método colorimétrico adaptado del protocolo descrito en Zhishen et al., (1999). Se realizó una mezcla de reacción conteniendo 100 µL del extracto etanólico, 610 µL de agua destilada y 30 µL de NaNO₂ 5% p/v. Luego de 5 minutos a temperatura ambiente, se añadieron 60 µL de AlCl₃ 10% p/v, se homogeneizó la mezcla y se incubó por otros 5 minutos. Finalmente, se añadieron 200 µL de NaOH 1M, se homogeneizaron nuevamente las muestras y se realizó la determinación de absorbancia a 515 nm. Para la estimación del contenido de flavonoides se construyó una curva de calibración utilizando catequina como estándar. Los resultados se expresaron como mg de equivalente de catequina por gr de tejido fresco.

3.9 CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

3.9.1 MÉTODO ABTS

La capacidad antioxidante contra 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónicoácido) radical catiónico (ABTS^{•+}) se midió de acuerdo con Arnao et al. (2001). Se preparó una mezcla de ABTS^{•+} 7 mM y 2,45 mM de persulfato de potasio (K₂S₂O₈) en agua y se incubó de 12 a 16 horas en la oscuridad. Esta solución se diluyó 1:70 v/v para obtener una absorbancia de 0,7 a 734 nm en un lector de placas. Un volumen de 100 µl del extracto etanólico se mezcló con 1 mL de la dilución 1:70 del ABTS^{•+} y se midió la absorbancia a 734 nm. Se utilizó Trolox como estándar y los resultados se expresaron

como mg de equivalente de Trolox por kg de tejido fresco.

3.9.2 MÉTODO DPPH

El método de captación del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) se realizó según el protocolo descrito en Brand Williams et al., 1995, consistió en preparar una solución de concentración 40 mg/L de DPPH en etanol e incubarla 1 hora en oscuridad con agitación.

Para la medida se agregaron distintas cantidades de extracto etanólico: 0, 50, 75, 100, 200 μ l y se agregó 1 mL de dilución de DPPH (1:8 v/v) cuya absorbancia fue igual a la unidad en el blanco. Todas las muestras se llevaron a un volumen final 1,2 mL, se dejaron en reposo 90 minutos en oscuridad y se midieron las absorbancias a 515 nm. Con los valores de las absorbancias obtenidas se determina el porcentaje de captación de radicales libres (DPPH), mediante el siguiente cálculo:

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{\text{Abs Blanco} - \text{Abs muestra}}{\text{Abs Blanco}} \times 100$$

El %DPPH remanente se calculó como:

$$\% \text{ DPPH rem} = \frac{\text{Abs muestra}}{\text{Abs Blanco}} \times 100$$

El % de DPPH remanente es inversamente proporcional a la carga de antioxidantes en el extracto. Se denomina EC50 a la concentración de extracto que causa la disminución del 50% en la concentración inicial de DPPH y se determina a partir de la gráfica del porcentaje de inhibición, expresándose como poder antioxidante como EC50⁻¹.

3.10 CONTENIDO DE AZÚCARES

3.10.1 AZÚCARES TOTALES

Los azúcares totales se determinaron utilizando el reactivo de antrona según Costa et al. (2006) con algunas modificaciones. Un volumen de 100 μl de una dilución 1:4 v/v de los extractos etanólicos se mezcló con 1 mL de reactivo de antrona ($0,075 \text{ g.L}^{-1}$ de antrona disuelta en 150 ml de H_2SO_4 98%). La mezcla se calentó durante 12 minutos a 100°C y se dejó enfriar por 20 minutos en oscuridad. La absorbancia se midió a 625 nm (ClarioStar, BMGLABTECH). Se utilizó glucosa como patrón y los resultados se expresaron como g de glucosa por kg de tejido fresco.

3.10.2 AZÚCARES REDUCTORES

La determinación de azúcares reductores se realizó con el método Somogyi–Nelson (Somogyi, 1945) usando una dilución 1:6 v/v de los extractos etanólicos. Un volumen de 250 μl del extracto diluido se mezcló con 250 μl de reactivo de Cu_2SO_4 . El reactivo de Cu_2SO_4 se preparó disolviendo 28 g de Na_2HPO_4 anhidro y 4 g de tartrato de sodio y potasio en aproximadamente 700 mL de agua, se agregaron 100 mL de NaOH 1 N agitando, y luego 80 mL de CuSO_4 10 % (p/v). Una vez lograda la disolución de los reactivos se agregaron 180 g de Na_2SO_4 anhidro y se llevó a volumen de 1 L.

Una vez mezclados la dilución del extracto etanólico con el reactivo de cobre, se llevó a ebullición durante 10 min. Posteriormente, se adicionaron 125 μl de reactivo de arsenomolibdato y 625 μl de agua destilada. El reactivo de arsenomolibdato se preparó disolviendo 25 g de molibdato de amonio en 450 mL de agua y se agregaron 21 mL de H_2SO_4 98 % (p/p), luego se añadieron 3 g de $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ disueltos en 25 mL de agua destilada, y se incubó toda la mezcla a 37°C por 24-48 hs.

Una vez mezclados con el reactivo de arsenomolibdato y agua, los tubos se incubaron durante 30 minutos en oscuridad y a temperatura ambiente. Se midió la absorbancia a 520 nm. Se utilizó glucosa como patrón y los resultados se expresaron como g de glucosa por kg de tejido fresco.

3.11 CONTENIDO DE PROTEÍNAS

3.11.1 PROTEÍNAS TOTALES

Para determinar el contenido de proteínas totales, se utilizaron 300 mg del pulverizado, homogeneizado con 10 mL de una solución 0.1 mM NaOH y 10 g.L⁻¹ de dodecil sulfato sódico (SDS). La mezcla se llevó a 100 °C durante 10 minutos y se centrifugó a 10000 × g durante 40 minutos a 4 °C para recuperar los sobrenadantes. Con el fin de precipitar proteínas, a la mezcla se le adicionaron cinco volúmenes de acetona y se incubó a 20 °C durante 12 horas. Pasado este tiempo, los tubos se centrifugaron a 13000 × g durante 10 minutos a 4 °C. El precipitado obtenido se resuspendió en 200 µl de una solución 0,1 mM NaOH y el contenido de proteínas totales se midió con el método de Lowry (1951) usando albúmina sérica bovina como estándar. Los resultados se expresaron como mg de albúmina por g de tejido fresco.

3.11.2 PROTEÍNAS SOLUBLES

Para determinar el contenido de proteínas solubles, se pesaron 500 mg de las muestras pulverizadas y se mezclaron con 5 mL de una solución buffer (50 mM Tris-HCl, 0.4 mL.L⁻¹ β-mercaptoetanol y 2 mM ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), pH= 7,5). La mezcla se centrifugó a 10000 × g durante 10 minutos a 4 °C y el contenido de proteínas solubles se determinó en el sobrenadante usando el método de Bradford (1976). Se utilizó albúmina sérica como estándar y los resultados se expresaron como mg de albúmina por g de tejido fresco.

3.12 EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL

El ARN total de las muestras de kale, se obtuvo utilizando el método del TRIzol (Sigma-Aldrich) con modificaciones, tal como se detalla a continuación. Para comenzar, se trituraron 100 mg de tejido congelado con nitrógeno líquido, y se mezclaron con 1 mL del reactivo de TRIzol. Los homogenados resultantes se incubaron por 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se adicionaron 200 µl de cloroformo a cada

tubo y se homogeneizó con vórtex por 15 segundos, se centrifugaron los tubos a 12000 x g durante 20 minutos a 4 °C. Se recuperaron los sobrenadantes y se repitió el agregado de 200 µl de cloroformo, se centrifugó y se recuperó nuevamente el sobrenadante. Se adicionaron 500 µl de isopropanol frío, se agitaron los tubos por inversión y se dejaron reposar los tubos durante 10 minutos a temperatura ambiente. Las muestras se centrifugaron a 20000 x g durante 20 minutos a 4 °C y se descartaron los sobrenadantes. Los precipitados obtenidos se lavaron con 1 mL de etanol 70%. Se centrifugaron nuevamente a 12000 x g durante 10 minutos a 4 °C y los precipitados se resuspendieron en 90 µl de agua dietil pirocarbonato (DEPC), 10 µl de acetato de sodio 3M (pH 6.00) y 250 µl de etanol 100% frío. Los tubos se enfriaron a – 20 °C durante una hora. Se centrifugaron las muestras por 20 minutos a 12000 x g a 4°C, posteriormente, se lavaron los precipitados con 1 mL de etanol al 70% y se secaron durante 5 minutos en flujo laminar. Para finalizar, se resuspendieron en 30 µl de agua DEPC y se almacenaron a - 80 °C hasta su posterior uso.

3.13 CUANTIFICACIÓN E INTEGRIDAD DEL ARN TOTAL

Para constatar la integridad de los ARN obtenidos, las muestras de ARN total fueron visualizadas directamente en geles de electroforesis de agarosa 1,5% con el fin de observar bandas discretas y definidas, correspondientes a las subunidades mayor y menor de los ARN ribosomales.

Para la preparación de las muestras, diluciones 1:5 se incubaron a 65 °C durante 10 minutos y se agregaron 2 µL del colorante de frente de corrida Orange G. Una vez sembradas en el gel de agarosa, se realizó la electroforesis a voltaje constante (70 V durante 40 minutos) en buffer de corrida TBE 1x(Tris-Borato-EDTA), visualizando las bandas con un transiluminador UV y adquisidor de imágenes. Las soluciones de ARN obtenidas se lograron cuantificar utilizando un lector de microplacas (CLARIOstar, BMG LABTECH) y las concentraciones de los ARN se determinaron utilizando el siguiente cálculo:

$$\text{Concentración de ARN (ng/}\mu\text{l)} = (A_{260} \times 40 \times \text{dil}^{-1})$$

Donde dil es la dilución de los ARN en agua DEPC, en este caso se utilizaron diluciones 1:5 v/v. Se empleó la relación de absorbancias A260/A280 para constatar la pureza de los ARN extraídos.

3.14 PURIFICACIÓN DE ARN

Para purificar el ARN obtenido, se utilizó 1 unidad enzimática de Q1ADNasa ($1 \text{ U} \cdot \mu\text{l}^{-1}$) y se llevaron las soluciones a un volumen final de 10 μl con el agregado de agua Milli-Q. Las muestras se incubaron a 37 °C durante 30 minutos. Terminada la incubación, en cada tubo, se agregaron 90 μl de agua Milli-Q y 100 μl de una mezcla de cloroformo-octanol (24:1 v/v). Se centrifugaron los tubos durante 10 minutos a 12000 x g y se recuperaron las fases acuosas. En los nuevos tubos, se agregaron 200 μl de etanol absoluto frío y 20 μl de NaAc 3 M (pH 6.00). Los ARN se precipitaron durante 1 hora a -80 °C. Pasado este tiempo, se centrifugaron por 20 minutos a 12000 g a 4 °C y se descartaron los sobrenadantes. Los precipitados se lavaron con 200 μl de etanol 70% y se centrifugaron y descartaron los sobrenadantes nuevamente, finalmente se secaron las muestras al vacío. Se resuspendieron los precipitados obtenidos en 15 μl de agua Milli-Q tratada previamente con DEPC 0,1 % v/v. Se determinó la concentración y se corroboró la integridad de los ARN purificados y se almacenaron los tubos a -80 °C hasta su uso.

3.15 SÍNTESIS DE ADN COMPLEMENTARIO

Se utilizaron 2 μg de las muestras de ARN previamente purificadas para la obtención del ADN complementario (ADNc) utilizando la enzima M-MLV RT (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase).

Los 2 μg de ARN previamente purificados, se completaron con el volumen necesario de agua Milli-Q, hasta un volumen final de 18,55 μl . Estas soluciones se calentaron durante 10 min a 70 °C, se colocaron en hielo durante 5 minutos y finalmente se dejaron

10 minutos a temperatura ambiente. En cada uno de los tubos se dispensaron 6,45 μ l de una mix de reacción que contenía por tubo 5 μ l de buffer de reacción 5x (adjunto con la M-MLV), 0,3 μ l de dNTPs (10 mM), 0,15 μ l de solución de Random Primers (2 μ g/ μ l) y 1 μ l de enzima M-MLV. Las mezclas se incubaron a 37 °C durante 90 minutos, y luego a 95 °C durante 5 minutos, para la inactivación de la retrotranscriptasa.

3.16 PCR A TIEMPO FINAL

Para chequear el correcto funcionamiento de la reacción de retrotranscripción, se llevó a cabo una PCR a tiempo final utilizando 0,5 μ l del molde obtenido y 19,5 μ l de la siguiente mezcla de reacción tal como se muestra en la Tabla 3.1, hasta alcanzar un volumen final de 20 μ l.

Tabla 3.1: Mezcla de reacción para PCR a tiempo final. Volumen final de 20 μ L.

Reactivo	Vol (μl)	Concentración final
Buffer 10x	2	1x
MgCl ₂ (25 mM)	1,2	1,5 mM
Fw BoAct (10 μ M)	1	0,5 μ M
Rv BoAct (10 μ M)	1	0,5 μ M
dNTPs (10mM)	0,4	0,2 mM
TAQ Pegasus (5 U/ μ l)	0,2	0,04 U/ μ l
H ₂ O	13,7	c.s.p 20

El programa de ciclado constó de una desnaturalización inicial de 2 minutos a 94 °C como etapa inicial de desnaturalización, 30 ciclos de 15 segundos a 92 °C, 25 segundos a 60 °C y 30 segundos 72 °C, y una etapa de elongación final de 5 minutos a 72 °C. Los

fragmentos amplificados por PCR se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa 1,5 % en buffer TBE en presencia de bromuro de etidio.

3.17 DISEÑO DE PRIMERS PARA PCR REAL TIME

Se diseñaron primers para la amplificación mediante PCR en tiempo real de genes involucrados en la vía de degradación de clorofilas: *NYC*, *NOL*, *PAO*, *PPH*, *SGR*. Para el diseño de los primers se utilizó la base de datos de *Brassica oleracea* BRAD (Chen et al., 2022) y la información de diferentes herramientas que brinda la base de datos *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Se realizó una PCR a punto final utilizando como molde ADNc con todos los primers diseñados para constatar la obtención de un único producto de amplificación y con el tamaño diseñado. En la Tabla 3.2, se muestran las secuencias de los primers forward y reverse, el tamaño del amplicón, expresado en pares de bases (pb).

Tabla 3.2: Listado de los primers Forward (Fw) y Reverse (Rv) diseñados para las reacciones de PCR a tiempo final y PCR en tiempo real.

Gen	Forward (Fw)	Reverse (Rv)	Tamaño (pb)
<i>NYC</i>	TTACATCTCGCAGTTCTGA	GCAATACCAACTACCTTAGC	130
<i>NOL</i>	ATGGCGGGGAAGGAGGACAGTGA	GGCGACGGTTGGGGAGGTGATTTA	159
<i>PAO</i>	CTCTTCTTCCTCTTCCTTC	GACCCTTCTTCTTCCTTATC	315
<i>PPH</i>	AGAGGTTATCGGTGAGCCA	GACGAGATGAGGATGGG	91
<i>SGR</i>	TTCCGACAACCGAAGTAA	GTGAGCGTATAAGTTCTTGG	198
<i>CHI</i>	AAATGGCGTCTCTTCTGGGA	GCCTGAAGCAAATGGGAGAG	111
<i>ACT</i>	CCAGAGGTCTTGTTCAGCCATC	GTTCCACCACTGAGCACAATGTTAG	137

3.18 MEDIDA DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

Se realizaron reacciones de comparación relativa de PCR en tiempo real (RT-qPCR) utilizando SYBR Green I como método de detección, un equipo StepOnePlus™ Real-

Time PCR System (Applied biosystems) y el kit FastStart Universal SYBR Green Master (Roche). Se siguieron las condiciones propuestas por el fabricante del kit, mezclando 5 μ l de Master Mix, 1 μ l ADNc molde, el volumen de primers para alcanzar la concentración final en la amplificación de cada gen en particular y agua Milli-Q hasta alcanzar un volumen final de 10 μ l. Como se mostró en la Tabla 3.2, se utilizó el gen de actina de *Brassica oleracea* como gen normalizador. El programa térmico utilizado para todos los ensayos fue el siguiente: una desnaturalización inicial a 95 °C durante 10 minutos, y 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C y de 1 minuto a 60 °C. Al final de cada programa se agregó el siguiente perfil térmico para obtener una curva de disociación (curva de *melting*) con el fin de evaluar que el producto de amplificación haya sido único: 95 °C por 1 minuto; 55 °C por 30 segundos; 95 °C por 30 segundos. En cada medida de RT-qPCR cada muestra de ADNc se colocó por triplicado y cada medida se realizó al menos por triplicado y se incluyeron controles negativos sin molde. Los resultados de la expresión se analizaron con el método de $2^{-\Delta\Delta CT}$.

3.19 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para la comparación de las hojas de kale en distintos estadios de desarrollo y el tiempo de almacenamiento, se aplicó un análisis de la varianza de un factor (ANOVA). El supuesto de normalidad de los errores se estudió mediante la prueba de Shapiro-Wilk y la homocedasticidad mediante la prueba de Barlett ($p \leq 0,05$). Dado que en ciertos tiempos de almacenamiento de ciertos estadios de desarrollo no se cumplió este último supuesto, se efectuó un modelado de varianza utilizando la función `varIdent` de la librería “nlme”. Las comparaciones entre los grupos se efectuaron utilizando el método de LSD de Fisher y todos los análisis se efectuaron con el *software* R versión 4.3.2 (R Core Team). Las diferentes letras mayúsculas significan que se encontraron diferencias significativas con un nivel de significancia de 95% ($\alpha \leq 0,05$) y el * representa diferencias significativas con un nivel de significancia de 90% ($\alpha \leq 0,1$).

4. RESULTADOS

4.1 AVANCE DE LA SENESCENCIA

El avance de la senescencia postcosecha de las hojas de kale fue analizado mediante el aspecto visual (Fig. 4.1) y midiendo la pérdida de peso, el color superficial y el contenido de clorofilas totales.



Figura 4.1: Aspecto de hojas jóvenes, intermedias y maduras. Las hojas fueron almacenadas a 20 °C en oscuridad durante seis días.

4.1.1 PÉRDIDA DE PESO

Se registró un aumento en el porcentaje de pérdida de peso de las hojas en todos los estadios de desarrollo durante el almacenamiento postcosecha, lo cual se correlaciona con la pérdida de agua debido al elevado metabolismo respiratorio de este producto. Como se puede observar en la Tabla 4.1, en los días 2 y 4 de almacenamiento

postcosecha, se encontró un mayor porcentaje de pérdida de peso en las hojas jóvenes respecto a las intermedias. Ha sido previamente reportado, en estadios jóvenes de hojas de kale (Albornoz y Cantwell, 2016) y rúcula (Koukounaras et al., 2007) presentan mayores tasas respiratorias que en los estadios intermedios y maduros; y esto se debe probablemente que al poseer tejidos que aún se encuentran en un estado de desarrollo, poseen un metabolismo más activo de las hojas jóvenes. En el día 6 no se encontraron diferencias significativas en la pérdida de peso entre los tres estadios con valores finales de pérdida de peso de las hojas aproximados al 16%.

Tabla 4.1: Porcentaje de pérdida de peso en hojas jóvenes, intermedias y maduras. El porcentaje fue determinado trascurrido dos (% Día 2), cuatro (% Día 4) y seis días (% Día 6) de almacenamiento postcosecha a 20 °C.

	% Día 2	% Día 4	% Día 6
Hojas Jóvenes	5,36 ± 0,30 B	9,99 ± 0,21 B	16,1 ± 0,21 A
Hojas Intermedias	4,69 ± 0,19 A	8,91 ± 0,40 A	15,5 ± 0,65 A
Hojas Maduras	4,85 ± 0,19 AB	9,52 ± 0,22 AB	16,6 ± 0,60 A

4.1.2 COLOR SUPERFICIAL

En las hojas de todos los estadios, una disminución significativa en el ángulo HUE fue observada durante el almacenamiento postcosecha a 20 °C, las hojas perdieron su color verde para tornarse amarillas, síntoma característico de la senescencia foliar.

En el día de la cosecha (día 0) se observaron diferencias entre los valores del ángulo HUE entre los distintos estadios, siendo las hojas jóvenes las que tenían los menores valores y las intermedias los mayores; correspondido con lo que se encontró en el contenido de clorofilas totales. Por otra parte, como se observa en la Figura 4.2, la disminución del ángulo HUE durante el almacenamiento es mucho menos pronunciada en las hojas jóvenes respecto a los estadios más maduros; alcanzando hacia el final del

almacenamiento (Día 4 y Día 6) valores de HUE más altos que las hojas intermedias y maduras lo cual se correlaciona con lo observado en la Figura 4.1. Se ha reportado un mayor deterioro y decoloración en hojas de kale sobremaduras durante el almacenamiento postcosecha en refrigeración respecto a las hojas cosechadas en un estadio intermedio y joven (Albornoz y Cantwell,2016).

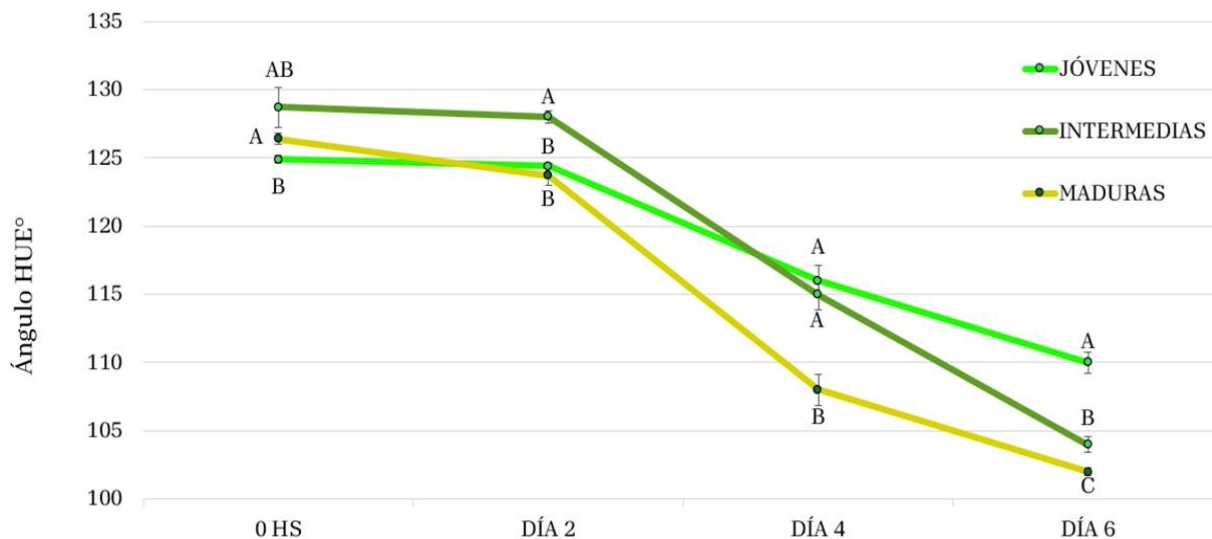


Figura 4.2: Color superficial (ángulo HUE) en hojas. Se determinó en las hojas jóvenes (verde claro), intermedias (verde oscuro) y maduras (amarillo) en el día de cosecha (0 HS) y al día 2, 4 y 6 de almacenamiento postcosecha a 20 °C.

4.1.3 CONTENIDO DE CLOROFILAS TOTALES

En la Figura 4.3 se muestran los valores del contenido de clorofilas en las hojas de kale durante el almacenamiento. En el día de la cosecha (0 Hs), se encontraron los mayores valores de clorofilas totales en las hojas intermedias, y los menores valores en las hojas jóvenes. El estadio joven es un estado de desarrollo que contiene tejidos inmaduros, que se encuentran metabólicamente activos y en el cual se continúan sintetizando y desarrollando las estructuras fotosintéticas tales como los cloroplastos y esto podría explicar el menor contenido de clorofilas totales y por lo tanto valores menores del ángulo HUE cuando se realizó la cosecha.

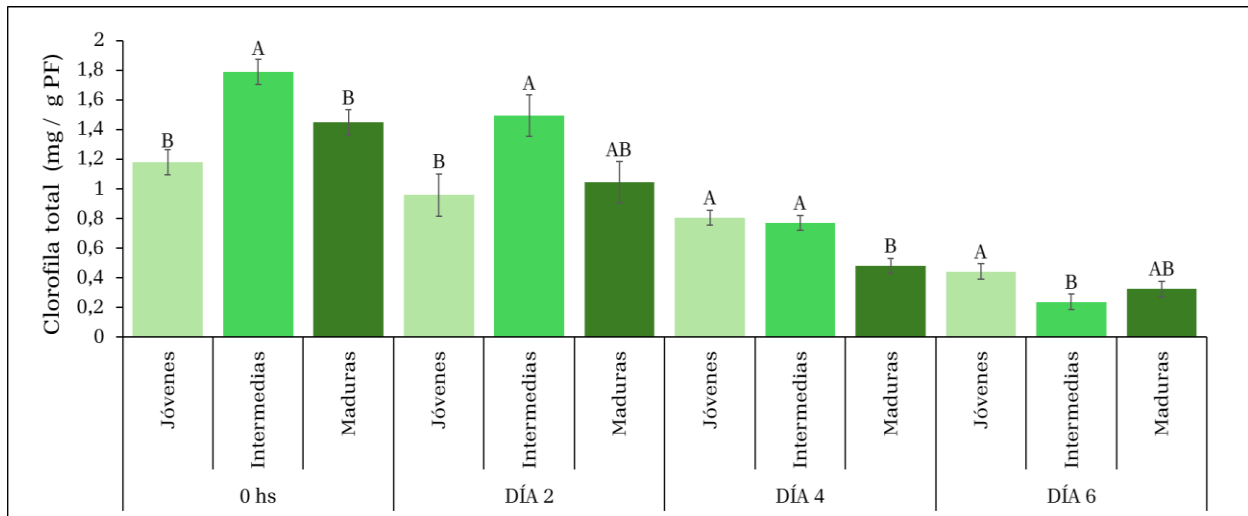


Figura 4.3: Contenido de clorofilas totales. El contenido de clorofilas totales se expresa como (mg clorofilas por gramo de peso fresco) en las hojas jóvenes, intermedias y maduras en el día de cosecha (0 hs) y en los días 2, 4 y 6 de almacenamiento postcosecha a 20 °C.

A lo largo del almacenamiento postcosecha, las muestras cosechadas en un estadio de desarrollo joven presentan una menor tasa de degradación de las clorofilas respecto a las hojas cosechadas en los otros estadios (Tabla 4.2), lo cual se correlaciona con lo descripto anteriormente con el color superficial.

Tabla 4.2: Porcentaje de pérdida de clorofilas totales. El porcentaje fue determinado transcurrido dos días (% Día 2), cuatro días (% Día 4) y seis días (% Día 6) de almacenamiento postcosecha a 20 °C en hojas jóvenes, intermedias y maduras.

	Día 2	Día 4	Día 6
Hojas Jóvenes	18,87 A	31,75 A	65,56 A
Hojas Intermedias	16,48 A	56,99 B	86,72 B
Hojas Maduras	31,71 B	68,62 B	78,83 AB

4.2 COMPUESTOS CON CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

4.2.1 FENOLES TOTALES

Los vegetales pertenecientes a la familia *Brassicaceae* tienen gran cantidad de compuestos con capacidad antioxidante, tales como ácido ascórbico, carotenoides, y compuestos fenólicos. Es conocido que el consumo de hortalizas con buenas proporciones de este tipo de compuestos resulta benéfico para la salud humana, ya que estos metabolitos actúan en la prevención de varias enfermedades tales como cáncer, y enfermedades gastrointestinales y cardíacas (Fernández-León et al. 2013, Duarte-Sierra et al. 2019). En este trabajo, se midió el contenido de fenoles totales en el almacenamiento postcosecha de hojas cosechadas en distintos estadios de desarrollo.

Se puede observar que las hojas jóvenes presentan mayores concentraciones de estos compuestos respecto a los otros estadios en el día de la cosecha y durante todo el almacenamiento postcosecha. A su vez, en los días 4 y 6 el contenido de fenoles de las hojas intermedias es mayor que el de las hojas maduras (Fig. 4.4). Hacia el final del almacenamiento, las hojas maduras poseen alrededor de la mitad del contenido de fenoles totales respecto del momento de cosecha.

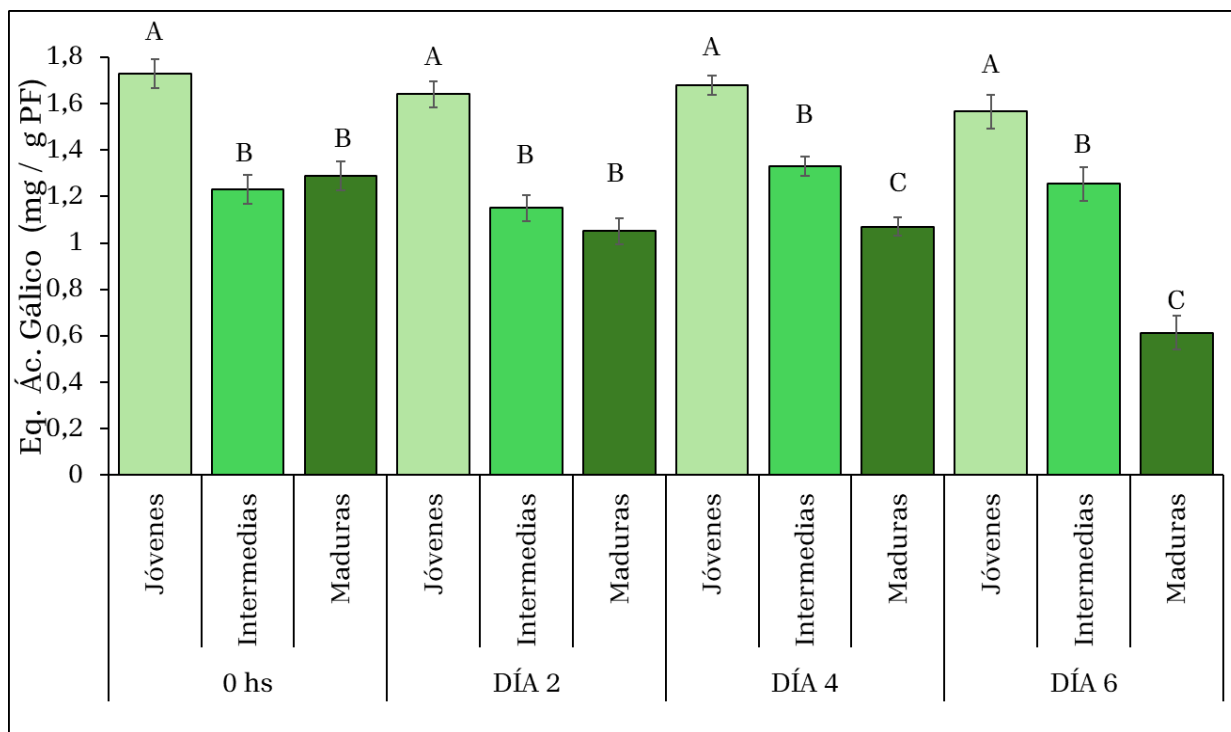


Figura 4.4: Contenido de fenoles totales. El contenido se expresa como (mg ácido gálico por gramo de peso fresco) y fue medido en las hojas jóvenes, intermedias y maduras en el día de cosecha (día 0) y al día 2, 4 y 6 de almacenamiento postcosecha a 20 °C.

Como es sabido, la concentración y el perfil de los compuestos fenólicos dependen de factores genéticos, así como de condiciones medioambientales, incluyendo factores bióticos como la herbivoría y abióticos como la luz, la temperatura, la fertilización, entre otros (Cartea et al., 2008). El estado ontológico de la hoja pareciera ser otro factor que influye en el contenido de fenoles totales.

4.2.2 FLAVONOIDES TOTALES

Los flavonoides forman un grupo representativo de productos secundarios de las plantas y están ampliamente distribuidos en el reino vegetal (Saito et al., 2013). Su inclusión en la dieta aporta varios beneficios a la salud, entre los cuales se destacan su actividad como compuestos antioxidantes y antiinflamatorios (Kumar y Goel, 2019). En este trabajo se midió el contenido de flavonoides totales en las hojas con distintos estadios de desarrollo, durante el almacenamiento postcosecha.

En el día de cosecha (Fig. 4.5), el mayor contenido de flavonoides totales se encontró en las hojas de estadio joven. En general, se detectó un descenso en el contenido de flavonoides durante el almacenamiento en las hojas de todos los estadios. Al día 2 y día 4 de almacenamiento, tanto las hojas jóvenes como las intermedias presentan niveles significativamente más altos, respecto a las hojas del estadio maduro. Hacia el final del almacenamiento (día 6), no se encuentran diferencias significativas en los tres estadios.

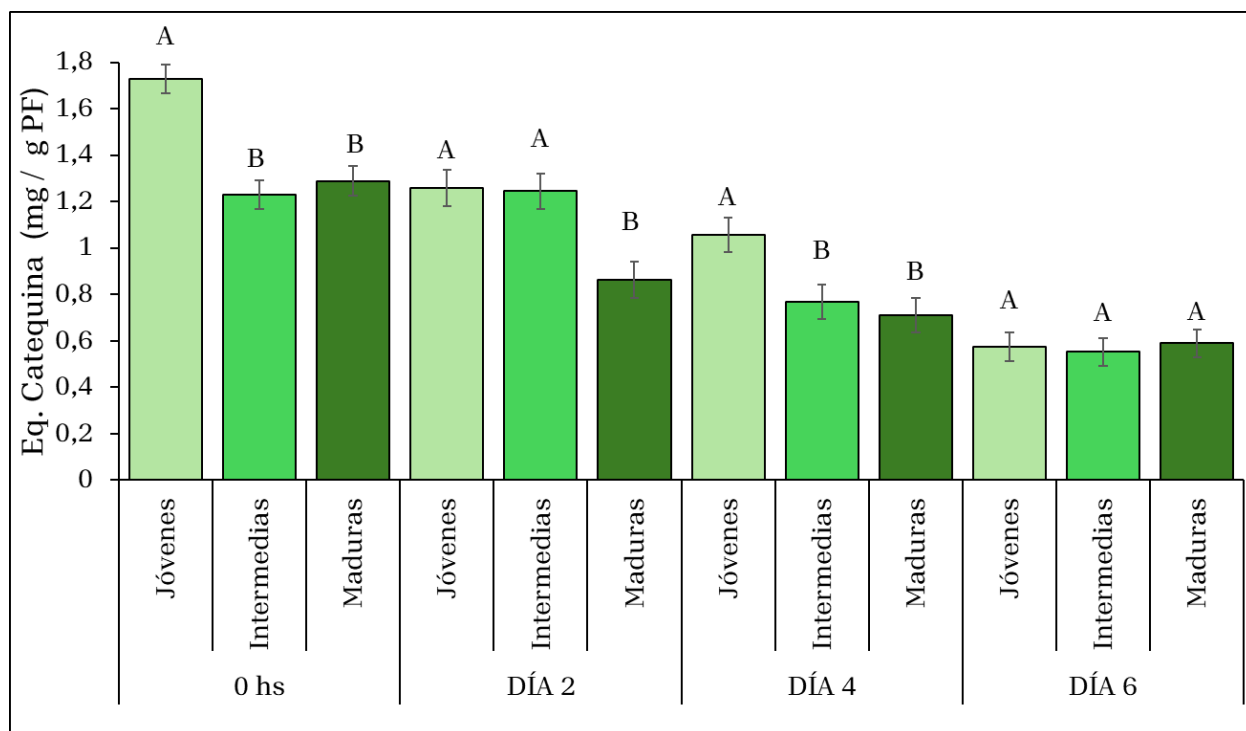


Figura 4.5: Contenido de flavonoides totales. El contenido se expresa como (mg catequina por gramo de peso fresco) y fue determinado en las hojas jóvenes, intermedias y maduras en el día de cosecha (día 0) y al día 2, 4 y 6 de almacenamiento postcosecha a 20 °C.

4.2.3 CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

Se determinó la capacidad antioxidante de las hojas mediante dos metodologías: ABTS (Fig. 4.6) y DPPH (Fig. 4.7). En ambos casos se observó un perfil muy similar. En el momento de la cosecha, las hojas jóvenes poseen la mayor capacidad antioxidante respecto a los otros estadios de desarrollo y en las hojas maduras se encontraron los menores valores, correlacionando con el contenido de fenoles y flavonoides,

metabolitos con capacidad antioxidante. En los días 2, 4 y 6 de almacenamiento no se encontraron diferencias entre la capacidad antioxidante de las hojas de los estadios jóvenes e intermedios, pero sí se observaron valores mayores respecto a las hojas maduras (Fig. 4.6). Anteriormente se reportó que en las hojas jóvenes de kale se encontró la mayor capacidad antioxidante respecto a estadios intermedios y maduros (Albornoz y Cantwell, 2016).

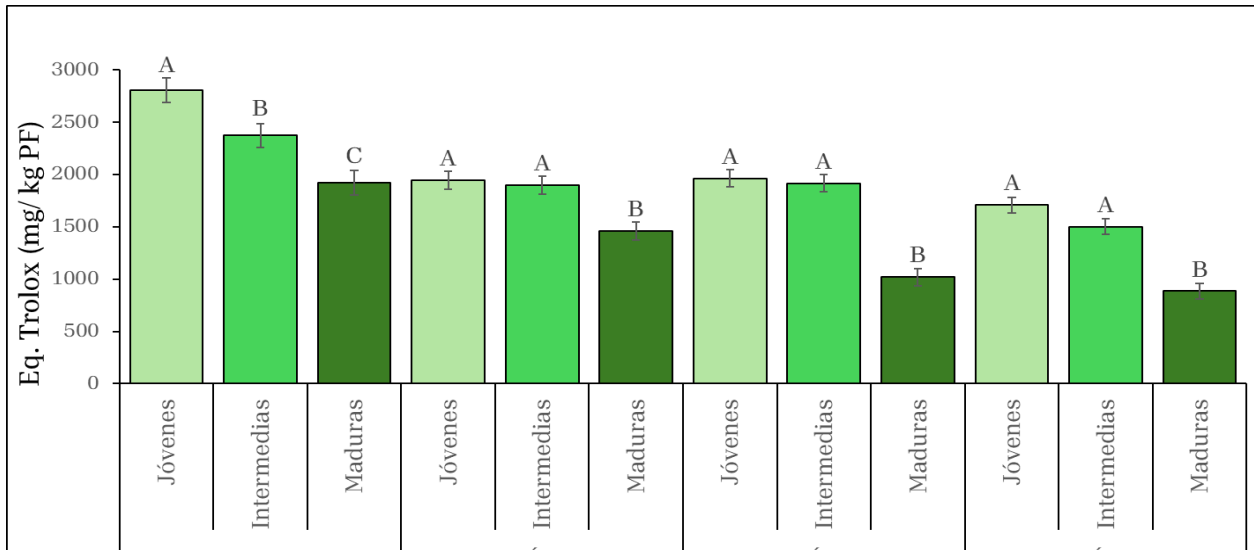


Figura 4.6: Capacidad antioxidante mediante el método ABTS. Determinaciones en las hojas jóvenes, intermedias y maduras en el día de cosecha (día 0) y al día 2, 4 y 6 de almacenamiento postcosecha a 20 °C.

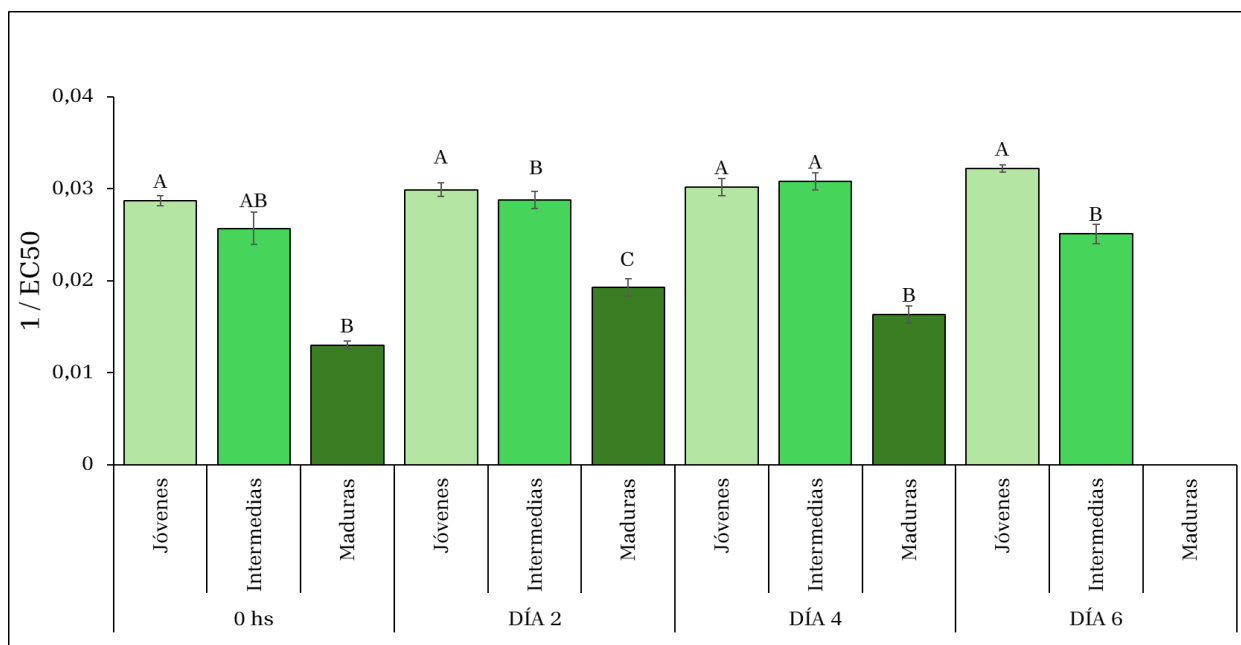


Figura 4.7: Capacidad antioxidante mediante el método DPPH. Determinaciones en las hojas jóvenes, intermedias y maduras en el día de cosecha (día 0) y al día 2, 4 y 6 de almacenamiento postcosecha a 20 °C.

4.3 CONTENIDO DE AZÚCARES

4.3.1 AZÚCARES TOTALES

El contenido de azúcares está directamente vinculado con la senescencia foliar. El decaimiento de los azúcares puede ser uno de los factores causantes de la senescencia en los tejidos verdes (Chen et al., 2024). En el día de cosecha, y al día 2 de almacenamiento, se observó una mayor cantidad de azúcares totales en las hojas intermedias respecto a los otros estadios (Fig. 4.8). En los días 4 y 6 de almacenamiento, se detectaron mayores valores de azúcares solubles totales en las hojas intermedia y maduras. La menor concentración de azúcares totales se encontró en las hojas de estadio joven, en todos los tiempos de muestreo, y también se observó una mayor disminución de este contenido en el estadio joven. A tiempos iniciales, la mayor concentración de azúcares en las hojas intermedias podría estar causada por una mayor fotosíntesis, teniendo en cuenta que estas hojas poseen el mayor contenido de clorofilas. En estadios avanzados de senescencia, se produce degradación de las paredes celulares que aportan azúcares solubles necesarios para la obtención de

energía (Biswal y Pandey, 2018). Posiblemente las hojas intermedias y maduras posean una mayor cantidad de azúcares en los días finales de almacenamiento a causa de la degradación de la pared celular, producto a su vez de un estado más avanzado de la senescencia.

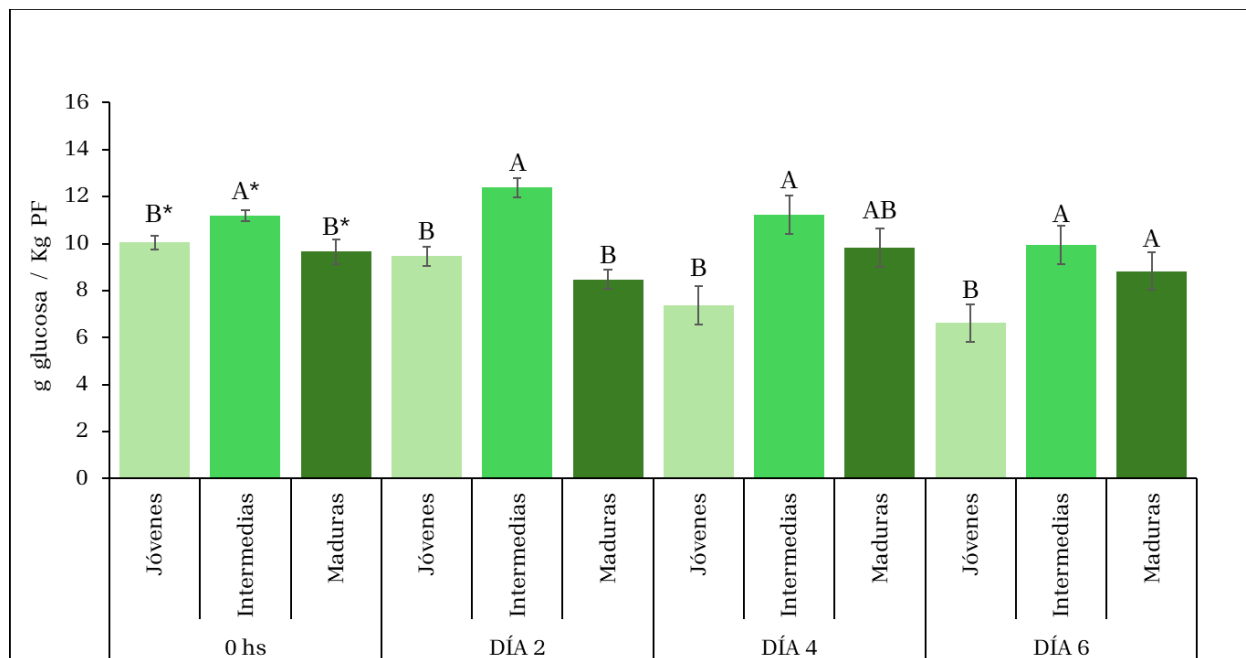


Figura 4.8: Contenido de azúcares totales. El contenido de azúcares totales se expresó en (g glucosa por kg de peso fresco) y fue determinado en las hojas jóvenes, intermedias y maduras en el día de cosecha (día 0) y al día 2, 4 y 6 de almacenamiento postcosecha a 20 °C.

4.3.2 AZÚCARES REDUCTORES

En cuanto al contenido de azúcares reductores, se encontró que las hojas jóvenes tienen las mayores concentraciones en todos los tiempos analizados. En el tiempo inicial, el contenido en las hojas jóvenes es más del doble que en las intermedias y maduras. Sin embargo, el contenido en las hojas jóvenes disminuye a lo largo del almacenamiento, alcanzando al día 6 una concentración similar a las que las hojas intermedias y maduras tenían en el día inicial. Esto se podría explicar por el metabolismo más activo que implica mayor consumo de los azúcares disponibles a

través del proceso de respiración, correlacionando además con lo que se encontró respecto a las mayores pérdidas de agua de este estadio (Fig. 4.9).

En las hojas maduras, ya ha sido reportado que las tasas metabólicas están disminuidas durante el almacenamiento postcosecha, y esto podría explicar los similares niveles de azúcares totales entre el día inicial y el día 6, aunque los valores se mantienen relativamente bajos.

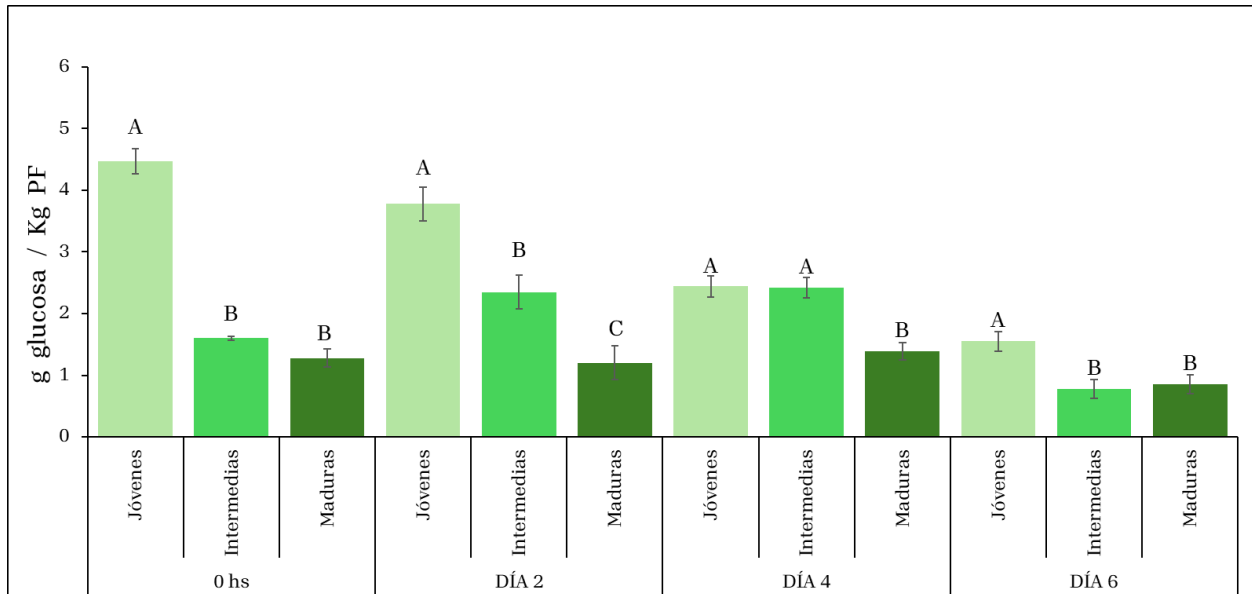


Figura 4.9: Contenido de azúcares reductores. Los resultados se expresan en (g glucosa por kg de peso fresco) en las hojas jóvenes, intermedias y maduras en el día de cosecha (día 0) y al día 2, 4 y 6 de almacenamiento postcosecha a 20 °C.

4.4 CONTENIDO DE PROTEÍNAS

Desde el punto de vista nutricional, los vegetales de la familia de las *Brassicaceae* tienen un alto contenido de proteínas respecto a otras hortalizas, incluso la espinaca y las alcachofas (Rosa y Almeida, 1996). Asimismo, dentro de la familia *Brassicaceae* ha sido reportado que el kale junto con la col de Bruselas es una de las hortalizas con alto contenido de proteínas (Thavarajah et al., 2019).

4.4.1 PROTEÍNAS TOTALES

El contenido de proteínas totales disminuyó en todas las muestras durante el almacenamiento (Figura 4.10). Sin embargo, en todos los tiempos de almacenamiento analizados, se observa una mayor concentración en las hojas jóvenes y menores valores en las maduras, partiendo en el día de cosecha con un promedio de 45,7 mg proteína / g peso fresco para las hojas jóvenes y aproximadamente 19 mg proteína / g peso fresco para las hojas ya maduras. Las hojas intermedias muestran un contenido medio comparado con los otros estadios. Estas diferencias se observaron en todos los días de almacenamiento postcosecha. Hacia el final del almacenamiento, las hojas jóvenes siguen manteniendo una concentración de proteínas totales de aproximadamente el doble que las hojas maduras.

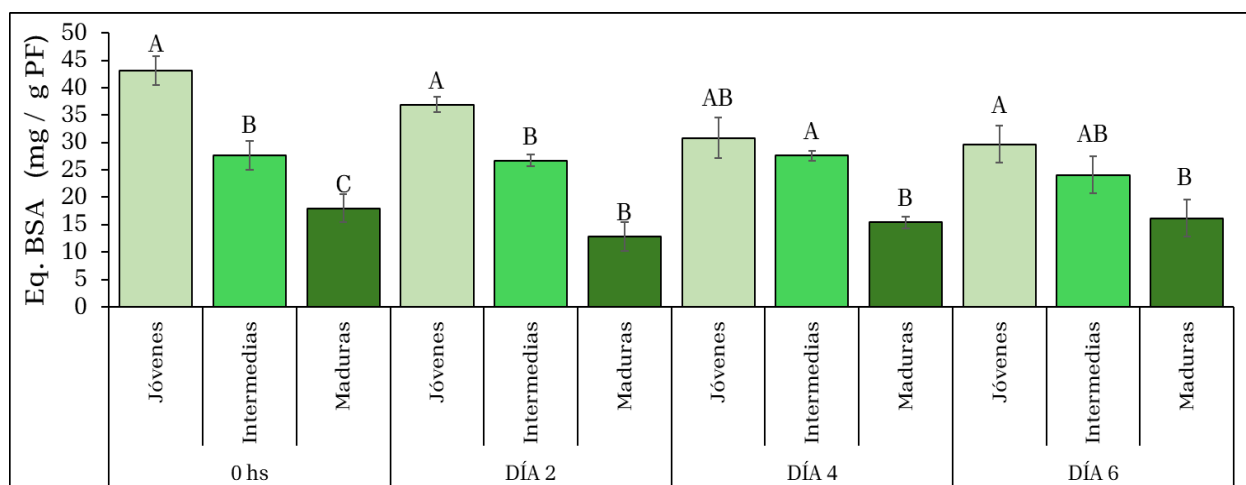


Figura 4.10: Contenido de proteínas totales. Los resultados se expresan como (mg proteínas por gramo de peso fresco) en las hojas jóvenes, intermedias y maduras en el día de cosecha (día 0) y al día 2, 4 y 6 de almacenamiento postcosecha a 20 °C.

Uno de los parámetros característicos de la senescencia foliar es la degradación de proteínas. Una variación similar en el contenido de proteínas ha sido descrita en otras hortalizas de la familia *Brassicaceae*. Por ejemplo, la postcosecha del brócoli está caracterizada por una pérdida de proteínas durante la senescencia (Page et al. 2001). Este descenso en el contenido de proteínas se correlaciona con un incremento de la

actividad de las proteasas durante la senescencia de las *Brassicas* (Wang et al. 2004). En este trabajo, también se observó la disminución del contenido de proteínas totales durante el almacenamiento postcosecha en las hojas de kale cosechadas en los estadios joven e intermedio; mientras que las hojas maduras mostraron muy pocas variaciones conforme al avance de la senescencia, un perfil similar al encontrado en el contenido de azúcares reductores.

4.4.2 PROTEÍNAS SOLUBLES

En cuanto al contenido de proteínas solubles, se observaron diferencias en todos los días de almacenamiento, con mayores valores en las hojas jóvenes, excepto al día 2 en el cuál no se encontraron diferencias significativas entre los tres estadios. (Figura 4.11).

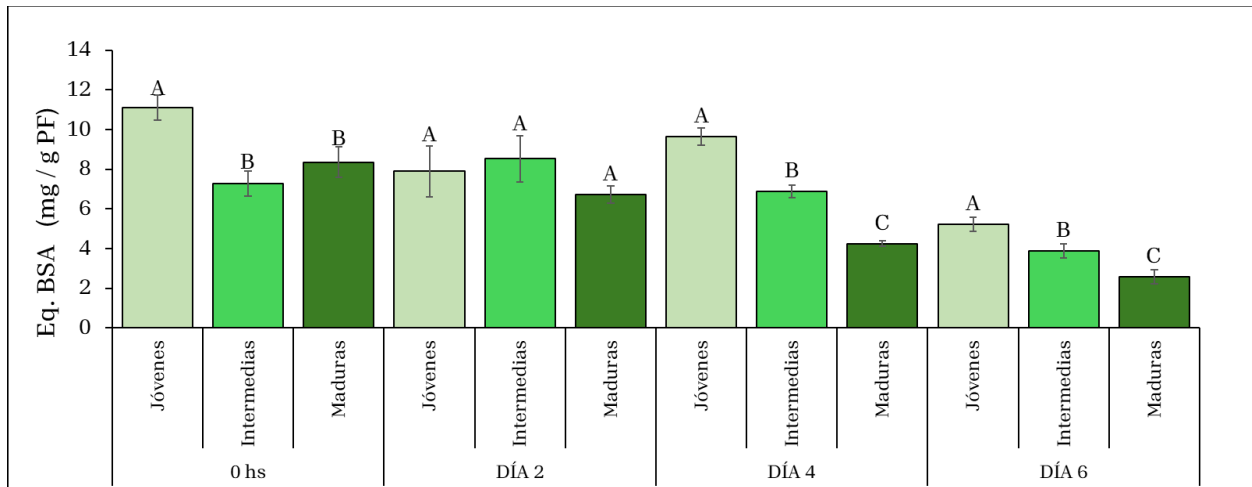


Figura 4.11: Contenido de proteínas solubles. Los resultados se expresan como (mg proteínas por gramo de peso fresco) en las hojas jóvenes, intermedias y maduras en el día de cosecha (día 0) y al día 2, 4 y 6 de almacenamiento postcosecha a 20 °C.

4.5 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

Teniendo en cuenta que una de las manifestaciones más evidentes de la senescencia es el deverdizado de las hojas, se decidió analizar la expresión de los genes

involucrados en el catabolismo de clorofilas mediante qRT-PCR. Como se mencionó anteriormente, la primera etapa de la vía de degradación de las clorofilas es el pasaje de la clorofila *b* a clorofila *a* mediada por la enzima clorofila *b* reductasa (CBR), codificada por los genes *NON-YELLOW COLORING (NYC)* y *NON-YELLOW COLORING LIKE (NOL)*. Como se puede observar en la Figura 4.12, el gen *NYC* mostró aumentos de su expresión génica mucho más pronunciadas que *NOL* para todos los estadios de desarrollo y tiempos de almacenamiento.

En el día de cosecha, la expresión génica de *NYC* es alrededor de 18 veces mayor en las hojas maduras respecto a los otros dos estadios. En la base de datos de *Arabidopsis Thaliana* ePlant (<https://www.arabidopsis.org>) en la cuál a través de un *heatmap*, se pueden consultar los cambios de expresión de diferentes genes, tanto en los diferentes tejidos como en los estadios, esta reportado un aumento en la expresión génica de *NYC* en las hojas maduras, respecto a las jóvenes e intermedias y jóvenes de *Arabidopsis Thaliana*. Cabe recordar que entre el género *Arabidopsis* y *Brassica*, se comparte una sintenia alrededor del 75% entre sus pares de bases por su relación filogenética. La expresión relativa de *NYC* continúa creciendo hacia casi el doble en el caso de las hojas maduras, y luego cae fuertemente en los estadios finales del almacenamiento postcosecha. Este mismo comportamiento fue descrito en brócoli, durante el almacenamiento postcosecha a temperatura ambiente, con los mayores aumentos de expresión hacia el día 3 y volviendo a disminuir su expresión hacia el día 5 (Reyes Jara et al., 2019). Este mismo perfil se observó en las hojas maduras para el gen *NOL*, aunque con valores de la expresión relativa mucho más bajos.

En el caso de las hojas intermedias, se observa un aumento de la expresión mayor a 40 veces en el día 4 y vuelve a disminuir al día 6, pero aún la expresión relativa sigue siendo mayor que en los estadios iniciales.

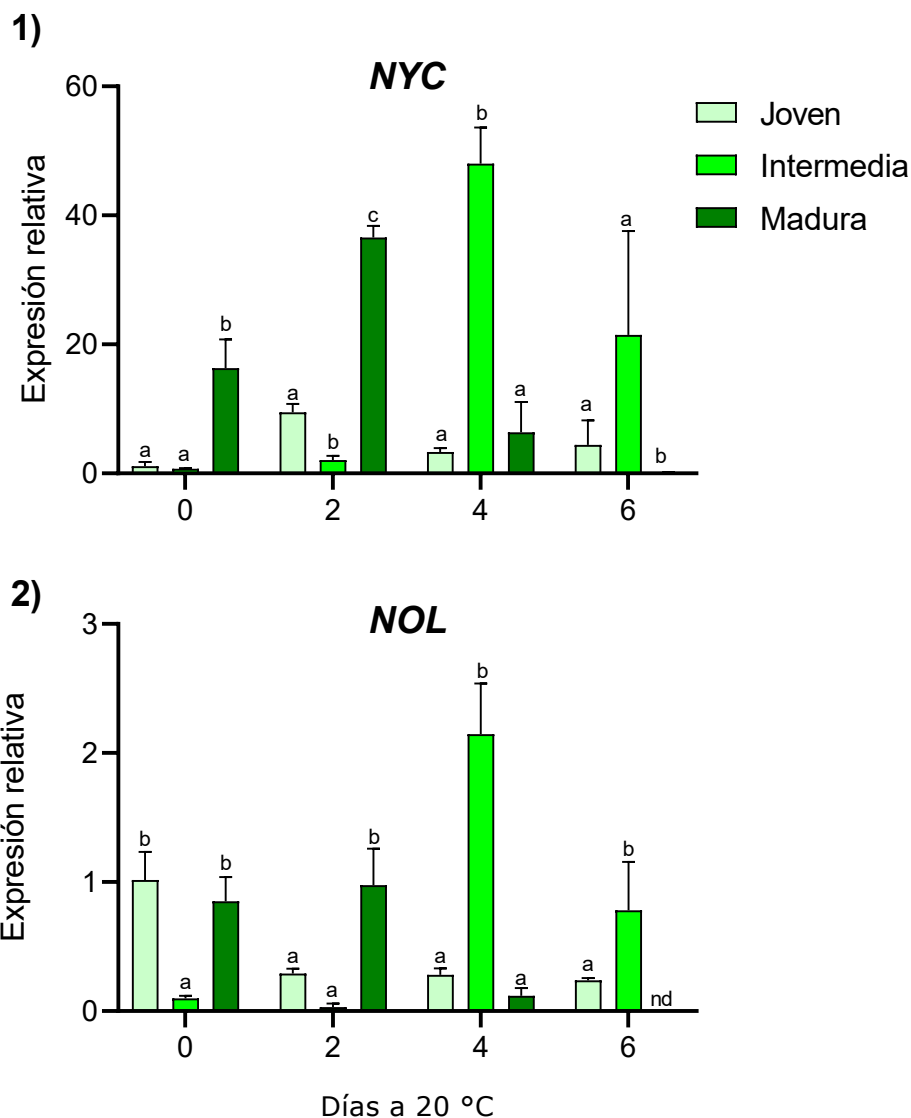


Figura 4.12: Expresión relativa del gen *NYC* (1) y *NOL* (2). La expresión fue medida en las en las hojas jóvenes, intermedias y maduras en el día de cosecha (día 0) y al día 2, 4 y 6 de almacenamiento postcosecha a 20 °C.

En el trabajo de Sakuraba et al., (2013) se describe un aumento de la expresión de *NYC1*, *SGR*, *PaO* y *PPH* durante la senescencia de hojas de *Arabidopsis*, mientras que los genes *NOL*, *HCAR* y *RCCR* muestran otro patrón, más bien de disminución. Por otro lado, en el trabajo de Jia et al. (2015) se reporta que *NOL* presenta una expresión constitutiva. En ambos casos, aunque ambos genes (*NYC* y *NOL*) estén involucrados en el mismo paso de la vía del catabolismo de las clorofilas, se plantea que *NOL* podría

cumplir algún otro rol distinto de *NYC1* en la vía del catabolismo de clorofilas de kale durante la senescencia postcosecha.

Se analizó además la expresión génica de *SGR*, *PPH* y *PaO* (Figura 4.13). En los tres genes, se encontró un perfil de expresión muy similar al encontrado en el gen *NYC*; con los mayores niveles de expresión en las hojas maduras en el día inicial y al día 2 de almacenamiento, y en las hojas intermedias en los días finales (día 4 y día 6), mientras que en las hojas jóvenes siempre se detectan las menores expresiones.

En el caso de los genes *PPH* y *PaO*, se encontraron aumentos muy marcados en la expresión de estos genes durante el almacenamiento de las hojas intermedias y maduras. En el caso de las hojas maduras se halló un incremento de aproximadamente 48 veces para *PPH* y de 131 veces para *PaO* al día 2, mientras que en el caso de las hojas intermedias aumentos similares, fueron 41 veces para *PPH* y 110 veces para *PaO* pero al día 4. No se detectaron aumentos similares en las hojas jóvenes, correlacionando con su menor tasa de degradación de clorofilas. Estos resultados podrían indicar que ambos genes (*PaO* y *PPH*) son genes claves en la ruta de degradación de las clorofilas en la senescencia postcosecha de kale, de la misma manera que los son en otras *Brassicas* y *Arabidopsis* (Zhu et al.,2017).

La información encontrada podría sugerir que las hojas maduras, en el día de cosecha, ya se encuentran iniciando su senescencia dada su ubicación en la planta. En consecuencia, el catabolismo de clorofilas está iniciado, y sus genes más expresados en los tiempos iniciales. Esto a su vez se relaciona, con lo que se observa en el aspecto, el color superficial y el contenido de clorofilas, que son las hojas que poseen menos color verde hacia el final del almacenamiento postcosecha. Por otro lado, en las hojas intermedias, la senescencia podría estar iniciando a partir del día 4, mientras que las hojas jóvenes, la tasa de degradación de clorofilas es menor correlacionando con la menor expresión de sus genes.

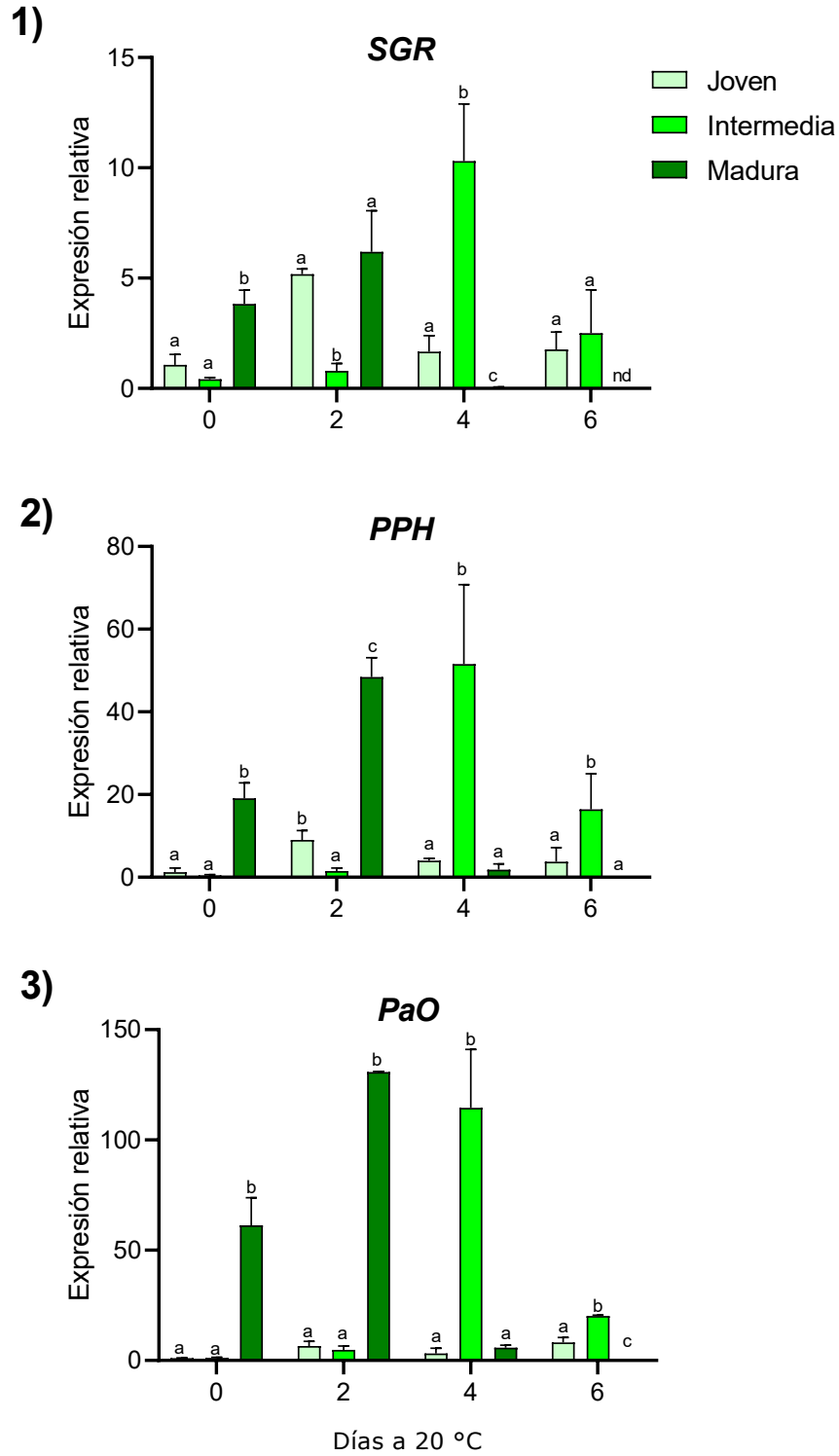


Figura 4.13: Expresión relativa del gen SGR (1), PPH (2) y PaO (3). La expresión relativa fue medida en las en las hojas jóvenes, intermedias y maduras en el día de cosecha (día 0) y al día 2, 4 y 6 de almacenamiento postcosecha a 20 °C.

5. CONCLUSIONES GENERALES

Tomando en cuenta todos los estudios realizados en este trabajo, se puede evidenciar que el estadio de desarrollo en el que se encuentra la hoja de kale al momento de la cosecha es un factor que influye en la vida postcosecha de este producto, así como también en el contenido de metabolitos nutricionales y la expresión de los genes asociados al catabolismo de las clorofilas.

Como la mayoría de los vegetales de hojas verdes, las hojas de kale senescen rápidamente una vez que son cosechadas y almacenadas a temperatura ambiente, evidenciado por la pérdida del color verde. Las hojas que se cosechan en un estadio de desarrollo joven poseen mejor aspecto en el almacenamiento postcosecha, ya que se encuentran más verdes y tienen una menor tasa de degradación del contenido de clorofilas totales; la expresión de los genes asociados con el catabolismo de esta molécula se encuentra disminuidos respecto a los estadios de las hojas más avanzados. Estos ensayos son promisorios para la medida de las actividades enzimáticas asociadas a esta vía.

Asimismo, las hojas jóvenes poseen mayor cantidad de compuestos con capacidad antioxidante, proteínas y azúcares reductores, correspondiente a una hoja menos senescente.

Una estrategia simple y económica, como cambiar una práctica de cosecha, podría ser útil para extender la vida postcosecha de esta hortaliza y a su vez consumir un producto con mayor aporte nutricional.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Albornoz, K., and M. I. Cantwell. "Fresh-Cut Kale Quality and Shelf-Life in Relation to Leaf Maturity and Storage Temperature." *Acta Horticulturae*, no. 1141, 2016, pp. 109–16, <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2016.1141.11>.

Arnao, Marino B., et al. "Estimation of Free Radical-quenching Activity of Leaf Pigment Extracts." *Phytochemical Analysis*, vol. 12, no. 2, 2001, pp. 138–43, <https://doi.org/10.1002/pca.571>.

Baladia, Eduard. "Cabrera A, Mach N. Flavonoides Como Agentes Quimiopreventivos y Terapéuticos Contra El Cáncer de Pulmón. Rev Esp Nutr Hum Diet. 2012;16(4):143-153 [Erratum]." *Revista Española de Nutrición Humana y Dietética*, vol. 17, no. 2, June 2013, pp. 91–92, <https://doi.org/10.14306/renhyd.17.2.6>.

Bárcena, Alejandra, et al. "The Use of Visible LEDs as Technology to Delay Postharvest Senescence of Vegetables: A Review." *Plant Molecular Biology Reporter*, July 2024, <https://doi.org/10.1007/s11105-024-01480-3>.

Biswal, B., and J. K. Pandey. "Loss of Photosynthesis Signals a Metabolic Reprogramming to Sustain Sugar Homeostasis during Senescence of Green Leaves: Role of Cell Wall Hydrolases." *Photosynthetica*, vol. 56, no. 1, Mar. 2018, pp. 404–10, <https://doi.org/10.1007/s11099-018-0784-x>.

Bradford, Marion M. "A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding." *Analytical Biochemistry*, vol. 72, no. 1, May 1976, pp. 248–54, [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).

Brand-Williams, W., et al. "Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity." *LWT - Food Science and Technology*, vol. 28, no. 1, Jan. 1995, pp. 25–30, [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5).

Cantwell, and Suslow. *Coles de Hoja, Berza o Repollo | Postharvest Research and Extension Center*. 2002, <https://postharvest.ucdavis.edu/es/produce-facts-sheets/coles-de-hoja-berza-o-repollo>.

Cartea, María Elena, and Pablo Velasco. "Glucosinolates in Brassica Foods: Bioavailability in Food and Significance for Human Health." *Phytochemistry Reviews*, vol. 7, no. 2, 2008, pp. 213–29, <https://doi.org/10.1007/s11101-007-9072-2>.

Casajús, Victoria, et al. "The Time of the Day to Harvest Affects the Degreening, Antioxidant Compounds, and Protein Content during Postharvest Storage of Broccoli." *Journal of Food Biochemistry*, vol. 43, no. 7, 2019, <https://doi.org/10.1111/jfbc.12904>.

Chen, Dan, et al. "Deletion of the Sugar Importer Gene *OsSWEET1b* Accelerates Sugar Starvation-Promoted Leaf Senescence in Rice." *Plant Physiology*, vol. 195, no. 3, June 2024, pp. 2176–94, <https://doi.org/10.1093/plphys/kiae098>.

Chen, Haixu, et al. "BRAD V3.0: An Upgraded Brassicaceae Database." *Nucleic Acids Research*, vol. 50, no. D1, Jan. 2022, pp. D1432–41, <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1057>.

Costa, L., Vicente, A. R., Civello, P. M., Chaves, A. R., Martinez, G. A. (2006). UV-C treatment delays postharvest senescence in broccoli florets. *Postharvest Biology and Technology*, 39(2), 204-210.

Dragović-Uzelac, Verica, et al. "Polyphenols and Antioxidant Capacity in Fruits and Vegetables Common in the Croatian Diet." *Agriculturae Conspectus Scientificus*, vol. 74, no. 3, Dec. 2009, pp. 175–79, <https://hrcak.srce.hr/47367>.

Duarte-Sierra, Arturo, et al. "UV-C Hormesis in Broccoli Florets: Preservation, Phyto-Compounds and Gene Expression." *Postharvest Biology and Technology*, vol. 157, 2019, p. 110965, <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2019.110965>.

"El KALE." *Mercado Central*, 25 Sept. 2024, <https://mercadocentral.gob.ar/news/el-kale>.

Elik, Aysel, et al. "Strategies to Reduce Post-Harvest Losses for Fruits and Vegetables." *International Journal of Scientific and Technological Research*, 2019, <https://doi.org/10.7176/JSTR/5-3-04>.

Fahey, J. W. "BRASSICAS." *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*, Elsevier, 2003, pp. 606–15, <https://doi.org/10.1016/B0-12-227055-X/00118-8>.

Faizal, Ahmad, and Danny Geelen. "Saponins and Their Role in Biological Processes in Plants." *Phytochemistry Reviews*, vol. 12, no. 4, Dec. 2013, pp. 877–93, <https://doi.org/10.1007/s11101-013-9322-4>.

Fernández-León, M. F., et al. "Different Postharvest Strategies to Preserve Broccoli Quality during Storage and Shelf Life: Controlled Atmosphere and 1-MCP." *Food Chemistry*, vol. 138, no. 1, 2013, pp. 564–73, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.09.143>.

Ferrante. "Colour Changes of Fresh-Cut Leafy Vegetable during Storage." *WFL Publisher*, vol. 2, 2004, pp. 40–44, https://www.researchgate.net/profile/Antonio-Ferrante/publication/233852247_Colour_changes_of_fresh-cut_leafy_vegetables_during_storage/links/09e4150c1cfd373806000000/Colour-changes-of-fresh-cut-leafy-vegetables-during-storage.pdf.

FoodData Central. <https://fdc.nal.usda.gov/fdc-app.html>. Accessed 14 Oct. 2024.

Gil, M. I. (2015, September). Preharvest factors and fresh-cut quality of leafy vegetables. In *III International Conference on Fresh-Cut Produce: Maintaining Quality and Safety 1141* (pp. 57-64).

Horie, Yukiko, et al. "Participation of Chlorophyll b Reductase in the Initial Step of the Degradation of Light-Harvesting Chlorophyll a/b-Protein Complexes in Arabidopsis." *Journal of Biological Chemistry*, vol. 284, no. 26, 2009, pp. 17449–56, <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.008912>.

Inskeep, William P., and Paul R. Bloom. "Extinction Coefficients of Chlorophyll a and b in *N,N*-Dimethylformamide and 80% Acetone." *Plant Physiology*, vol. 77, no. 2, Feb. 1985, pp. 483–85, <https://doi.org/10.1104/pp.77.2.483>.

Jia, Ting, et al. "The Chlorophyll b Reductase NOL Participates in Regulating the Antenna Size of Photosystem II in *Arabidopsis Thaliana*." *Procedia Chemistry*, vol. 14, Jan. 2015, pp. 422–27, <https://doi.org/10.1016/j.proche.2015.03.057>.

Koukounaras, Athanasios, et al. "Postharvest CO₂ and Ethylene Production and Quality of Rocket (*Eruca Sativa* Mill.) Leaves as Affected by Leaf Age and Storage

Temperature.” *Postharvest Biology and Technology*, vol. 46, no. 2, 2007, pp. 167–73, <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2007.04.007>.

Kumar, Naresh, and Nidhi Goel. “Phenolic Acids: Natural Versatile Molecules with Promising Therapeutic Applications.” *Biotechnology Reports*, vol. 24, Dec. 2019, p. e00370, <https://doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00370>.

Kusaba, Makoto, et al. “Rice NON-YELLOW COLORING1 Is Involved in Light-Harvesting Complex II and Grana Degradation during Leaf Senescence.” *The Plant Cell*, vol. 19, no. 4, May 2007, pp. 1362–75, <https://doi.org/10.1105/tpc.106.042911>.

Le, Thanh Ninh, et al. “Broccoli (*Brassica Oleracea* L. Var. *Italica*) Sprouts as the Potential Food Source for Bioactive Properties: A Comprehensive Study on In Vitro Disease Models.” *Foods*, vol. 8, no. 11, Oct. 2019, p. 532, <https://doi.org/10.3390/foods8110532>.

Lee, Sang Joon, et al. “Enhancement of Plant Leaf Transpiration with Effective Use of Surface Acoustic Waves: Effect of Wave Frequency.” *RSC Advances*, vol. 8, no. 27, 2018, pp. 15141–48, <https://doi.org/10.1039/C8RA01873A>.

Lowry, Oliver H., et al. “Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent.” *J Biol Chem*, vol. 193, no. 1, 1951, pp. 265–75, https://journalsp.com/wp-content/uploads/2022/10/Word-Template_Sample.pdf.

Ly, Bao Chau K., et al. “Research Techniques Made Simple: Cutaneous Colorimetry: A Reliable Technique for Objective Skin Color Measurement.” *Journal of Investigative Dermatology*, vol. 140, no. 1, 2020, pp. 3-12.e1, <https://doi.org/10.1016/j.jid.2019.11.003>.

Masclaux-Daubresse, Céline, et al. "Regulation of Nutrient Recycling via Autophagy." *Current Opinion in Plant Biology*, vol. 39, 2017, pp. 8–17, <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2017.05.001>.

National Center for Biotechnology Information. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Accessed 23 Oct. 2024.

Noodén, L. D. "The Phenomena of Senescence and Aging." *Senescence and Aging in Plants*, Elsevier, 1988, pp. 1–50, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-520920-5.50007-9>.

Page, Tania, et al. "Molecular and Biochemical Characterization of Postharvest Senescence in Broccoli." *Plant Physiology*, vol. 125, no. 2, Feb. 2001, pp. 718–27, <https://doi.org/10.1104/pp.125.2.718>.

Parfitt, Julian, et al. "Food Waste within Food Supply Chains: Quantification and Potential for Change to 2050." *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, vol. 365, no. 1554, Sept. 2010, pp. 3065–81, <https://doi.org/10.1098/rstb.2010.0126>.

Pintos, Federico, et al. "Advances in the Use of White Light on Broccoli and Kale Postharvest Shelf Life." *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, vol. 86, 2023, p. 103373, <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2023.103373>.

Pogson, Barry J., and Stephen C. Morris. "22 - Postharvest Senescence of Vegetables and Its Regulation." *Plant Cell Death Processes*, edited by Larry D. Noodén, Academic Press, 2004, pp. 319–29, <https://doi.org/10.1016/B978-012520915-1/50025-4>.

Raza, Ali, et al. "The Plant Family Brassicaceae: Introduction, Biology, And Importance." *The Plant Family Brassicaceae: Biology and Physiological Responses to Environmental Stresses*, edited by Mirza Hasanuzzaman, Springer, 2020, pp. 1–43, https://doi.org/10.1007/978-981-15-6345-4_1.

Reyes Jara, Andrea M., et al. "Effects of Hormonal and Physical Treatments on the Expression of a Putative Chlorophyll *b* Reductase Gene (*BoNYC1*) during Postharvest Senescence of Broccoli." *Postharvest Biology and Technology*, vol. 147, Jan. 2019, pp. 107–12, <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2018.09.010>.

Rosa, E., and D. Almeida. "THE INFLUENCE OF GROWING SEASON ON PROTEIN AND MINERAL CONTENT OF SEVERAL BRASSICA CROPS." *Acta Horticulturae*, no. 407, 1996, pp. 261–68, <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1996.407.32>.

Saito, Kazuki, et al. "The Flavonoid Biosynthetic Pathway in Arabidopsis: Structural and Genetic Diversity." *Plant Physiology and Biochemistry*, vol. 72, Nov. 2013, pp. 21–34, <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.02.001>.

Sakuraba, Yasuhito, et al. "The Rice *Faded Green Leaf* Locus Encodes Protochlorophyllide Oxidoreductase B and Is Essential for Chlorophyll Synthesis under High Light Conditions." *The Plant Journal*, vol. 74, no. 1, 2013, pp. 122–33, <https://doi.org/10.1111/tpj.12110>.

Šamec, Dunja, et al. "Kale (*Brassica Oleracea* Var. *Acephala*) as a Superfood: Review of the Scientific Evidence behind the Statement." *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, vol. 59, no. 15, Aug. 2019, pp. 2411–22, <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1454400>.

Satheesh, Neela, and Solomon Workneh Fanta. "Kale: Review on Nutritional Composition, Bio-Active Compounds, Anti-Nutritional Factors, Health Beneficial Properties and Value-Added Products." *Cogent Food & Agriculture*, edited by Fatih Yildiz, vol. 6, no. 1, Jan. 2020, p. 1811048, <https://doi.org/10.1080/23311932.2020.1811048>.

"SDG Progress Report 2023." *Www.Fao.Org*, <https://doi.org/10.4060/cc7088en>. Accessed 23 Oct. 2024.

Somogyi, Michael. "A NEW REAGENT FOR THE DETERMINATION OF SUGARS." *Journal of Biological Chemistry*, vol. 160, no. 1, 1945, pp. 61–68, [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)43097-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)43097-9).

Sripong, K., et al. "Effect of Packaging on Postharvest Quality of Organic Western Kale." *Acta Horticulturae*, no. 1210, 2018, pp. 229–34, <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2018.1210.32>.

TAIR - Arabidopsis. <https://www.arabidopsis.org/>. Accessed 24 Oct. 2024.

Thavarajah, Dil, et al. "Effect of Cover Crops on the Yield and Nutrient Concentration of Organic Kale (*Brassica Oleracea* L. Var. *Acephala*)." *Scientific Reports*, vol. 9, no. 1, July 2019, p. 10374, <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46847-9>.

Wang, Wangxia, et al. "Role of Plant Heat-Shock Proteins and Molecular Chaperones in the Abiotic Stress Response." *Trends in Plant Science*, vol. 9, no. 5, 2004, pp. 244–52, <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2004.03.006>.

Zhishen, Jia, et al. "The Determination of Flavonoid Contents in Mulberry and Their Scavenging Effects on Superoxide Radicals." *Food Chemistry*, vol. 64, no. 4, 1999, pp. 555–59, [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(98\)00102-2](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(98)00102-2).

Zhu, Xiaoyu, et al. "Phytohormone and Light Regulation of Chlorophyll Degradation." *Frontiers in Plant Science*, vol. 8, Nov. 2017, p. 1911, <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01911>.