



Universidad de Chile
Doctorado en Nutrición y Alimentos

Incremento de la síntesis de compuestos fenólicos en lechugas (*Lactuca sativa* L.) tipo Lollo Bionda y Lollo Rosso en respuesta a estrés abiótico controlado y su mantención en postcosecha

Tesis presentada como parte de los requisitos para optar al Grado de
Doctor en Nutrición y Alimentos

Programa Conjunto
Facultad de Ciencias Agronómicas, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas,
Facultad de Medicina, Facultad de Ciencias veterinarias y Pecuarias e Instituto de
Nutrición y Tecnología de Alimentos

Por
Mónica Paola Flores Ramírez

Director de Tesis:
Profesor Doctor Víctor Hugo Escalona Contreras

SANTIAGO, 2024

Índice

| | |
|--|-----------|
| Abreviaturas | 13 |
| Unidades de medida..... | 16 |
| 1.- Introducción | 17 |
| 1.1.- Tendencias en la alimentación: compuestos funcionales y efectos en la salud humana. | 17 |
| 1.2.- Lechuga (<i>Lactuca sativa</i> L.)..... | 18 |
| 1.3.- Función de los compuestos funcionales en las plantas..... | 20 |
| 1.3.1.- Estrés abiótico..... | 20 |
| 1.3.1.1.- Estrés lumínico: Radiación UV-B..... | 20 |
| 1.3.1.2.- Estrés salino por cloruro de sodio (NaCl) | 25 |
| 1.4.- Compuestos antioxidantes y postcosecha | 28 |
| 1.5.- Bibliografía | 32 |
| 2.- Hipótesis | 39 |
| 3.- Objetivos..... | 39 |
| 3.1.- Objetivo general..... | 39 |
| 3.2.- Objetivos específicos..... | 39 |
| 4.- Metodología..... | 40 |
| 4.1.- Material vegetal y condiciones de cultivo..... | 40 |
| 4.2.- Montaje y diseño experimental | 40 |
| 4.3.- Parámetros de crecimiento de las plantas (MF, MS, % MS) | 40 |
| 4.4.- Determinación de compuestos funcionales | 40 |
| 4.4.1.- Extracción de las fracciones fenólicas..... | 40 |
| 4.4.2.- Determinación de la concentración de fenoles totales..... | 41 |
| 4.4.3.- Determinación de la capacidad antioxidante | 41 |
| 4.4.3.1.- Método de FRAP..... | 41 |
| 4.4.3.2.- Método de DPPH..... | 41 |
| 4.4.4.- Análisis estadístico | 42 |
| 5.- Capítulo 1: Corte y radiación UV-B como factores estresores..... | 43 |
| 5.1.- Determinación de la dosis de UV-B a utilizar | 43 |
| 5.1.1.- Introducción..... | 43 |
| 5.1.2.- Metodología..... | 43 |
| 5.1.2.1.- Material vegetal y condiciones de cultivo | 43 |

| | |
|---|-----------|
| 5.1.2.2.- Montaje y diseño experimental | 44 |
| 5.1.2.3.- Parámetro analítico de crecimiento de las plantas (% MS) | 45 |
| 5.1.2.4.- Determinación de compuestos funcionales..... | 45 |
| 5.1.2.4.1.- Extracción de las fracciones fenólicas | 45 |
| 5.1.2.4.2.- Determinación de la concentración de fenoles totales..... | 45 |
| 5.1.2.4.3.- Determinación de la capacidad antioxidante..... | 45 |
| 5.1.2.4.3.1.- Método de FRAP..... | 45 |
| 5.1.2.4.3.2.- Método de DPPH..... | 45 |
| 5.1.2.5.- Análisis estadístico | 45 |
| 5.1.3.- Resultados y discusión | 45 |
| 5.1.3.1.- Parámetro analítico de crecimiento de las plantas (% MS)..... | 46 |
| 5.1.3.2.- Determinación de la concentración de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante..... | 46 |
| 5.1.4.- Conclusiones | 50 |
| 5.1.5.- Bibliografía | 51 |
| 5.2.- Efecto de la aplicación de diferentes dosis de radiación UV-B y la realización de cosechas sucesivas en el rendimiento y concentración de compuestos fenólicos de lechugas Lollo Bionda cv. 'Levistro' y Lollo Rosso cv. 'Carmolí' | 53 |
| 5.2.1.- Introducción..... | 53 |
| 5.2.2.- Metodología..... | 54 |
| 5.2.2.1.- Material vegetal y condiciones de cultivo | 54 |
| 5.2.2.2.- Montaje de los ensayos y diseños experimentales | 54 |
| 5.2.2.3.- Parámetros analíticos del crecimiento de las plantas (MF, MS, % MS)..... | 55 |
| 5.2.2.4.- Parámetros de color (L, C*, hue) | 55 |
| 5.2.2.5.- Determinación de la concentración de compuestos funcionales | 57 |
| 5.2.2.5.1.- Extracción de las fracciones fenólicas | 57 |
| 5.2.2.5.2.- Determinación de la concentración de fenoles totales..... | 57 |
| 5.2.2.5.3.- Determinación de la concentración de flavonoides totales..... | 57 |
| 5.2.2.5.4.- Determinación de la concentración de antocianinas totales..... | 57 |
| 5.2.2.5.5.- Determinación de la capacidad antioxidante..... | 58 |
| 5.2.2.5.5.1.- Método de FRAP..... | 58 |
| 5.2.2.5.5.2.- Método de DPPH..... | 58 |
| 5.2.2.6.- Determinación de la concentración de prolina | 58 |
| 5.2.2.7.- Análisis de la anatomía celular foliar..... | 59 |

| | |
|---|-----------|
| 5.2.2.7.1.- Determinación de la densidad estomática, densidad celular e índice estomático..... | 59 |
| 5.2.2.7.2.- Análisis histológico para la determinación del espacio intercelular foliar | 59 |
| 5.2.2.8.- Análisis estadístico | 60 |
| 5.2.3.- Resultados y discusión | 60 |
| 5.2.3.1.- Efecto de las cosechas sucesivas en lechugas tipo Lollo Bionda y Lollo Rosso (Experimento 1)..... | 60 |
| 5.2.3.1.1.- Parámetros analíticos del crecimiento de las plantas | 60 |
| 5.2.3.1.2.- Parámetros de color | 60 |
| 5.2.3.1.3.- Concentración de fenoles, flavonoides, antocianinas totales y capacidad antioxidante..... | 63 |
| 5.2.3.2.- Efecto de la radiación UV-B y el tiempo de cosecha en lechugas tipo Lollo Bionda y Lollo Rosso (Experimento 2)..... | 64 |
| 5.2.3.2.1.- Parámetros analíticos del crecimiento de las plantas | 64 |
| 5.2.3.2.2.- Parámetros de color | 65 |
| 5.2.3.2.3.- Concentración de fenoles, flavonoides, antocianinas totales y capacidad antioxidante..... | 67 |
| 5.2.3.2.4.- Concentración de prolina total..... | 71 |
| 5.2.3.2.5.- Densidad estomática y celular y espacio intercelular | 73 |
| 5.2.4.- Conclusiones | 74 |
| 5.2.5.- Bibliografía | 80 |
| 5.3.- Efecto de la aplicación de diferentes dosis de radiación UV-B sobre el rendimiento y concentración de compuestos fenólicos de lechugas Lollo Bionda cv. 'Levistro' y Lollo Rosso cv. 'Carmolí' y su identificación por cromatografía líquida | 84 |
| 5.3.1.- Introducción..... | 84 |
| 5.3.2.- Metodología..... | 84 |
| 5.3.2.1.- Material vegetal y condiciones de cultivo | 84 |
| 5.3.2.2.- Montaje del ensayo y diseño experimental | 86 |
| 5.3.2.3.- Parámetros de crecimiento de las plantas (MF, MS, % MS) | 86 |
| 5.3.2.4.- Parámetros de color (L, C*, hue)..... | 86 |
| 5.3.2.5.-Determinación de compuestos funcionales..... | 86 |
| 5.3.2.5.1.- Extracción de las fracciones fenólicas | 86 |
| 5.3.2.5.2.- Determinación de la concentración de fenoles totales..... | 86 |
| 5.3.2.5.3.- Determinación de la concentración de flavonoides totales..... | 86 |
| 5.3.2.5.4.- Determinación de la concentración de antocianinas totales | 87 |

| | |
|---|------------|
| 5.3.2.5.5.- Determinación de la capacidad antioxidante..... | 87 |
| 5.3.2.5.5.1.- Método de FRAP..... | 87 |
| 5.3.2.5.5.2.- Método de DPPH..... | 87 |
| 5.3.2.6.- Cuantificación e identificación de compuestos fenólicos por UPLC..... | 87 |
| 5.3.2.7.- Cuantificación e identificación de antocianinas en lechugas 'Carmolí' | 88 |
| 5.3.2.8.- Análisis estadístico | 89 |
| 5.3.3.- Resultados y discusión | 89 |
| 5.3.3.1.- Rendimiento de lechugas tipo Lollo Bionda y Lollo Rosso cultivadas con diferentes dosis de radiación UV-B..... | 89 |
| 5.3.3.2.- Color de lechugas tipo Lollo Bionda y Lollo Rosso cultivadas con diferentes dosis de radiación UV-B..... | 89 |
| 5.3.3.3.- Concentración de fenoles, flavonoides, antocianinas totales y capacidad antioxidante en lechugas tipo Lollo Bionda y Lollo Rosso cultivadas con diferentes dosis de radiación UV-B..... | 92 |
| 5.3.3.4.- Concentración de ácidos fenólicos y flavonoides determinada por UPLC en lechugas tipo Lollo Bionda y Lollo Rosso cultivadas con diferentes dosis de radiación UV-B93 | |
| 5.3.3.5.- Concentración de antocianinas en lechugas tipo Lollo Rosso cultivadas con diferentes dosis de radiación UV-B..... | 99 |
| 5.3.4.- Conclusiones | 100 |
| 5.3.5.- Bibliografía | 101 |
| 5.4.- Efecto del uso de estrategias de postcosecha que involucran bajas temperaturas en combinación con una concentración de gases con bajo O₂ y moderado CO₂, en la concentración de compuestos fenólicos lechugas tipo Lollo Bionda cv. 'Levistro' y Lollo Rosso cv. 'Carmolí' las cuales fueron tratadas con radiación UV-B durante su cultivo..... | 104 |
| 5.4.1.- Introducción..... | 104 |
| 5.4.2.- Metodología..... | 105 |
| 5.4.2.1.- Material vegetal y condiciones de cultivo | 105 |
| 5.4.2.2.- Mínimo procesamiento en fresco | 105 |
| 5.4.2.3.- Montaje y diseño experimental | 106 |
| 5.4.2.4.- Monitoreo concentración de gases dentro de la bolsa..... | 106 |
| 5.4.2.5.-Determinación de compuestos funcionales..... | 106 |
| 5.4.2.5.1- Extracción de las fracciones fenólicas | 106 |
| 5.4.2.5.2- Determinación de la concentración de fenoles totales | 106 |
| 5.4.2.5.3.- Determinación de la concentración de flavonoides totales..... | 109 |
| 5.4.2.5.4.- Determinación de la concentración de antocianinas totales..... | 109 |

| | |
|---|------------|
| 5.4.2.5.5.- Determinación de la capacidad antioxidante..... | 109 |
| 5.4.2.5.5.1.- Método de FRAP..... | 109 |
| 5.4.2.5.5.2.- Método de DPPH..... | 109 |
| 5.4.2.6.- Análisis estadístico | 109 |
| 5.4.3- Resultados y discusión | 109 |
| 5.4.3.1.- Concentración de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante de lechugas a cosecha y luego de tres días de almacenamiento postcosecha..... | 109 |
| 5.4.3.2.- Efecto de la temperatura y atmosfera de almacenamiento en la concentración de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante de lechugas luego de tres días de almacenamiento postcosecha..... | 112 |
| 5.4.4.- Conclusiones | 113 |
| 5.4.5.- Bibliografía | 115 |
| 6.- Capítulo 2: Corte y salinidad por cloruro de sodio (NaCl) como factores estresores | 117 |
| 6.1.- Determinación de las concentraciones de cloruro de sodio (NaCl) a utilizar en los experimentos | 117 |
| 6.1.1.- Introducción..... | 117 |
| 6.1.2.- Metodología..... | 118 |
| 6.1.2.1.- Material vegetal y condiciones de cultivo | 118 |
| 6.1.2.2.- Montaje y diseño experimental | 118 |
| 6.1.2.3.- Parámetros de crecimiento de las plantas (MF, MS, %MS)..... | 119 |
| 6.1.2.4.- Determinación de compuestos funcionales..... | 119 |
| 6.1.2.4.1.- Extracción de las fracciones fenólicas | 119 |
| 6.1.2.4.2.- Determinación de la concentración de fenoles totales..... | 119 |
| 6.1.2.4.3.- Determinación de la capacidad antioxidante..... | 119 |
| 6.1.2.4.3.1.- Método de FRAP..... | 119 |
| 6.1.2.4.3.2.- Método de DPPH..... | 119 |
| 6.1.2.5.- Análisis estadístico | 119 |
| 6.1.3.- Resultados y discusión | 119 |
| 6.1.3.1.- Masa fresca y seca de las plantas (MF, % MS)..... | 119 |
| 6.1.3.2.- Determinación de compuestos funcionales..... | 123 |
| 6.1.4.- Conclusiones | 126 |
| 6.1.5.- Bibliografía | 127 |
| 6.2.- Efecto de la aplicación de diferentes concentraciones de cloruro de sodio (NaCl) y la realización de cosechas sucesivas sobre el rendimiento y concentración de compuestos fenólicos de lechugas Lollo Bionda cv. 'Levistro' y Lollo Rosso cv. 'Carmolí' | 129 |

| | |
|--|------------|
| 6.2.1.- Introducción..... | 129 |
| 6.2.2.- Metodología..... | 130 |
| 6.2.2.1- Material vegetal y condiciones de cultivo..... | 130 |
| 6.2.2.2.- Montaje del ensayo y diseño experimental | 130 |
| 6.2.2.3.- Parámetros de crecimiento de las plantas (MF, MS, % MS)..... | 132 |
| 6.2.2.4.- Parámetros de color (L, C*, hue)..... | 132 |
| 6.2.2.5.-Determinación de compuestos funcionales..... | 132 |
| 6.2.2.5.1- Extracción de las fracciones fenólicas..... | 132 |
| 6.2.2.5.2.- Determinación de la concentración de fenoles totales..... | 132 |
| 6.2.2.5.3.- Determinación de la concentración de flavonoides totales..... | 132 |
| 6.2.2.5.4.- Determinación de la concentración de antocianinas totales..... | 132 |
| 6.2.2.5.5.- Determinación de la capacidad antioxidante..... | 133 |
| 6.2.2.5.5.1.- Método de FRAP..... | 133 |
| 6.2.2.5.5.2.- Método de DPPH..... | 133 |
| 6.2.2.6.- Determinación de la concentración de prolina | 133 |
| 6.2.2.7.- Análisis de la anatomía celular foliar..... | 133 |
| 6.2.2.7.1.- Determinación de la densidad estomática, densidad celular e índice estomático..... | 133 |
| 6.2.2.7.2.- Análisis histológico para la determinación del espacio intercelular foliar | 133 |
| 6.2.2.8.- Análisis estadístico | 134 |
| 6.2.3.- Resultados y discusión | 134 |
| 6.2.3.1.- Efecto del cloruro de sodio y el tiempo de cosecha en lechugas tipo Lollo Bionda y Lollo Rosso..... | 134 |
| 6.2.3.1.1.- Parámetros de crecimiento de las plantas | 134 |
| 6.2.3.1.2.- Parámetros de color | 136 |
| 6.2.3.1.3.- Concentración de fenoles, flavonoides, antocianinas totales y capacidad antioxidante..... | 136 |
| 6.2.3.1.4.- Concentración de prolina total..... | 140 |
| 6.2.3.1.5.- Densidad estomática y celular y espacio intercelular | 143 |
| 6.2.4.- Conclusiones | 148 |
| 6.2.5.- Bibliografía | 149 |
| 6.3.- Efecto de la aplicación de diferentes concentraciones de cloruro de sodio (NaCl) sobre el rendimiento y concentración de compuestos fenólicos de lechugas Lollo Bionda cv. 'Levistro' y Lollo Rosso cv. 'Carmolí y su identificación por cromatografía líquida..... | 153 |

| | |
|---|-----|
| 6.3.1.- Introducción..... | 153 |
| 6.3.2.- Metodología..... | 153 |
| 6.3.2.1- Material vegetal y condiciones de cultivo..... | 153 |
| 6.3.2.2.- Montaje del ensayo y diseño experimental | 155 |
| 6.3.2.3.- Parámetros de crecimiento de las plantas (MF, MS, % MS)..... | 155 |
| 6.3.2.4.- Parámetros de color (L, C*, hue) | 155 |
| 6.3.2.5.-Determinación de compuestos funcionales..... | 155 |
| 6.3.2.5.1- Extracción de las fracciones fenólicas | 155 |
| 6.3.2.5.2.- Determinación de la concentración de fenoles totales..... | 155 |
| 6.3.2.5.3.- Determinación de la concentración de flavonoides totales..... | 155 |
| 6.3.2.5.4.- Determinación de la concentración de antocianinas totales..... | 156 |
| 6.3.2.5.5.- Determinación de la capacidad antioxidante..... | 156 |
| 6.3.2.5.5.1.- Método de FRAP..... | 156 |
| 6.3.2.5.5.2.- Método de DPPH..... | 156 |
| 6.3.2.6.- Cuantificación e identificación de compuestos fenólicos por UPLC..... | 156 |
| 6.3.2.7.- Cuantificación e identificación de antocianinas por UPLC | 156 |
| 6.3.2.8. Análisis estadístico | 156 |
| 6.3.3.- Resultados y discusión | 157 |
| 6.3.3.1.- Rendimiento de lechugas tipo Lollo Bionda y Lollo Rosso cultivadas con diferentes dosis de cloruro de sodio | 157 |
| | 159 |
| 6.3.3.2.- Color de lechugas tipo Lollo Bionda y Lollo Rosso cultivadas con diferentes concentraciones de cloruro de sodio | 160 |
| 6.3.3.3.- Concentración de fenoles, flavonoides, antocianinas totales y capacidad antioxidante en lechugas tipo Lollo Bionda y Lollo Rosso cultivadas con diferentes concentraciones de cloruro de sodio | 160 |
| 6.3.3.4.- Concentración de ácidos fenólicos y flavonoides en lechugas tipo Lollo Bionda y Lollo Rosso cultivadas con diferentes concentraciones de cloruro de sodio | 164 |
| 6.3.3.5.- Concentración de antocianinas en lechugas tipo Lollo Rosso cultivadas con diferentes concentraciones de cloruro de sodio..... | 167 |
| 6.3.4.- Conclusiones | 168 |
| 6.3.5.- Bibliografía | 169 |
| 6.4.- Efecto del uso de estrategias de postcosecha que involucran bajas temperaturas en combinación con una concentración de gases con bajo O₂ y moderado CO₂, en la concentración de compuestos fenólicos lechugas tipo Lollo Bionda cv. 'Levistro' y Lollo Rosso | |

| | |
|---|------------|
| cv. 'Carmolí', provenientes de un tratamiento de campo con adición de NaCl en la solución nutritiva | 172 |
| 6.4.1.- Introducción | 172 |
| 6.4.2- Metodología..... | 172 |
| 6.4.2.1.- Material vegetal y condiciones de cultivo | 172 |
| 6.4.2.2.- Mínimo procesamiento en fresco | 173 |
| 6.4.2.3.- Montaje y diseño experimental | 173 |
| 6.4.2.4.- Monitoreo concentración de gases dentro de la bolsa | 173 |
| 6.4.2.5.-Determinación de compuestos funcionales..... | 173 |
| 6.4.2.5.1- Extracción de las fracciones fenólicas | 173 |
| 6.4.2.5.2.- Determinación de la concentración de fenoles totales..... | 173 |
| 6.4.2.5.3.- Determinación de la concentración de flavonoides totales..... | 176 |
| 6.4.2.5.4.- Determinación de la concentración de antocianinas totales..... | 176 |
| 6.4.2.5.5.- Determinación de la capacidad antioxidante..... | 176 |
| 6.4.2.5.5.1.- Método de FRAP..... | 176 |
| 6.4.2.5.5.2.- Método de DPPH..... | 176 |
| 6.4.2.6.- Análisis estadístico | 176 |
| 6.4.3.- Resultados y discusión | 176 |
| 6.4.3.1.- Concentración de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante de lechugas a cosecha y luego de tres días de almacenamiento postcosecha | 176 |
| 6.4.3.2.- Efecto de la temperatura y atmosfera de almacenamiento en la concentración de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante de lechugas luego de tres días de almacenamiento postcosecha..... | 180 |
| 6.4.4.- Conclusiones | 180 |
| 6.4.5.- Bibliografía | 182 |
| 7.- Conclusiones generales..... | 184 |
| 8.- Agradecimientos | 186 |

Índice figuras

| | |
|--|-----|
| Figura 1.1. Rangos de absorción de la luz de las clorofilas a, b y del α -caroteno. | 22 |
| Figura 1.2. Foto receptores presentes en las plantas y sus longitudes de onda asociadas. 23 | |
| Figura 5.1. Montaje diseño determinación de dosis de radiación UV-B..... | 44 |
| Figura 5.2. Efecto de diferentes dosis de radiación UV-B sobre hojas de lechuga cv. 'Levistro'. | 46 |
| Figura 5.3. Porcentaje de masa seca de lechugas tipo Lollo Bionda cv. 'Levistro' cultivadas con diferentes dosis acumuladas de radiación UV-B. | 47 |
| Figura 5.4. Concentración de fenoles totales en lechugas tipo Lollo Bionda cv. 'Levistro' cultivadas con diferentes dosis acumuladas de radiación UV-B..... | 48 |
| Figura 5.5. Capacidad antioxidante determinada por FRAP y DPPH para lechugas tipo Lollo Bionda cv. 'Levistro' cultivadas con diferentes dosis acumuladas de radiación UV-B..... | 49 |
| Figura 5.6. Temperaturas medias mínimas y máximas del aire en el invernadero y temperaturas de la solución nutritiva, conductividad eléctrica, pH y concentración de oxígeno disuelto de la solución nutritiva y radiación total global registradas durante el cultivo. | 56 |
| Figura 5.7. Masa fresca (MF) y porcentaje de masa seca (%MS) para lechugas Lollo Bionda cv. 'Levistro' y Lollo Rosso cv. 'Carmolí' luego de la realización (con) o la no realización (sin) de un corte previo durante tres tiempos de cosecha. | 61 |
| Figura 5.8. Luminosidad, croma y ángulo hue en lechugas tipo Lollo Bionda cv. 'Levistro' y tipo Lollo Rosso cv. 'Carmolí' luego de la realización (con) o la no realización (sin) de un corte previo durante tres tiempos de cosecha..... | 62 |
| Figura 5.9. Masa fresca (MF) y porcentaje de masa seca (% MS) de lechugas Lollo Bionda 'Levistro' y Lollo Rosso 'Carmolí' durante tres tiempos de cosecha cultivadas con diferentes dosis de radiación UV-B..... | 67 |
| Figura 5.10. Luminosidad, saturación o croma y ángulo hue en lechugas Lollo Bionda 'Levistro' y Lollo Rosso 'Carmolí' durante tres tiempos de cosecha cultivadas con diferentes dosis de radiación UV-B..... | 68 |
| Figura 5.11. Daño visual en hojas de lechuga inducido por la radiación UV-B. | 69 |
| Figura 5.12. Imágenes del corte transversal del tejido foliar de hojas lechuga Lollo Bionda cv. 'Levistro' cultivadas con diferentes dosis de radiación UV-B. | 78 |
| Figura 5.13. Imágenes del corte transversal del tejido foliar de hojas lechuga Lollo Rosso cv. 'Carmolí' cultivadas con diferentes dosis de radiación UV-B..... | 79 |
| Figura 5.14. Temperaturas medias mínimas y máximas del aire en el invernadero y temperaturas de la solución nutritiva, conductividad eléctrica, pH y oxígeno disuelto en la solución nutritiva y radiación total global registradas durante el cultivo. | 85 |
| Figura 5.15. Imagen del tamaño comparativo de lechugas Lollo Bionda cv. 'Levistro' y Lollo Rosso cv. 'Carmolí' cultivadas con diferentes dosis de radiación UV-B..... | 90 |
| Figura 5.16. Masa fresca (MF) de lechugas Lollo Bionda cv. 'Levistro' y Lollo Rosso cv. 'Carmolí' cultivadas con diferentes dosis de radiación UV-B..... | 91 |
| Figura 5.17. Porcentaje de masa seca (%MS) de lechugas Lollo Bionda cv. 'Levistro' y Lollo Rosso cv. 'Carmolí' cultivadas con diferentes dosis de radiación UV-B..... | 91 |
| Figura 5.18. Cromatograma comparativo para lechugas Lollo Bionda cv. 'Levistro' y Lollo Rosso cv. 'Carmolí'..... | 95 |
| Figura 5.19. Cromatograma de antocianinas presente en lechugas Lollo Rosso 'Carmolí'.. | 96 |
| Figura 5.20. Concentración de gases a 5°C dentro de las bolsas de lechugas provenientes de diferentes tratamientos con radiación UV-B. | 107 |

| | |
|---|-----|
| Figura 5.21. Concentración de gases a 10 °C dentro de las bolsas de lechugas provenientes de diferentes tratamientos con radiación UV-B. | 108 |
| Figura 6.1. Imágenes del tamaño comparativo de lechugas tipo Lollo Bionda cv. ‘Levistro’ (arriba) y lechugas tipo Lollo Rosso cv. ‘Carmolí’ (abajo) cultivadas con diferentes concentraciones de NaCl. | 121 |
| Figura 6.2. Masa fresca de lechugas tipo Lollo Bionda cv. ‘Levistro’ y tipo Lollo Rosso cv. ‘Carmolí’ cultivadas con diferentes concentraciones de NaCl. | 122 |
| Figura 6.3. Masa seca de lechugas tipo Lollo Bionda cv. ‘Levistro’ y tipo Lollo Rosso cv. ‘Carmolí’ cultivadas con diferentes concentraciones de NaCl. | 122 |
| Figura 6.4. Concentración de fenoles totales en lechugas tipo Lollo Bionda cv. ‘Levistro’ y Lollo Rosso cv. ‘Carmolí’ (abajo) cultivadas con diferentes concentraciones de NaCl. | 124 |
| Figura 6.5. Capacidad antioxidante determinada por el método de FRAP para lechugas tipo Lollo Bionda cv. ‘Levistro’ y Lollo Rosso cv. ‘Carmolí’ cultivadas con diferentes concentraciones de NaCl. | 125 |
| Figura 6.6. Capacidad antioxidante determinada por el método de DPPH para lechugas tipo Lollo Bionda cv. ‘Levistro’ y Lollo Rosso cv. ‘Carmolí’ cultivadas con diferentes concentraciones de NaCl. | 125 |
| Figura 6.7. Temperaturas medias mínimas y máximas del aire en el invernadero y temperaturas de la solución nutritiva, conductividad eléctrica, pH y concentración de oxígeno disuelto de la solución nutritiva registradas durante el cultivo. | 131 |
| Figura 6.8. Masa fresca (MF) y porcentaje de masa seca (%MS) de lechugas Lollo Bionda ‘Levistro’ y Lollo Rosso ‘Carmolí’ durante tres tiempos de cosecha cultivadas con diferentes concentraciones de NaCl. | 135 |
| Figura 6.9. Luminosidad, saturación o croma y ángulo hue en lechugas Lollo Bionda cv. ‘Levistro’ y Lollo Rosso cv. ‘Carmolí’ durante tres tiempos de cosecha cultivadas con diferentes concentraciones de NaCl. | 137 |
| Figura 6.10. Imágenes del corte transversal del tejido foliar de hojas lechuga Lollo Bionda cv. ‘Levistro’ cultivadas con diferentes concentraciones de NaCl. | 146 |
| Figura 6.11. Imágenes del corte transversal del tejido foliar de hojas lechuga Lollo Rosso cv. ‘Carmolí’ cultivadas con diferentes concentraciones de NaCl. | 147 |
| Figura 6.12. Temperaturas medias mínimas y máximas del aire en el invernadero y temperaturas de la solución nutritiva, conductividad eléctrica, pH y oxígeno disuelto en la solución nutritiva registradas durante el cultivo. | 154 |
| Figura 6.13. Imagen del tamaño comparativo de lechugas tipo Lollo Bionda cv. ‘Levistro’ y lechugas tipo Lollo Rosso cv. ‘Carmolí’ cultivadas con diferentes concentraciones de NaCl. | 158 |
| Figura 6.14. Masa fresca (MF) de lechugas tipo Lollo Bionda cv. ‘Levistro’ y tipo Lollo Rosso cv. ‘Carmolí’ cultivadas con diferentes concentraciones de NaCl. | 159 |
| Figura 6.15. Porcentaje de masa seca (%MS) de lechugas tipo Lollo Bionda cv. ‘Levistro’ y Lollo Rosso cv. ‘Carmolí’ cultivadas con diferentes concentraciones de NaCl. | 159 |
| Figura 6.16. Concentración de gases a 5°C dentro de las bolsas de lechugas provenientes de diferentes tratamientos con NaCl. | 174 |
| Figura 6.17. Concentración de gases a 10 °C dentro de las bolsas de lechugas provenientes de diferentes tratamientos con NaCl. | 175 |

Índice tablas

| | |
|--|-----|
| Tabla 5.1. Concentración de fenoles, flavonoides, antocianinas totales y capacidad antioxidante para lechugas Lollo Bionda cv. 'Levistro' y Lollo Rosso cv. 'Carmolí', luego de la realización (con) o la no realización (sin) de un corte previo durante tres tiempos de cosecha..... | 66 |
| Tabla 5.2. Concentración de fenoles, flavonoides, antocianinas totales y capacidad antioxidante para lechugas Lollo Bionda cv. 'Levistro' y Lollo Rosso cv. 'Carmolí' luego de la aplicación de diferentes dosis de radiación UV-B durante tres cosechas sucesivas. | 72 |
| Tabla 5.3. Concentración de prolina para lechugas Lollo Bionda cv. 'Levistro' y Lollo Rosso cv. 'Carmolí' luego de la aplicación de diferentes dosis de radiación UV-B durante tres cosechas sucesivas..... | 73 |
| Tabla 5.4. Densidad estomática, densidad celular e índice estomático para lechugas Lollo Bionda cv. 'Levistro' y Lollo Rosso cv. 'Carmolí' luego de la aplicación de diferentes dosis de radiación UV-B durante tres cosechas sucesivas. | 76 |
| Tabla 5.5. Espacio intercelular de lechugas Lollo Bionda cv. 'Levistro' y Lollo Rosso cv. 'Carmolí' luego de la aplicación de diferentes dosis de radiación UV-B..... | 77 |
| Tabla 5.6. Luminosidad, saturación o croma y ángulo hue de lechugas Lollo Bionda cv. 'Levistro' y Lollo Rosso cv. 'Carmolí' cultivadas con diferentes dosis acumuladas de radiación UV-B. | 92 |
| Tabla 5.7. Concentración de fenoles, flavonoides, antocianinas totales y capacidad antioxidante para lechugas Lollo Bionda cv. 'Levistro' y Lollo Rosso cv. 'Carmolí' cultivadas con diferentes dosis acumuladas de radiación UV-B..... | 94 |
| Tabla 5.8. Concentración de ácidos fenólicos, obtenida por UPLC, para lechuga Lollo Bionda cv. 'Levistro' cultivada con diferentes dosis acumuladas de radiación UV-B..... | 97 |
| Tabla 5.9. Concentración de flavonoides, obtenida por UPLC, para lechuga Lollo Bionda cv. 'Levistro' cultivada con diferentes dosis acumuladas de radiación UV-B..... | 97 |
| Tabla 5.10. Concentración de ácidos fenólicos, obtenida por UPLC, para lechuga Lollo Rosso cv. 'Carmolí' cultivada con diferentes dosis acumuladas de radiación UVB. | 98 |
| Tabla 5.11. Concentración de flavonoides obtenida por UPLC, para lechuga Lollo Rosso cv. 'Carmolí' cultivada con diferente dosis acumulada de radiación UV-B. | 98 |
| Tabla 5.12. Concentración de antocianinas obtenida por UPLC, para lechuga Lollo Rosso cv. 'Carmolí' cultivadas con diferentes dosis acumuladas de radiación UV-B..... | 99 |
| Tabla 5.13. Concentración a cosecha de fenoles, flavonoides, antocianinas totales y capacidad antioxidante (FRAP y DPPH) de lechuga Lollo Bionda 'Levistro' y Lollo Rosso 'Carmolí' cultivadas con diferentes dosis acumuladas de radiación UV-B..... | 111 |
| Tabla 5.14. Concentración de fenoles, flavonoides, antocianinas totales y capacidad antioxidante (FRAP y DPPH) de lechuga Lollo Bionda 'Levistro' y Lollo Rosso 'Carmolí' cultivadas con diferentes dosis acumuladas de radiación UV-B luego de 3 días de almacenamiento utilizando diferentes temperaturas y atmósferas. | 114 |

| | |
|---|-----|
| Tabla 6.1. Concentración de NaCl en la solución nutritiva (mol L^{-1}) y sus respectivas conductividades eléctricas (CE: dS m^{-1}) para los diferentes tratamientos utilizados. | 118 |
| Tabla 6.2. Rendimiento empírico de lechugas cvs. 'Levistro' y 'Carmolí' según la conductividad eléctrica. | 120 |
| Tabla 6.3. Concentración de fenoles, flavonoides, antocianinas totales y capacidad antioxidante para lechugas Lollo Bionda cv. 'Levistro' y Lollo Rosso cv. 'Carmolí', crecidas con diferentes concentraciones de NaCl durante tres cosechas sucesivas. | 141 |
| Tabla 6.4. Concentración de prolina para lechugas Lollo Bionda cv. 'Levistro' y Lollo Rosso cv. 'Carmolí' crecidas con diferentes concentraciones de NaCl durante tres cosechas sucesivas. | 142 |
| Tabla 6.5. Densidad estomática, densidad celular e índice estomático para lechugas Lollo Bionda cv. 'Levistro' y Lollo Rosso cv. 'Carmolí' crecidas con diferentes concentraciones de NaCl durante tres cosechas sucesivas. | 144 |
| Tabla 6.6. Espacio intercelular de lechugas Lollo Bionda cv. 'Levistro' y Lollo Rosso cv. 'Carmolí' crecidas con diferentes concentraciones de NaCl. | 145 |
| Tabla 6.7. Luminosidad, saturación o croma y ángulo hue de lechugas tipo Lollo Bionda cv. 'Levistro' y Lollo Rosso cv. 'Carmolí', cultivadas con diferentes concentraciones de NaCl. | 161 |
| Tabla 6.8. Concentración de fenoles, flavonoides, antocianinas totales y capacidad antioxidante para lechugas Lollo Bionda cv. 'Levistro' y Lollo Rosso cv. 'Carmolí', cultivadas con diferentes dosis de NaCl incorporada en la solución nutritiva. | 163 |
| Tabla 6.9. Concentración de ácidos fenólicos, obtenida por UPLC, para lechuga tipo Lollo Bionda cv. 'Levistro' cultivada con diferentes concentraciones de NaCl. | 165 |
| Tabla 6.10. Concentración de flavonoides, obtenida por UPLC, para lechuga tipo Lollo Bionda cv. 'Levistro' cultivada con diferentes concentraciones de NaCl. | 165 |
| Tabla 6.11. Concentración de ácidos fenólicos, obtenida por UPLC, para lechuga tipo Lollo Rosso cv. 'Carmolí' cultivada con diferentes concentraciones de NaCl. | 166 |
| Tabla 6.12. Concentración de flavonoides obtenida por UPLC, para lechuga tipo Lollo Rosso cv. 'Carmolí' cultivada con diferentes concentraciones de NaCl. | 167 |
| Tabla 6.13. Concentración de antocianinas obtenida por UPLC, para lechuga tipo Lollo Rosso cv. 'Carmolí' cultivadas con diferentes concentraciones de NaCl. | 167 |
| Tabla 6.14. Concentración a cosecha de fenoles, flavonoides, antocianinas totales y capacidad antioxidante (FRAP y DPPH) de lechugas Lollo Bionda 'Levistro' y Lollo Rosso 'Carmolí' cultivadas bajo diferentes concentraciones de NaCl. | 178 |
| Tabla 6.15. Concentración de fenoles, flavonoides, antocianinas totales y capacidad antioxidante (FRAP y DPPH) lechuga Lollo Bionda 'Levistro' y Lollo Rosso 'Carmolí' cultivadas bajo diferentes concentraciones de NaCl luego de 3 días de almacenamiento bajo diferentes temperaturas y atmósferas. | 179 |

Abreviaturas

| | |
|-------------------------------|--|
| (C): | Carmolí |
| (L): | Levistro |
| *OH: | Radical hidroxilo |
| 1 ^a : | Primera |
| ¹ O ₂ : | Oxígeno singlete |
| 2 ^a : | Segunda |
| 3 ^a : | Tercera |
| 4CL: | Enzima 4-cumarato- CoA ligasa |
| A: | Absorbancia |
| ADN: | Ácido desoxirribonucleico |
| AlCl ₃ : | Cloruro de aluminio |
| ANOVA: | Análisis de varianza |
| APX: | Enzima ascorbato peroxidasa |
| ARN: | Ácido ribonucleico |
| ARNm: | Ácido ribonucleico mensajero |
| AsA: | Ácido ascórbico |
| B: | Boro |
| <i>B. parviflora:</i> | <i>Buddleja parviflora</i> |
| C*: | Croma o saturación de color |
| <i>C. gloeosporioide:</i> | <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> |
| C4H: | Enzima cinamato-4-hidroxilasa |
| CA: | Capacidad antioxidante |
| Ca: | Calcio |
| CaCl ₂ : | Cloruro de calcio |
| CAT: | Enzima catalasa |
| cc: | con corte |
| CE: | Conductividad eléctrica |
| CEPOC: | Centro de Estudios Postcosecha |
| CH ₃ COOH: | Ácido acético |
| CHI: | Enzima chalcona isomerasa |
| CHS: | Enzima chalcona sintasa |
| Cian3gluc: | Cianidina 3-Glucosido |
| CIE: | Comission Internationale de l'Eclairage, nombre francés de la Comisión Internacional sobre la Iluminación. |
| Cl ⁻ : | Ion cloruro |
| CO ₂ : | Dióxido de carbono |
| Cu: | Cobre |
| cv.: | Cultivar |
| DPPH: | 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo |
| EAG: | Equivalentes de ácido gálico |
| EAM: | Envasado en atmósfera modificada |
| EE: | Error estándar |
| EE. UU.: | Estados unidos |
| ei: | Epidermis inferior |
| ein: | Espacio intercelular |
| Eq: | Equivalente |

| | |
|-----------------------------------|---|
| EROs: | Especies reactivas de oxígeno |
| es: | Epidermis superior |
| ϵ : | Coeficiente de extinción molar |
| F3H: | Enzima flavanona 3-hidroxilasa |
| FAA: | Solución formaldehído, alcohol, acético |
| FAO: | Food and Agriculture Organization of the United Nations |
| FD: | Factor de dilución |
| Fe: | Hierro |
| FeCl ₃ : | Cloruro de hierro III |
| FKF1: | Fotorreceptor proteína KELCH REPEAT F-BOX1 |
| FLS1: | Enzima flavonol sintasa 1 |
| FRAP: | Ferric Reducing Antioxidant Power |
| FT: | Fenoles totales |
| GSH: | Glutación |
| H ₂ O: | Agua |
| H ₂ O ₂ : | Peróxido de hidrógeno |
| H ₂ PO ₄ : | Fosfato |
| HCl: | Ácido clorhídrico |
| HCOOH: | Ácido fórmico |
| HSD: | Honestly Significant Difference |
| Hue: | Ángulo hue |
| hv: | Haz vascular |
| IE: | Índice estomático |
| INTA: | Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos |
| ISTA: | International Seed Testing Association |
| K: | Potasio |
| L: | Luminosidad |
| l: | Largo cubeta |
| LKP2: | Fotorreceptor proteína Lov Kelch Protein 2 |
| LLDPE: | Polietileno lineal de baja densidad |
| LSD: | Least significant difference |
| Max: | Máximo |
| MeOH: | Metanol |
| MF: | Masa fresca |
| Mg: | Magnesio |
| Min: | Mínimo |
| Mn: | Manganeso |
| Mo: | Molibdeno |
| MS: | Masa seca |
| <i>n</i> : | Número de muestras |
| N° | Número |
| N ₂ : | Nitrógeno |
| Na ⁺ : | Ion sodio |
| Na ₂ CO ₃ : | Carbonato de sodio |
| NaCl: | Cloruro de sodio |
| NADPH: | Nicotiamida-Adenina dinucleótido fosfato |
| NaNO ₂ : | Nitrito de sodio |
| NaOH: | Hidróxido de sodio |

| | |
|-------------------------------|--|
| NFT: | Nutrient Film Technique |
| NH ₄ : | Amonio |
| NO ₃ : | Nitrato |
| ns: | No significativo |
| O ₂ : | Oxígeno |
| O ₂ [*] : | Anión superóxido |
| OD: | Oxígeno disuelto |
| ODEPA: | Oficina de Estudios y Políticas Agrarias |
| ORAC: | Oxygen Radical Absorbance Capacity |
| PAL: | Enzima fenilalanina amonio-liasa |
| PAR: | Photosynthetic Active Radiation |
| PAS: | Ácido peryódico de Schiff |
| PC: | Policarbonato |
| PDA: | Photo diode array detector |
| PE: | Polietileno |
| pe: | Parénquima empalizado |
| pes: | Parénquima esponjoso |
| PM: | Peso molecular |
| POD: | Enzima peroxidasa |
| PP: | Polipropileno |
| PSII: | Fotosistema II |
| PsP5CS1: | Gen que codifica para la proteína D1-pirrolina-5-carboxilato sintetasa |
| PsP5CS2: | Gen que codifica para la proteína D1-pirrolina-5-carboxilato sintetasa |
| PsPDH1: | Gen que codifica la prolina deshidrogenasa |
| PTFE: | Politetrafluoroetileno |
| PVDF: | Polyvinylidene Difluoride |
| Rut: | Rutina |
| S.A.: | Sociedad anónima |
| sc: | Sin corte |
| SO ₄ : | Sulfato |
| SOD: | Enzima superóxido dismutasa |
| TPTZ: | 2,4,6-tripiridil-s-triazina |
| UPLC: | Ultra Performance Liquid Chromatography |
| UV: | Ultravioleta |
| UV-A: | Ultravioleta A |
| UV-B: | Ultravioleta B |
| UV-C: | Ultravioleta C. |
| UVR8: | UV-B resistance locus 8, receptor de radiación UV-B |
| v/v: | Relación volúmen-volúmen |
| Vis: | Visible |
| Zn: | Zinc |
| ZTL: | Fotorreceptor proteína Zeitlupe |
| λ: | Longitud de onda |

Unidades de medida

| | |
|-------|-------------------------------|
| °C: | Grados Celsius |
| µg: | Microgramo |
| µL: | Microlitros |
| µm: | Micrómetro |
| µmol: | Micro mol |
| cm: | Centímetro |
| dS: | Deci siemens |
| g: | Gramo |
| h: | Hora |
| ha: | Hectárea |
| kg: | Kilogramo |
| kJ: | Litro |
| m: | Metro |
| M: | Molar; Moles L ⁻¹ |
| mg: | Miligramo |
| min: | Minuto |
| mL: | Mililitros |
| mm: | Milímetro |
| mM: | Milimolar |
| msnm: | Metros sobre el nivel del mar |
| nm: | Nanómetros |
| s: | Segundo |
| t: | Toneladas |
| °: | Grado |

1.- Introducción

1.1.- Tendencias en la alimentación: compuestos funcionales y efectos en la salud humana.

Las dietas ricas en frutas y hortalizas han sido asociadas con un menor riesgo de padecer enfermedades como obesidad, diabetes, cáncer y enfermedades cardiovasculares. Este efecto protector ha sido atribuido a la presencia de ciertos metabolitos secundarios (Nicolle *et al.*, 2004; Amodio *et al.*, 2014; Pérez-López *et al.*, 2018). A este conjunto de metabolitos presentes en los alimentos que tienen efectos positivos en la salud humana, también se les denomina compuestos bioactivos (Biesalski *et al.*, 2009). Por otro lado, un alimento funcional es aquel que contiene naturalmente compuestos bioactivos proporcionando beneficios para la salud más allá del valor nutricional básico del producto (Biesalski *et al.*, 2009). Uno de los compuestos bioactivos más conocidos son los compuestos antioxidantes como la vitamina C, polifenoles, vitamina E y carotenoides (Nicolle *et al.*, 2004). En la actualidad, estos compuestos antioxidantes han ganado la atención tanto de los investigadores como de del propio consumidor, quien es más consciente de los beneficios que estos compuestos pueden entregar a su salud (Khanam *et al.*, 2012; Martínez-Ispizua *et al.*, 2022). Los antioxidantes pueden retrasar la oxidación de otras moléculas al inhibir la iniciación o propagación de reacciones en cadena oxidantes causadas por radicales libres y, por lo tanto, pueden reducir el daño oxidativo (Nicolle *et al.*, 2004; Khanam *et al.*, 2012).

Tal es el incremento del interés por los alimentos funcionales que desde 2014, la “Food Technology” mantiene una publicación especial para ellos denominada “The Top Ten Functional Food Trends”. En la publicación de 2014 se reportó que ocho de cada diez consumidores creen que los alimentos funcionales pueden ayudar a prevenir o retrasar la aparición de enfermedades cardíacas, hipertensión, osteoporosis y diabetes tipo 2 (Sloan, 2014). En esta revisión se reportó también que la generación nacida entre 1981 y 2000 (Millenials) ven la elección de sus alimentos como más sana, más cara, más natural u orgánica, menos procesada y con mejor sabor, que la generación de sus padres, siendo la frescura de los alimentos el criterio más importante. Se argumentó también que esta generación es incluso propensa a creer que se pueden utilizar alimentos o bebidas funcionales en lugar de algunos medicamentos (Sloan, 2014). En el informe de 2016, se reitera la creencia de que los alimentos frescos proporcionan un mayor aporte nutricional. Se considera que estos alimentos tienen el potencial de contribuir a la prevención y mitigación de diversos problemas de salud, como el fomento de la salud digestiva, el incremento de la energía y la inmunidad, la mejora de la salud de las articulaciones y los huesos, así como la reducción del colesterol y la presión arterial elevada. Además, se les atribuye un papel importante en el control del peso corporal (Sloan, 2016). Para nueve de cada diez consumidores la afirmación “contiene una ración completa de frutas u hortalizas” es la que transmite un mensaje de salud más claro. En este reporte se hace también referencia por primera vez a los alimentos e ingredientes mínimamente procesados como una de las principales tendencias culinarias (Sloan, 2016). Un último aspecto por destacar del reporte publicado en 2016 es que el 51 % de los consumidores hizo un esfuerzo para incorporar específicamente más antioxidantes en su dieta y que seis de diez prefiere incorporarlos desde los alimentos (Sloan, 2016). Para 2018 la salud y el bienestar continúan impulsando el crecimiento en la industria mundial de alimentos y bebidas (Sloan, 2018). Según este autor, la cualidad de los alimentos de promover la buena salud tuvo un impacto significativo en la decisión de compra de los consumidores. En este reporte se hace referencia a que el consumidor estadounidense cambió su decisión de compra de alimentos desde una basada principalmente en la presentación a una basada en los beneficios del producto. Debido a lo anterior, la industria de

alimentos opta por técnicas de procesamiento que mejoren los beneficios nutricionales del producto (Sloan, 2018).

Para el año 2020, los alimentos funcionales son cada vez más influyentes en el servicio de comidas. Los alimentos ricos en proteínas, hortalizas y los súper alimentos son los más atractivos (Sloan, 2020). Según el reporte de ese año, un 82 % de los consumidores adultos estuvieron totalmente de acuerdo en que es importante comer alimentos que sean una fuente naturalmente rica en vitaminas y minerales, siendo la declaración “Una buena fuente de vitaminas y minerales” la preferida por estos (Sloan, 2020). En este sentido, más de la mitad (56 %) de los adultos están interesados en comer más súper-alimentos y cuatro de cada 10 personas están incorporando antioxidantes a la dieta. Además, las soluciones rápidas, fáciles y ricas en nutrientes continúan impulsando el crecimiento en el mercado de la nutrición funcional (Sloan, 2020). Cabe destacar que seis de cada 10 consumidores creen que los productos cultivados hidropónicamente son más nutritivos que las hortalizas cultivadas de forma convencional (Sloan, 2020). En general, las tendencias reflejan el creciente interés de los consumidores por la salud, el bienestar y la sostenibilidad, lo cual se traduce en un incremento en el consumo de alimentos de origen vegetal y una creciente demanda de productos frescos como las hortalizas de hoja con una alta concentración de compuestos antioxidantes (Liu *et al.*, 2011; Martínez-Ispizua *et al.*, 2022).

1.2.- Lechuga (*Lactuca sativa* L.)

Debido al incremento en el interés por la obtención de hortalizas con alta concentración de compuestos antioxidantes, combinado con la creciente demanda de hojas coloreadas y con diferentes formas y sabores para las ensaladas frescas (Mulabagal *et al.*, 2010), hace que la lechuga (*Lactuca sativa* L.) destaque entre otras especies debido a su alta variedad de tipos, formas, colores y cultivares (Mulabagal *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2016). Así, es importante determinar el tipo de lechuga que proporciona no sólo productos innovadores, sino también que contenga un alto contenido de compuestos con propiedades antioxidantes que promuevan la salud. Entre estos compuestos destacan los polifenoles, sintetizados a través de la ruta de los fenilpropanoides, donde destacan ácidos fenólicos, flavonoides y antocianinas (Lafarga *et al.*, 2020). En la lechuga, diferentes atributos de la planta, como el color de la hoja, pueden influir en la calidad nutricional. Un claro ejemplo es la pigmentación de las hojas, que a menudo se asocia con la presencia de compuestos antioxidantes. La lechuga roja destaca por su actividad antioxidante lipofílica y su contenido en ácido ascórbico y fenólico en comparación con otras hortalizas de hoja (achicoria, lechuga verde, lechuga de cordero, mizuna, acelga roja, lechuga roja, rúcula, espinaca, acelga, tatsoi) (Martínez-Ispizua *et al.*, 2022).

De acuerdo con los datos de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO: del inglés Food and Agriculture Organization of the United Nations), la producción mundial de lechuga y achicoria alcanzó 26.364.722 t en 2015 y se incrementó hasta 27.011.747 t en 2021, ocupando un área de 1.221.899 y 1.213.340 hectáreas, respectivamente (FAO, 2023a).

Según datos de la Oficina de Estudios y Políticas Agrarias (ODEPA), en Chile durante el año 2018, la superficie total cultivada con hortalizas a nivel nacional abarcó 128.906 ha. De este total, 77.221 ha correspondieron a la superficie destinada al cultivo de hortalizas excluyendo la papa y el tomate industrial. A nivel nacional las hortalizas que presentaron las mayores superficies cultivadas en el año 2018 fueron el choclo con 9.899 ha, la cebolla con 8.049 ha, la lechuga con 7.135 ha, el tomate para consumo fresco con 5.294,2 ha, y el zapallo con 3.853,5 ha. En cuanto al tomate destinado a la producción industrial se plantaron 9.874 ha mientras que las papas cubrieron una extensión de 41.811 ha (Muñoz, 2020).

La lechuga es la hortaliza de hojas más popular en las ensaladas, debido a su percepción como producto fresco, saludable y reconocida fuente de fitoquímicos con propiedades funcionales (Llorach *et al.*, 2008; Mulabagal *et al.*, 2010; Pérez-López *et al.*, 2014; Martínez-Ispizua *et al.*, 2022). Se consume fresca, sola o en mezcla de ensaladas, es baja en calorías, grasas y sodio. Por otro lado, es rica en fibra, ácido fólico y vitamina C, y en minerales esenciales como el hierro (Złotek *et al.*, 2014; Kim *et al.*, 2016). La lechuga es también una fuente de otros fitoquímicos y vitaminas que promueven la salud, incluidos los flavonoides glicosilados, los ácidos hidroxicinámicos, los sesquiterpenos, lactonas, carotenoides, vitaminas del grupo B, ácido ascórbico y tocoferoles (Yang *et al.*, 2021). Sus propiedades saludables se atribuyen a sus altas concentraciones en vitaminas E y C, carotenoides, fibra, minerales y polifenoles (Nicolle *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2016). Estos últimos compuestos destacan por sus propiedades antioxidantes capaces de proteger a las células humanas de los efectos perjudiciales de las especies reactivas de oxígeno (EROs) (Romani *et al.*, 2002). En este sentido, Pepe *et al.* (2015) evidenciaron el potencial antioxidante y antiinflamatorio de los polifenoles extraídos de la lechuga. En este estudio, se observó que el extracto de lechuga redujo significativamente la presencia de especies reactivas de oxígeno, disminuyó la liberación de óxido nítrico y reguló a la baja la expresión inducible de las enzimas óxido nítrico sintasa y ciclooxigenasa-2. Estos resultados subrayan cómo el extracto de lechuga contribuyó de manera efectiva a la mitigación del proceso inflamatorio.

Entre los diferentes polifenoles definidos, se ha descrito que los flavonoles y antocianinas, pertenecientes al grupo de los flavonoides, presentan una mayor actividad antioxidante que las vitaminas C y E (Kim y Lee, 2004; Llorach *et al.*, 2008; Pérez-López *et al.*, 2014), destacando el interés por este tipo de compuestos.

Varios autores han estudiado la capacidad antioxidante y los compuestos bioactivos de diferentes cultivares de lechuga, demostrando que las lechugas de hojas rojas versus las de hojas verdes presentan un mayor poder antioxidante (Neveu *et al.*, 2010; Pérez-López *et al.*, 2014). Según la base de datos de la concentración de polifenoles de los alimentos, “Phenol-Explorer” (disponible en <http://phenol-explorer.eu>), el contenido de polifenoles totales depende del tipo de lechuga analizado. Así, una lechuga verde registra un mínimo de 3,7 y un máximo de 131,0 mg 100 g⁻¹ MF con una media de polifenoles totales de 65,92 mg 100 g⁻¹ MF. Mientras que los de tipos coloreados presentan una media mayor, correspondiente a 114,00 mg 100 g⁻¹ MF (Neveu *et al.*, 2010). Por su parte, la base de antioxidantes de hortalizas del Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos (INTA), cuya última actualización fue el mes de septiembre de 2021, muestra que las lechugas frescas crudas de diferentes variedades presentan diferencias en la concentración de polifenoles totales y en la actividad antioxidante media por el método de ORAC del inglés “oxygen radical absorbance capacity”. Así una lechuga tipo Costina posee, en promedio, 34 mg equivalentes de ácido gálico (EAG) de polifenoles totales por cada 100 g de masa fresca y una capacidad a antioxidante de 720 μmol equivalentes (Eq) de Trolox 100 g⁻¹ MF, mientras que una lechuga de tipo Cabeza (escarola) tiene una concentración de 15 mg EAG 100 g⁻¹ MF. Por otra parte, una lechuga tipo hoja suelta como la española posee 164 mg EAG 100 g⁻¹ MF, una francesa 278 mg EAG 100 g⁻¹ MF, y una Milanesa 141 mg EAG 100 g⁻¹ MF. Estas mismas variedades registraron una capacidad antioxidante de 240, 2865, 6760 y 1993 μmol eq Trolox 100 g⁻¹ MF, respectivamente (INTA, 2021). Sin embargo, hay muy poca información sobre los compuestos antioxidantes en los diferentes cultivares (Mulabagal *et al.*, 2010).

Por otro lado, la concentración de antioxidantes de las hortalizas varía dependiendo de sus condiciones de crecimiento y en respuesta al estrés ambiental (Pérez-López *et al.*, 2018). Se ha reportado que incluso una pequeña variación en las condiciones ambientales puede generar una variación significativa en la concentración de compuestos antioxidantes de las hortalizas como la lechuga (Liu *et al.*, 2007; Terfa *et al.*, 2014; Galieni *et al.*, 2015).

1.3.- Función de los compuestos funcionales en las plantas

1.3.1.- Estrés abiótico

El concepto de “estrés” suele ser empleado de manera general por los investigadores, abarcando prácticamente cualquier alteración en la actividad metabólica, el crecimiento y el patrón de desarrollo inducida por factores ambientales, y que puede ser catalogada como una reacción ante situaciones de estrés (Hideg *et al.*, 2012). Los términos “factor de estrés” o “estresor” se utilizan para describir un factor externo impuesto el cual puede provocar un estrés reversible y elástico, también denominado “eustrés”. El eustrés es por tanto un estrés activador en el desarrollo de las plantas bajo el cual la planta es capaz de ajustar su metabolismo y aclimatarse al nuevo entorno. Sin embargo, una vez que la exposición a este factor estresor supera un límite de tolerancia provoca un estrés severo o ‘distrés’ irreversible que tiene un efecto negativo en la planta y su desarrollo y ocurre cuando las condiciones del entorno se vuelven demasiado desfavorables (Hideg *et al.*, 2012). Es importante destacar que la línea que limita el eustrés y el inicio del distrés, no siempre ocurre en las mismas condiciones de exposición al estresor, ya que las plantas pueden aumentar su resistencia al estrés elástico y plástico mediante la adaptación genética y/o la aclimatación fisiológica (Hideg *et al.*, 2012).

Por otro lado, estrés abiótico se refiere a cualquier factor ambiental no vivo que afecta negativamente el crecimiento, el desarrollo y la productividad de las plantas. Algunos ejemplos de estrés abiótico incluyen sequía, salinidad, temperaturas extremas (calientes o frías), inundaciones, toxicidad por metales pesados y deficiencia de nutrientes (Mittler, 2006). Estos estreses pueden tener un impacto significativo en la fisiología de las plantas, como la interrupción de la absorción de agua y la fotosíntesis. Las respuestas de las plantas al estrés abiótico implican un conjunto complejo de mecanismos moleculares, bioquímicos y fisiológicos, incluida la producción de compuestos protectores y la activación de genes de respuesta al estrés (Ashraf y Foolad, 2007; Suzuki *et al.*, 2014). Según algunos informes, la proyección del estrés abiótico contribuye significativamente y afecta el crecimiento y la productividad al reducir el rendimiento de los cultivos en un 70% y la producción total de cultivos en hasta un 50 % (Sharma *et al.*, 2019).

Sin embargo, las plantas están expuestas a diferentes factores de estrés abióticos y para aclimatarse a estas condiciones ambientes desfavorables recurren a estrategias comunes como la acumulación de compuestos fenólicos, por lo que la concentración de fenoles en el tejido vegetal es un buen indicador para predecir el grado de tolerancia al estrés abiótico en las plantas (Sharma *et al.*, 2019). Así, se ha reportado que los compuestos fenólicos de las plantas juegan un papel importante en varios procesos fisiológicos para mejorar la tolerancia y adaptabilidad de las plantas en condiciones subóptimas (Dixon y Paiva, 1995). La ruta de los fenilpropanoides es inducida por diferentes tipos de estrés y la acumulación de compuestos producidos por esta ruta como ácidos fenólicos, flavonoides y otros, mejoran el rendimiento de la planta en condiciones de estrés (Dixon y Paiva, 1995).

Comprender cómo responden las plantas al estrés abiótico es crucial para desarrollar cultivos que puedan tolerar condiciones ambientales adversas.

1.3.1.1.- Estrés lumínico: Radiación UV-B

La luz es la energía o radiación electromagnética e incluye longitudes de onda en el rango visible y no visible. Los diferentes tipos de radiación se clasifican según la longitud de onda (λ) en ultravioleta: de 100 a los 380 nanómetros (nm); visible: que corresponde al rango comprendido entre los 380 y 780 nm; rojo lejano: que corresponde a las longitudes de onda entre los 700 y 800

nm; infrarrojo cercano: que va desde los 780 a los 2500 nm y finalmente el infrarrojo lejano en longitudes de onda mayores a 2500 nm (Niu *et al.*, 2016).

A diferencia de otros factores ambientales, la luz puede ser definida en tres variables principales: espectro, intensidad y duración o fotoperiodo. El espectro describe la composición de longitudes de onda de la fuente de iluminación y se expresa en nanómetros; la intensidad representa la cantidad de luz que incide en una superficie en un tiempo determinado y se expresa en $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (micro moles por metro cuadrado por segundo), y el fotoperiodo, corresponde a la cantidad de tiempo de exposición a la luz y oscuridad diaria expresado en horas (Vastakaite y Virsile, 2015).

En las plantas, la luz influye principalmente de dos maneras, como fuente de energía o como medio de información. Como recurso energético es capturada por la planta y convertida en energía química a través de la fotosíntesis. Sin embargo, sólo el 10 % del total de la energía captada es convertido en energía química, el resto de la energía es convertida en calor y liberada al ambiente (Fan *et al.*, 2013; Huché-Thélier *et al.*, 2016). Como fuente de información, la luz permite la evaluación de las condiciones ambientales y está involucrada en regular los diferentes procesos de crecimiento y desarrollo, afecta directamente la fisiología y morfología de la planta y estimula la síntesis de metabolitos secundarios (Zoltowski e Imaizumi, 2014; Kozai y Zhang, 2016).

Dentro del espectro electromagnético, el rango de la luz visible (380-780 nm), se ha descrito como la región del espectro más relevante para el desarrollo y crecimiento de las plantas (Zhen y Iersel, 2016). Particularmente la región del espectro, conocido como radiación fotosintéticamente activa o PAR por sus siglas derivadas del inglés “Photosynthetically active radiation” va desde los 400 a los 700 nm y coincide con el rango de absorción de las clorofilas (Figura 1.1). Esto debido a que la eficiencia de los fotones para impulsar la fotosíntesis, medida como la cantidad de O_2 emitido o CO_2 fijado por mol de fotones absorbidos, es más alto para los fotones rojos (aproximadamente 600–680 nm) y azules (400-500 nm) (Zhen y Iersel, 2016; Zhen *et al.*, 2021). Cabe destacar que para el óptimo desarrollo de las plantas se requiere de un rango más amplio del espectro, que va desde los 300 a los 800 nm, denominado por algunos autores como rango fisiológicamente activo. Este rango incluye la radiación PAR, pero también la radiación UV y el rango correspondiente al rojo lejano. Estas dos últimas zonas del espectro afectan la morfología de la planta y favorecen la síntesis de compuestos bioactivos (Kozai y Zhang, 2016).

Específicamente la radiación UV, se clasifica en tres tipos, definidos según la longitud de onda electromagnética en UV-C: 100-280 nm, UV-B: 280-320 nm y UV-A: 320-400 nm. De ellas la radiación UV-C es totalmente filtrada por la capa de ozono atmosférica por lo que no llega a la superficie terrestre, aproximadamente el 95% de la radiación UV que llega a la superficie de la Tierra corresponde a la UV-A, mientras que alrededor del 5% restante es UV-B. Las radiaciones tipo UV-B y UV-A pueden servir como inductor de diferentes respuestas en las plantas. Entre ellas, influir en el crecimiento, desarrollo y reproducción de las plantas, así como también modular aspectos fisiológicos, bioquímicos e incluso de expresión genética (Nocchi *et al.*, 2020). Concretamente, la radiación UV-B representa menos del 0,5 % de la energía solar total, pero sus fotones son las ondas más energéticas que llegan a la superficie terrestre (Nocchi *et al.*, 2020). En el año 2003 los niveles ambientales de radiación UV-B durante la temporada de crecimiento oscilaron entre 2 y 12 kJ m^{-2} por día, lo que corresponde a un aumento del 6 al 14 % en comparación con los niveles de los años 80 (Kakani *et al.*, 2003). Este aumento se produjo como consecuencia del agotamiento de la capa de ozono provocada por la liberación de compuestos como clorofluorocarbonos (CFCs) y otros compuestos halogenados utilizados en productos como aerosoles y sistemas de refrigeración. Estos compuestos contienen átomos de cloro y bromo capaces de reaccionar con las moléculas de ozono y destruirla (Kakani *et al.*, 2003). De acuerdo con el reporte de Pyle *et al.* 2022, el Protocolo de Montreal, un acuerdo de colaboración internacional diseñado para proteger la capa de ozono está

siendo exitoso. Este acuerdo ha regulado los gases halógenos responsables del agotamiento del ozono estratosférico, y sus concentraciones atmosféricas están disminuyendo, lo que ha llevado a un aumento del ozono en algunas partes de la atmósfera. Sin embargo, hoy en día se está utilizando el concepto de "retraso en el retorno del ozono" para indicar el efecto e impacto que tendrían nuevas emisiones ya sea no reguladas o no compatibles con el Protocolo de Montreal. Asumiendo el pleno cumplimiento del Protocolo el retorno de la capa de ozono al valor umbral histórico (alrededor de 1960) ocurriría a mediados de la década de 2070. Esta normalización dependerá de la evolución de las sustancias que agotan el ozono como de las concentraciones de gases de efecto invernadero. Por otro lado, asumiendo el mismo escenario de gases de efecto invernadero, pero considerando nuevas emisiones, el retorno al valor de 1960 se retrasa hasta principios de la década de 2080 (Pyle *et al.*, 2022) por lo cual la recuperación de la capa de ozono sigue siendo de preocupación actual.

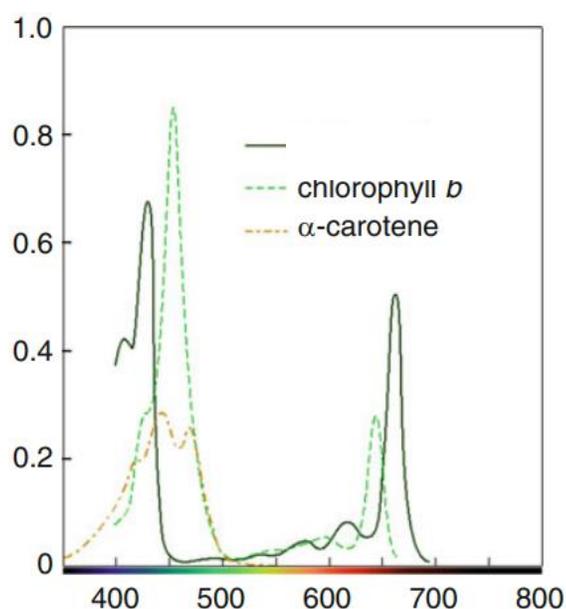


Figura 1.1. Rangos de absorción de la luz de las clorofilas a, b y del α-caroteno.
Fuente: Murakami y Matsuda, 2016.

Según Nocchi *et al.* (2020) incluso pequeños aumentos en la cantidad de radiación UV-B pueden afectar significativamente procesos y atributos importantes en los organismos e incluso a nivel del ecosistema. La radiación UV-B provoca muchas respuestas en la planta e impacta los niveles de una amplia gama de metabolitos, incluidos compuestos fenólicos, terpenoides y alcaloides (Jansen *et al.*, 2008).

Para detectar el estímulo lumínico las plantas tienen diferentes foto-receptores, estos sensores son los encargados de percibir la luz y proveer a la planta la información sobre los cambios en la composición espectral de la luz, su intensidad, dirección y duración. Así, le permiten a la planta ajustar su desarrollo, responder a los cambios y así optimizar su adecuación al entorno local (Zoltowski e Imaizumi, 2014).

Las señales lumínicas percibidas por los foto-receptores afectan el ritmo circadiano de la planta y activan respuestas como: cambios en la estructura y forma de las hojas, la germinación de las semillas, elongación de los tallos, entrada de las plantas en floración y la síntesis de pigmentos, entre otros (Higuchi y Hisamatsu, 2016). Sin embargo, estos procesos no ocurren al azar ya que la

respuesta de la planta dependerá del foto-receptor estimulado, por lo que a cada rango del espectro se le asocia una función determinada (Figura 1.2) (Higuchi y Hisamatsu, 2016). Entre los fotorreceptores descritos se incluyen a los receptores de luz roja/roja lejana (600-700/700-780 nm) denominados fitocromos, receptores de luz azul (400-500 nm) que incluyen criptocromos, fototropinas y a las proteínas Zeitlupe (ZTL), FLAVIN-BINDING, Kelch Repeat F-Box 1 (FKF1), y Lov Kelch Protein 2 (LKP2) involucradas en el ciclo circadiano y los procesos de floración (Zoltowski e Imaizumi, 2014) y el receptor UVR8 que detecta los cambios en la radiación UV-B gatillando respuestas como la síntesis de compuestos fenólicos de tipo flavonoide (Brown *et al.*, 2005; Murakami y Matsuda, 2016; Coffey *et al.*, 2017).

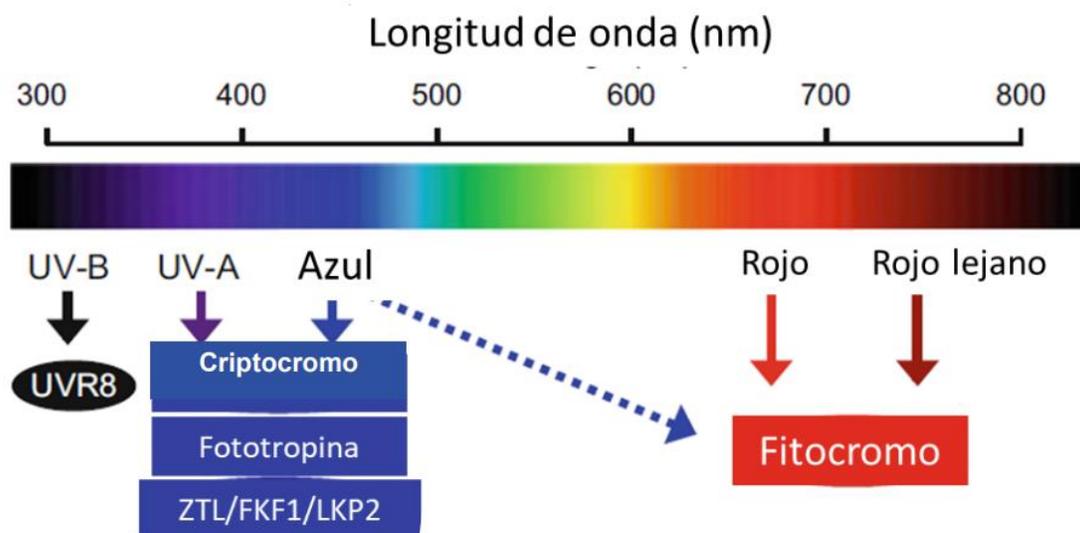


Figura 1.2. Foto receptores presentes en las plantas y sus longitudes de onda asociadas.
Fuente: Higuchi y Hisamatsu, 2016.

Las longitudes de onda correspondientes a la radiación PAR, además de estimular a los foto-receptores son absorbidas por fitopigmentos. Estos pigmentos corresponden a moléculas orgánicas que absorben luz de longitudes de onda específicas y reflejan otras, siendo los responsables de los diversos colores de flores, frutos y hojas (Higuchi y Hisamatsu, 2016). Los principales tipos de fitopigmentos son las clorofilas *a* y *b*, los carotenoides y los flavonoides. Las clorofilas son los fitopigmentos más importantes de las plantas ya que son esenciales para la fotosíntesis, tienen la capacidad de absorber la luz en las regiones azul y roja del espectro electromagnético y reflejar la luz verde lo que da el color a las hojas (Higuchi y Hisamatsu, 2016). Los carotenoides absorben la luz en el rango de los 350-500 nm, actúan como pigmentos accesorios participando en la recolección de luz en la fotosíntesis y la protección contra el exceso de luz. Así, reciben el exceso energía de la clorofila y la disipan en forma de calor (Murakami y Matsuda, 2016; Kumari *et al.*, 2017). En cambio, los flavonoides absorben energía en longitudes de onda más cortas, incluyendo la radiación UV protegiendo al aparato fotosintético y a las estructuras de la planta contra el daño causado por la luz UV y el exceso de radiación (Murakami y Matsuda, 2016; Kumari *et al.*, 2017). Los flavonoides son un grupo diverso de fitopigmentos que incluyen a las antocianinas, responsables de los colores rojo, morado y azul de muchas frutas y flores y poseen importantes propiedades antioxidantes (Kumari *et al.*, 2017).

La biosíntesis de flavonoides y otros compuestos como los ácidos fenólicos está fuertemente influenciada por la calidad de la luz y específicamente por la radiación UV-B (Liu *et al.*, 2007; Ebisawa *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2008). En particular, la exposición a la radiación UV-B estimula la síntesis y acumulación de compuestos fenólicos en cutículas, vacuolas o pared celular de la epidermis, donde absorben tanto la luz visible (antocianinas) como la luz ultravioleta (antocianinas y flavonoides) para proteger el mesófilo de la fotooxidación (Dixon y Paiva 1995; Aksakal *et al.*, 2016; Xu *et al.*, 2019).

En condiciones de alta intensidad de luz o de radiación UV-B aumentada, la absorción de fotones y, por lo tanto, de energía luminosa, puede ser mayor que la que se puede consumir en el ciclo de Calvin para la fijación de CO₂. Esta asimilación limitada de CO₂ conduce a una producción excesiva de EROs que, a su vez, causa daño oxidativo en las plantas (Sharma *et al.*, 2012). Si estas especies no se eliminan de manera efectiva, podrían dañar diferentes componentes celulares, incluida la maquinaria fotosintética y el fotosistema II (PSII), lo que lleva a cambios en la tasa fotosintética y fotoinhibición (Larson, 1988; Xu *et al.*, 2008; Wargent *et al.*, 2011; Terfa *et al.*, 2014; Pérez-López *et al.*, 2018). Además, la radiación UV-B tiene suficiente energía para promover la sobreproducción de radicales libres y desarrollar estrés oxidativo, desencadenando respuestas de foto protección para mantener el equilibrio entre la producción y eliminación de EROs tales como la activación del sistema antioxidante enzimático (SOD, POD, CAT y APX) y la síntesis de antioxidantes no enzimáticos como AsA, GSH y carotenoides y el aumento en la concentración total de fenoles (Oh *et al.*, 2009; Sharma *et al.*, 2012).

Pese a los factores dañinos descritos, algunos enfoques experimentales han revelado que la radiación UV-B actúa más como un factor regulador y de aclimatación para controlar el crecimiento y desarrollo de las plantas, que como un factor de estrés ambiental limitante (Parihar, *et al.*, 2015; Coffey *et al.*, 2017; Nocchi *et al.*, 2020). Así, las respuestas a la radiación UV-B incluyen el ajuste del perfil metabólico de la planta, incluidos aumentos y disminuciones en las concentraciones de flavonoides, principalmente quercetinas y kaempferoles (Brown *et al.*, 2005; Coffey *et al.*, 2017).

En los cultivos bajo invernadero, se utilizan diversos materiales plásticos, como el polietileno (PE), policarbonato (PC) y polipropileno (PP), en una o dos capas para la cobertura. Estas películas plásticas tienen un grosor que va desde 80 hasta 220 µm y un ancho de hasta 20 m (Xu *et al.*, 2019). Los invernaderos brindan un ambiente controlado que favorece el cultivo de plantas de alto valor y de temporada cálida, como tomates, pimientos, zapallos italianos, pepinos, frutillas y flores cortadas. Sin embargo, se ha observado que la radiación UV-B, es absorbida por las películas de PE, reduciendo la acumulación de compuestos bioactivos en los productos hortícolas producidos en bajo invernadero, en comparación con los cultivados en campo abierto, sin embargo, el efecto de la radiación UV-B puede variar dependiendo de la especie y la variedad cultivada (Ordidge *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2019). Por lo tanto, la elección adecuada del material de cobertura y la selección de variedades apropiadas son aspectos claves para mantener los niveles óptimos de compuestos bioactivos de hortalizas cultivadas en invernaderos.

En este sentido y debido a que las películas plásticas de invernadero bloquean las longitudes de onda correspondientes a la radiación UV-B, se están utilizando lámparas capaces de suministrar este tipo de radiación y con ello promover la biosíntesis de compuestos antioxidantes en condiciones controladas (Jansen *et al.*, 2008). De esta forma, la radiación UV-B ha sido utilizada en el cultivo de albahaca (*Ocimum basilicum* L.), como estrategia para el desarrollo normal de las glándulas sebáceas (Ioannidis *et al.*, 2002) y obtener mejores resultados en la biosíntesis y acumulación de compuestos fenólicos (Nocchi *et al.*, 2020).

Como se comentó anteriormente, los antioxidantes en las plantas son parte de un complejo mecanismo de defensa contra una amplia gama de estreses y, por lo tanto, se acumulan en respuesta a estas condiciones. Estas respuestas de la planta, frente a los estresores brindan la

oportunidad de mejorar la calidad funcional de las hortalizas mediante el uso de ambientes regulados (Oh *et al.*, 2009; Sgherri *et al.*, 2017). Debido a lo anterior, estudiar las condiciones óptimas de luz y manipular su aplicación resulta trascendental para obtener hortalizas saludables y enriquecidas con compuestos antioxidantes.

1.3.1.2.- Estrés salino por cloruro de sodio (NaCl)

La condición de salinidad es caracterizada por la presencia de una concentración alta de sales solubles en el suelo que afecta negativamente el crecimiento y desarrollo de las plantas. Es una de las principales causas de degradación de los suelos agrícolas (Negacz *et al.*, 2022).

El nivel de salinidad del suelo se determina mediante la medición de la conductividad eléctrica (CE) medida en deci siemens por metro (dS m^{-1}). Los suelos salinos se clasifican en cuatro categorías según su concentración de sal en: ligeramente salino cuando presenta una CE entre 2 y $< 4 \text{ dS m}^{-1}$; moderadamente salino cuando presenta una conductividad entre 4 y $< 8 \text{ dS m}^{-1}$, fuertemente salino cuando presenta una CE entre 8 y $< 16 \text{ dS m}^{-1}$ y muy fuertemente salino cuando la conductividad es $\geq 16 \text{ dS m}^{-1}$ (Munns y Tester, 2008).

Diferentes autores mencionan que la salinidad es el mayor factor medioambiental que restringe el crecimiento de las plantas (Parida y Das, 2005; Al-Maskri *et al.*, 2010; Shabala *et al.*, 2015). Durante las últimas décadas, la salinidad ha causado una reducción en el rendimiento medio global en la producción de cultivos de hasta un 20 % (Carillo *et al.*, 2019).

Ya en 2007, Ashraf y Foolad reportaron que un 19,5 % de los suelos agrícolas eran considerados salinos y se proyectó que cada año, aproximadamente 2 millones de hectáreas se volverían salinas debido a las malas prácticas agrícolas. Por su parte, Butcher *et al.* (2016), predijeron que la salinidad impactará el 50 % de los suelos arables para el 2050. Según la base de datos sobre mapas de suelos salinos de la FAO, que actualmente incorpora la información de 118 países, los que cubren el 85 % de la superficie terrestre mundial, más de 424 millones de hectáreas de la capa superficial del suelo (0-30 cm) y 833 millones de hectáreas del subsuelo (30-100 cm) están afectadas por la sal (FAO, 2023b). Este aumento en la salinización tiene un gran impacto en la producción de alimentos, siendo uno de los principales desafíos de la agricultura contemporánea (Negacz *et al.*, 2022).

La mayoría de los suelos afectados por la salinidad han surgido por causas naturales, siendo el cloruro de sodio (NaCl) la sal más distribuida (Muuns y Tester, 2008). Las bajas precipitaciones, la alta evaporación, la erosión de las rocas y los problemas de drenaje de los suelos, sumados a las pobres prácticas agrícolas y a la irrigación con aguas salinas, son los principales factores que aumentan la salinidad de los suelos (Muuns y Tester, 2008).

En Chile alrededor de 759.000 ha de suelos afectados por salinidad y otros 33.000 ha afectados por sodicidad. La mayoría de esta superficie se encuentra en el norte del país, donde las sales se acumulan naturalmente debido a la escasa precipitación existente. Los escasos suelos agrícolas de la zona norte del país son particularmente susceptibles de sufrir procesos de salinización, principalmente por el uso de agua de riego deficitario con altos contenidos de sales que incluyen cloruros, sulfatos, carbonatos y bicarbonatos (Casanova *et al.*, 2013).

Otro aspecto relevante que mencionar en este sentido es que, a nivel mundial, los recursos de agua dulce subterránea de los acuíferos costeros son afectados significativamente por la intrusión de agua de mar, proceso por el cual el agua de mar se infiltra en los acuíferos de agua dulce y reduce la calidad del agua aumentando su salinidad, incrementando específicamente los niveles de cloruro de sodio (NaCl). El fenómeno de intrusión es cada vez más común debido al cambio climático, aumento del nivel del mar, el cambio en el uso del suelo y el bombeo excesivo de agua subterránea (Chang *et al.*, 2018). Para la agricultura la intrusión salina es un importante

desafío ya que afecta tanto el rendimiento de los cultivos como la calidad del suelo (Chang *et al.*, 2018).

El incremento de la salinidad, independiente de la sal, causa en la planta dos efectos principales, un estrés hiperosmótico y un desbalance iónico, los cuales ocurren en fases. El primer efecto corresponde a una fase osmótica rápida, que inhibe el crecimiento de las hojas jóvenes y retarda el desarrollo de los brotes laterales. Esta fase tiene relación con concentraciones altas de las sales en el exterior de la planta, lo cual dificulta la extracción de agua por las raíces. El segundo efecto es una fase iónica, más lenta, que acelera la senescencia de las hojas maduras y tiene relación con concentraciones altas de iones en el interior de la planta, las cuales pueden llegar a ser tóxicas después de una lenta acumulación (Muuns y Tester, 2008; Butcher *et al.*, 2016). Un síntoma común del exceso en la concentración de iones es el daño a la membrana, lo que induce a una reducción de la expansión de las células y las hojas, al cierre de estomas, a la inhibición de la fotosíntesis, desestabilización de proteínas y muerte celular, entre otros (Butcher *et al.*, 2016).

Estos cambios causados por la acumulación de sales resultan en un aumento de la presión osmótica de la rizosfera, disminuyen la disponibilidad de agua para las plantas, lo que, junto con la toxicidad de los iones, en este caso de sodio (Na^+) y cloruro (Cl^-), resultan en un menor rendimiento de los cultivos (Shabala y Munns, 2012; Lucini *et al.*, 2015).

Sin embargo, en respuesta a la salinidad, las plantas han desarrollado varios mecanismos capaces de integrar el estrés exógeno con señales de desarrollo endógenas para optimizar el balance entre el crecimiento y la respuesta al estrés (Shabala *et al.*, 2015). Frente a la acumulación de NaCl las plantas han desarrollado 3 tipos de mecanismos de adaptación conocidos: 1) tolerancia a estrés osmótico, 2) exclusión de iones de sodio (Na^+) y cloruro (Cl^-) de las hojas y 3) tolerancia de tejidos a la acumulación de iones Na^+ o Cl^- . Sin embargo, no todas las plantas responden de igual forma al estrés salino, sino que poseen diferentes niveles de tolerancia (Munns y Tester, 2008).

Si bien, existe evidencia de los mecanismos fisiológicos de las especies halófitas que las hacen capaces de crecer en altas concentraciones de sal, como el aumento de la tolerancia osmótica, la cual favorece la capacidad para producir hojas nuevas, o la tolerancia del tejido a las altas concentraciones de iones de Na^+ , la cual aumenta la supervivencia de las hojas más maduras (Munns y Tester, 2008).

Uno de los mecanismos más distribuidos que actúa contra el estrés salino es la acumulación de solutos orgánicos de bajo peso molecular, compuestos altamente solubles y que por lo general no presentan toxicidad celular, lo que les permite ser acumulados en altas concentraciones en el citosol contrarrestando la presión osmótica generada por la acumulación de los iones Na^+ y Cl^- (Munns y Tester, 2008). El incremento de los osmolitos en la célula puede facilitar el movimiento de agua dentro de la célula reduciendo el impacto del estrés osmótico y la deshidratación de las células (Butcher *et al.*, 2016). La prolina es un soluto cuya acumulación juega un importante rol en condiciones de estrés ya que, contrarrestar el estrés osmótico, contribuye a la protección, estabilización y mantención de la integralidad de las membranas y estructuras subcelulares, como también a la estabilización de las enzimas y proteínas (Ashraf y Foolad, 2007; Munns y Tester, 2008; Lucini y Bernardo, 2015). En plantas de arroz la evidencia muestra que, cuando se utilizan concentraciones de NaCl entre 0 y 300 mM, la acumulación de prolina se produce en proporción directa con la concentración de NaCl del medio en la cual se cultiva (Kumar *et al.*, 2008).

Como se comentó más arriba la salinidad reduce el consumo de agua y con ello provoca cambios en la morfología e histología de la planta produciendo hojas más densas, lo que afecta a su vez la textura de las hojas de lechuga (Garrido *et al.*, 2013). En el caso de las plantas de lechuga, moderadamente sensibles al estrés por salinidad (Al-Maskri *et al.*, 2010; Lucini y Bernardo, 2015), la disminución en el consumo de agua reduce la tasa respiratoria, inhibe la división y la expansión celular (Carrillo *et al.*, 2019), reduce la actividad metabólica general e impide el crecimiento de la

planta (Butcher *et al.*, 2016). Este ajuste osmótico, en respuesta a la salinidad, no solo involucra la acumulación de compuestos osmóticamente activos, sino también otros procesos, donde destacan los cambios en la pared celular (Iraki *et al.*, 1989; Keutgen y Pawelzik, 2007; Zörb *et al.*, 2015).

Además de los cambios morfológicos, fisiológicos y metabólicos que sufre la planta, causados por el estrés osmótico e iónico, las altas concentraciones de sal alteran el transporte electrónico celular y las vías metabólicas, lo que resulta en la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (EROs), como anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxilo ($\cdot OH$), peróxido de hidrogeno (H_2O_2) y oxígeno singlete (1O_2) (Miller *et al.*, 2010; Sharma *et al.*, 2012). Estas especies juegan un rol clave en los procesos de señalización del estrés de las plantas (Baxter *et al.*, 2013). Además, participan en eventos de señalización, regulan la actividad de los canales iónicos y la expresión de genes (Miller *et al.*, 2010). Sin embargo, su incremento lleva a un estrés oxidativo y daño celular afectando negativamente el metabolismo normal de las plantas. Debido a su elevada reactividad, su acumulación en condiciones de estrés las hace tóxicas, ya que interactúan con una amplia variedad de moléculas causando peroxidación de lípidos, destrucción de la membrana celular, desnaturalización de las proteínas y mutaciones en el ADN (Miller *et al.*, 2010; Sharma *et al.*, 2012).

Para combatir los daños causados por las EROs, las plantas responden al estrés salino mediante la regulación positiva de genes y la activación de enzimas antioxidantes como las enzimas superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), peroxidasa (POD) y ascorbato peroxidasa (APX) y mediante la acción de compuestos antioxidantes como los compuestos fenólicos, glutatión (GSH), ácido ascórbico (AsA), α -tocoferol, prolina y carotenoides (Miller *et al.*, 2010). Así, las plantas tolerantes a la sal son las que muestran una mayor capacidad para mantener la homeostasis redox y a proteger sus tejidos del daño oxidativo (Sharma *et al.*, 2012). Por tanto, el aumento de la actividad antioxidante es utilizado estratégicamente para aumentar la tolerancia de la planta al estrés salino (Du *et al.*, 2014; Shgerri *et al.*, 2017). Por otra parte, en un estudio llevado a cabo por Deng *et al.* (2015), se logró aislar y caracterizar un mutante de arroz denominado *rst1*, el cual demostró una notable tolerancia a la salinidad en comparación con el tipo salvaje. Los resultados revelaron que este mutante presentó una mayor biomasa y una concentración de clorofila superior al del tipo salvaje. Este incremento en la concentración de clorofila, y la consecuente inhibición de su degradación en el mutante *rst1*, sugiere un proceso de reducción del daño oxidativo mediante la disminución en la generación de especies reactivas de oxígeno (EROS). Estos efectos insinúan que estos mecanismos desempeñan un papel crucial en la capacidad de la planta para resistir el estrés ocasionado por la salinidad del suelo. Finalmente, estos investigadores sostienen la premisa de que mantener una fotosíntesis eficiente es fundamental para asegurar la tolerancia de la planta frente a la salinidad (Deng *et al.*, 2015).

En cuanto a la tolerancia de la lechuga, se ha demostrado que depende del tipo e incluso del cultivar. Así, según algunos estudios la clasifican como relativamente sensible, con un valor umbral de 1,0 a 1,4 $dS\ m^{-1}$ y presentando un porcentaje de reducción de la producción del 13 % por cada $dS\ m^{-1}$ adicional (Tanji y Kielen, 2002). Otros, como Carranza *et al.* (2009) reportaron que la lechuga tipo Batavia presentó una tolerancia a una conductividad eléctrica de 2,16 $dS\ m^{-1}$ sin disminuir su rendimiento. Por su parte Pasternak *et al.* (1986) mostraron que diferentes cultivares de lechuga Romana fueron más tolerantes a la salinidad que los cultivares de lechuga tipo Iceberg. En este estudio, las lechugas Romanas irrigadas con una solución nutritiva con una CE de 10,5 $dS\ m^{-1}$ redujeron un 14 % del rendimiento, mientras que para las lechugas Iceberg la reducción fue del 40 %. Finalmente, Xu y Mou (2015) evaluaron 178 cultivares, 56 de lechugas tipo 'Mantecosa', 39 de tipo 'Iceberg', 35 tipo 'Romana', 33 de 'Hoja suelta' y 15 de tipo 'Silvestre'. De este estudio, se concluyó que los genotipos difieren mucho en su sensibilidad a la salinidad y que algunas variedades mostraron tolerancia en condiciones salinas (30:15 mM NaCl: CaCl₂) correspondientes a una CE de 8,4 $dS\ m^{-1}$, presentando menos de 15 % de reducción en materia fresca.

Por otra parte, un manejo adecuado del riego con agua salina pudiese mejorar la calidad de los cultivos de lechuga cultivados en ambientes salinos, por lo que es necesario evaluar detenidamente la tolerancia y comportamiento de los diferentes cultivares. Por lo que un mayor conocimiento en esta área contribuiría al desarrollo de estrategias de manejo y selección de cultivares más resistentes a la salinidad, lo cual resulta fundamental para garantizar un cultivo de lechuga de alta calidad en ambientes salinos.

Así, con el fin de obtener un cultivo de lechuga con mayores concentraciones de antioxidantes y con ello aumentar su valor funcional, se expusieron lechugas de tipo Lollo Bionda cv. 'Levistro' y de tipo Lollo Rosso cv. 'Carmolí' a diferentes tipos de estrés abiótico para evaluar su respuesta en rendimiento y concentración de compuestos fenólicos. Ambos cultivares fueron escogidos debido a sus diferencias de color y por tanto en la concentración de compuestos fenólicos definidos para cada cultivar. Se seleccionó un sistema de cultivo hidropónico bajo condiciones de invernadero con el propósito de poder manipular, controlar y monitorear las condiciones ambientales a las cuales las plantas fueron expuestas.

1.4.- Compuestos antioxidantes y postcosecha

La sostenibilidad de la industria agroalimentaria es una necesidad global. En los países industrializados se ha popularizado el término "desperdicio de alimentos", que se refiere a la eliminación de alimentos en la fase de consumo, ya sea en los hogares, restaurantes, cadenas de distribución o en las instituciones. Éste ocurre cuando los alimentos que son aptos para el consumo humano se descartan en lugar de ser consumidos. Por otro lado, en los países en vías de desarrollo, predomina el término "pérdidas de alimentos", que hace referencia a las pérdidas ocurridas durante las etapas de producción, manejo, almacenamiento y distribución de la cadena de suministro alimentario (Eguillor, 2019; Teigiserova *et al.*, 2019). En conjunto, el desperdicio y las pérdidas de alimentos movilizan una cantidad notable de recursos naturales consumiendo alrededor del 25% de toda el agua utilizada en la agricultura cada año, el 23% de toda la tierra de cultivo, y genera alrededor del 8% de las emisiones anuales globales de gases de efecto invernadero (Teigiserova *et al.*, 2019).

En América Latina y el Caribe las pérdidas postcosecha de frutas y hortalizas frescas, rondan el 55 % de todo lo que se produce (Eguillor, 2019). Sin embargo, existe una creciente demanda de frutas y hortalizas frescas mínimamente procesados (De Corato, 2019). El procesamiento mínimo se ha convertido en uno de los segmentos de más rápido crecimiento de la industria alimentaria, como resultado de la aparición de un nuevo perfil de consumidor definido como "rico en efectivo, pobre en tiempo" (Alzamora *et al.*, 2016; Ferreira *et al.*, 2023). Estos productos mínimamente procesados, permiten aumentar el consumo diario de frutas y hortalizas de las personas debido a la conveniencia y frescura del producto (Baselice *et al.*, 2017) y, por tanto, la fuente más conveniente para incluir compuestos bioactivos beneficioso para la salud en la dieta diaria (Saini *et al.*, 2016). Sin embargo, las técnicas de procesamiento mínimo enfrentan dos principales desafíos: el primero es mantener el producto fresco, suministrarlo en una forma conveniente sin perder su calidad funcional, basada en la mantención de la concentración de los compuestos bioactivos presentes en el producto. El segundo, es mejorar la vida útil y calidad por más tiempo para que su distribución y consumo cumpla con los requisitos del consumidor (De Corato, 2019).

La calidad de las frutas y hortalizas puede definirse como la combinación de atributos físicos y químicos (apariencia, textura, sabor y valor nutricional) que tienen un impacto determinante en el grado de aceptabilidad del consumidor. Donde destacan atributos externos como tamaño, forma, color, brillo, firmeza, textura y sabor e internos como las características químicas, físicas y microbianas (Palumbo *et al.*, 2022). Una vez que los productos hortofrutícolas son cosechados siguen siendo metabólicamente activos, por lo que son altamente perecederos y pierden calidad

debido a los procesos de maduración y posterior senescencia resultando una vida útil limitada y mayores posibilidades de rechazo del producto por parte del consumidor (De Corato, 2019; Meitha *et al.*, 2020; Palumbo *et al.*, 2022).

Utilizar tecnologías de conservación que mantengan la frescura de las frutas y hortalizas garantizando la salud del consumidor es por tanto esencial para mantener la calidad microbiológica, organoléptica y nutricional de los productos durante el almacenamiento y retardar la senescencia, reduciendo así las pérdidas de alimentos (Ferreira *et al.*, 2023).

Una vez que las frutas y hortalizas son cosechadas se generan especies reactivas de oxígeno (EROs), las cuales agotan los antioxidantes presentes en los productos hortofrutícolas, disminuyendo por tanto la calidad funcional de los mismos (Meitha *et al.*, 2020). Como se comentó anteriormente, bajas concentraciones de EROs cumplen la función de actuar como segundo mensajero en la señalización intracelular. Sin embargo, en altas concentraciones pueden dañar varios tipos de biomoléculas como lípidos, proteínas, ADN y ARN, lo que lleva a la muerte celular y consecuente deterioro del producto vegetal (Sharma *et al.*, 2012). Durante la postcosecha, la síntesis de EROs, producto de la respiración, ocurre de manera natural, incluso en productos sanos y sin daños (Meitha *et al.*, 2020). Para combatir estas especies reactivas y sus efectos perjudiciales es determinante que el producto por sí mismo cuente con un sistema antioxidante eficiente (Sharma *et al.*, 2012).

Dentro de los componentes antioxidante no enzimático se encuentran el AsA, GSH, α -tocoferol, carotenoides, y polifenoles. El AsA y GSH actúan como antioxidantes al donar electrones de manera directa a las EROs, estas especies también juegan un papel en la señalización y modulación de la expresión génica relacionada con la actividad enzimática (Meitha *et al.*, 2020). Por su parte, los tocoferoles, por su naturaleza lipídica ejercen un importante rol en la protección de las membranas (Waszcza *et al.*, 2018). Mientras que los carotenoides protegen la maquinaria fotosintética de la célula e impiden la formación de oxígeno singlete (Waszcza *et al.*, 2018). Finalmente, los polifenoles son uno de los antioxidantes más importantes debido a su amplio rango de acción, pueden combatir las EROs directamente, inhibir la peroxidación lipídica protegiendo las membranas y juegan un papel relevante en la degradación del H_2O_2 (Sharma *et al.*, 2012). Por otro lado, mucho de los compuestos fenilpropanoides inducidos por el estrés se pueden clasificar como fitoalexinas debido a sus propiedades antimicrobianas, por lo que además de sus propiedades antioxidantes cumplen un importante rol en proteger al producto frente al ataque de patógenos (Dixon y Paiva, 1995). Los polifenoles, específicamente los flavonoides han demostrado presentar acción antimicrobiana contra diferentes bacterias presentes en alimentos como *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enterica*, *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*, y *Staphylococcus aureus*. Estos compuestos también pueden controlar hongos como *Alternaria alternata*, *Fusarium sp.*, *Rhizopus stolonifer*, *Colletotrichum gloeosporioides* (Aguilar-Veloz *et al.*, 2020). Su acción se basa en la inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos, en la interferencia de la función de la membrana citoplasmática o afectando el metabolismo energético de los microorganismos (Cushnie y Lamb, 2005).

Para retardar la senescencia de los productos hortofrutícolas y preservar su calidad microbiológica, organoléptica y funcional, existen diferentes estrategias postcosecha, donde destacan la reducción de la temperatura, la mantención de una humedad relativa alta, los tratamientos físicos y/o químicos y el uso de envases con atmósfera modificada, los cuales pueden reducir o inhibir el desarrollo de desórdenes fisiológicos, ralentizar los procesos biológicos causados por la senescencia y la maduración y minimizar la contaminación y el desarrollo de microorganismos (De Corato, 2019; Meitha *et al.*, 2020).

La temperatura de almacenamiento es el factor crítico más importante que se debe controlar para mantener la calidad y prolongar la vida útil de las hortalizas (Hall *et al.*, 2013). El uso

de temperaturas bajas durante el almacenamiento es uno de los métodos más extendidos y busca reducir la tasa respiratoria, retardar la formación de EROs y así reducir la peroxidación de las membranas y otros procesos metabólicos que provocan la senescencia (Meitha *et al.*, 2020). Se ha comprobado que el almacenamiento a bajas temperaturas (0 a 10 °C) relentece la tasa respiratoria y protege a los compuestos bioactivos de los productos frescos de la degradación, mientras que ayuda a reducir el deterioro provocado por los microorganismos (Saini *et al.*, 2016). Si bien ésta es una práctica eficiente y ampliamente extendida para preservar la calidad de las hortalizas y su contenido de compuestos bioactivos, Santos *et al.* (2012) mostraron que, bajo idénticas condiciones de almacenamiento, la estabilidad de estos compuestos depende tanto de la naturaleza química del compuesto como del tipo de muestra. En cuanto a la concentración de fenoles totales (FT), Lafarga *et al.*, (2020) mostraron que, durante la postcosecha de lechuga, el contenido de FT varió significativamente entre variedades. Estos autores analizan dos grupos de lechugas definidos como variedades modernas, obtenidas producto de un programa de reproducción formal (*Rutilai*; *Abago y Muraï* de Rijk Zwaan y *Pelikan y Francesca* de Syngenta) y variedades tradicionales, pertenecientes a variedades autóctonas domesticadas (*Maravilla LS044*, *Frances 219/855*, *Negre borratger 386/935*, *Carxofeta LS007*, *D'hivern LS008*). En el estudio observaron una mayor concentración de FT en variedades modernas de lechuga en comparación con variedades tradicionales, mientras que la capacidad antioxidante, medida por los métodos de FRAP y DPPH, fue similar (Lafarga *et al.*, 2020). Por otro lado, observaron un aumento de la concentración de FT luego del procesamiento mínimo para algunas de las variedades estudiadas (*Rutilai RZ*, *Abago RZ*, *Maravilla LS044*, *Frances 219/855*, *Negre borratger 386/935*, y *D'hivern LS008*). Si bien este incremento, debido al mínimo proceso, mostró ser un comportamiento general, no afectó a todas las variedades estudiadas, sugiriendo que es una respuesta variedad dependiente (Lafarga *et al.*, 2020). Estos autores indicaron que debido a estas diferencias en el comportamiento postcosecha, se necesitan optimizar las condiciones de proceso y de almacenamiento por cada variedad de lechuga.

Otra de las prácticas postcosecha bastante extendida y complementaria al uso de bajas temperaturas es la utilización de envases plásticos. Esta práctica ha mostrado ser esencial para reducir eficientemente la deshidratación y mantener la calidad de las hortalizas durante el almacenamiento y la venta. El uso de envases permite la generación de un ambiente de almacenaje con un envasado en atmósfera modificada (EAM). Actualmente, el EAM es ampliamente utilizado en todo el mundo para preservar la calidad y prolongar la vida útil de frutas y hortalizas frescas enteras y mínimamente procesadas (De Corato, 2019). El principio básico de esta estrategia es utilizar un embalaje para almacenar el producto en una atmósfera modificada, con una composición gaseosa distinta a la del aire, la cual se puede lograr de forma pasiva, utilizando materiales de embalaje adecuadamente permeables al oxígeno (O₂) y al dióxido de carbono (CO₂), o de manera activa inyectando una mezcla de gases específica al envase permeable. El objetivo último de ambos principios es encontrar un equilibrio de gases óptimo en el interior del envase para que la tasa respiratoria del producto sea lo más baja posible sin perjudicar la calidad (De Corato, 2019). En general, para frutas y hortalizas mínimamente procesadas se utiliza una disminución de la concentración de O₂ y aumento de la concentración de CO₂ con respecto al aire (20 % de O₂, un 0,03 % de CO₂ y un 78,8 % de N₂) alcanzando una composición de gases de 2 a 5 % CO₂ y de 2 a 5 % O₂ (De Corato, 2019). Esta baja en la concentración de O₂ y el aumento en el contenido de CO₂ resulta en una disminución en la tasa respiratoria y por tanto en una reducción en la producción de EROs, específicamente de la formación de aniones superóxido y radicales hidroxilos y por tanto un retraso en la senescencia, extendiendo la vida postcosecha de las hortalizas frescas (Guo *et al.*, 2019; De Corato, 2019; Meitha *et al.*, 2020). Sin embargo, concentraciones excesivamente bajas de O₂ favorecen procesos fermentativos y putrefactivos generando la formación de acetaldehídos y otros compuestos causante de malos olores y sabores (De Corato, 2019).

La tecnología de EAM ha mostrado ser eficaz en retrasar el deterioro de las hortalizas de hoja como la lechuga. Guo *et al.* (2019) reportaron que el uso de EAM con una concentración de gases de 10/3/87% de CO₂/O₂/N₂ en la lechuga tipo Grand Rapid, una lechuga de hoja suelta exhibió una baja tasa respiratoria, redujo la pérdida de peso al proteger al producto de la deshidratación y retrasó la degradación de clorofila, mejorando así la calidad de la lechuga y prolongando su vida postcosecha. Por su parte Escalona *et al.* (2006) observaron que una atmósfera de 80 kPa O₂ y 10-20 kPa CO₂ redujo la tasa respiratoria e impidió la fermentación anaeróbica de la lechuga tipo mantequilla recién cortada. Mientras que Martínez-Sánchez *et al.* (2011) mostraron que una atmósfera de almacenamiento con bajo oxígeno (entre 0,2 y 0,5 kPa) previene el pardeamiento y la generación de malos olores, preservando la calidad de la lechuga fresca cortada tipo Romana. Así, la concentración de gases óptima recomendada para la conservación dependerá del tipo de producto y efecto buscado (De Corato, 2019). Por tanto, sus beneficios dependen de una serie de factores como la especie, el cultivar, prácticas culturales, etapa de desarrollo, manejo postcosecha, así como la permeabilidad al gas del material de embalaje, la tasa respiratoria y las condiciones de almacenamiento (Ghidelli y Pérez-Gago, 2016). Producto de una gestión deficiente de la postcosecha se elevará el contenido de las EROS, por lo que el producto hortícola tendrá que utilizar su reserva de compuestos antioxidantes en aliviar este estrés, eliminando la ventaja de ser un buen suministro de antioxidantes para el consumidor (Meitha *et al.*, 2020). Debido a lo anterior es fundamental no sólo buscar estrategias que potencien la síntesis y acumulación compuestos antioxidantes como los compuestos fenólicos, sino también estudiar cómo se comportan estos compuestos durante la postcosecha del producto para asegurar su llegada al consumidor.

1.5.- Bibliografía

Al-Maskri, A., Al-Kharusi, L., Al-Miqbali, H., Khan, M.M. 2010. Effects of salinity stress on growth of lettuce (*Lactuca sativa*) under closed-recycle nutrient film technique. *Int. J. Agric. Biol.* 12, 377–380. http://www.fsublishers.org/published_papers/90819..pdf

Amodio, M.L., Derossi, A., Colelli, G., 2014. Modeling phenolic content during storage of cut fruit and vegetables: A consecutive reaction mechanism. *J. Food Eng.* 140, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.foodeng.2014.04.006>

Aksakal, O., Tabay, D., Esringu, A., Icoğlu Aksakal, F., Esim, N. 2016. Effect of Proline on Biochemical and Molecular Mechanism in Lettuce (*Lactuca sativa* L.) Exposed to UV-B radiation. *Photochem. Photobiol. Sci.* 16, 246–254. <https://doi.org/10.1039/C6PP00412A>

Alzamora, S.M., López-Malo, A., Tapia, M.S., Welti-Chanes, J. 2016. Minimally Processed Foods. *Encycl. Food Health.* 767-771. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00470-0>

Ashraf, M., and Foolad, M. 2007. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environ. Exp. Bot.* 59, 206-216. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2005.12.006>

Baselice, A., Colantuoni, F., Lass, D.A., Nardone, G., Stasi, A. 2017. Trends in EU Consumers' Attitude Towards Fresh-cut Fruit and Vegetables, Food Quality and Preference. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodqual.2017.01.008>

Baxter, A., Mittler, R., Suzuki, N. 2013. ROS as key players in plant stress signalling. *J. Exp. Bot.* 65, 1229–40. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert375>

Biesalski, H., Dragsted, L., Elmadfa, I., Grossklaus, R., Müller, M., Schrenk, D., Walter, P., Weber, P. 2009. Bioactive compounds: Definition and assessment of activity. *Nutrition* 25(11-12), 1202–1205. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2009.04.023>

Brown, B.A., Cloix, C., Jiang, G.H., Kaiserli, E., Herzyk, P., Kliebenstein, D.J.; Jenkins, G.I. 2005. A UV-B-specific signaling component orchestrates plant UV protection. *PNAS.* 102, 18225–18230. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0507187102

Butcher, K., Wick, A.F., DeSutter, T., Chatterjee, A., Harmon, J. 2016. Soil salinity: a threat to global food security. *Agron. J.* 108, 2189-2200. <https://doi.org/10.2134/agronj2016.06.0368>

Carillo, P., Raimondi, G., Kyriacou, M.C., Pannico A., El-Nakhel, C., Cirillo, V., Colla, G., De Pascale, S., Roupael, Y. 2019. Morpho-physiological and homeostatic adaptive responses triggered by omeprazole enhance lettuce tolerance to salt stress. *Sci. Hortic.* 249, 22-30. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.01.038>

Carranza, C., Lancho, O., Miranda, D., Chaves, B. 2009. Growth analysis of 'Batavia' lettuce (*Lactuca sativa* L.) cultivated in a saline soil of the Bogota Plateau. *Agron. Colomb.* 27, 41–48 <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=18031473000>

Casanova, M., Salazar, O., Seguel, O., Luzio, W. (2013). Management of Soil Properties in Chile. In: *The Soils of Chile. World Soils Book Series.* Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-94-007-5949-7_3.

Chang, Y., Hu, B.X., Xu, Z., Li, X., Tong, J., Chen, L., Zhang, H., Miao, J., Liu, H., Ma, Z. 2018. Numerical simulation of seawater intrusion to coastal aquifers and brine water/freshwater interaction in south coast of Laizhou Bay, China. *J. Contam. Hydrol.* 215, 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.jconhyd.2018.06.002>

Coffey, A., Prinsen, E., Jansen, M.A.K., Conway, J. 2017. The UVB photoreceptor UVR8 mediates accumulation of UV absorbing pigments, but not changes in plant morphology, under outdoor conditions. *Plant Cell Environ.* 40, 2250–2260. <https://doi.org/10.1111/pce.13025>

- Correia, S., Schoutenm R., Silva, A., Gonçalves, B. 2017. Factors Affecting Quality and Health Promoting Compounds during Growth and Postharvest Life of Sweet Cherry (*Prunus avium* L.). *Front. Plant Sci.* 8, 2166. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.02166>
- Cushnie, T. P. T., & Lamb, A. J. 2005. Antimicrobial activity of flavonoids. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 26, 343–356. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2005.09.002>
- Eguillor, P. M. R. 2019. Pérdida y desperdicio de alimentos en el sector agrícola: avances y desafíos. Edición de Oficina de Estudios y Políticas Agrarias –ODEPA. www.odepa.gob.cl
- Deng, P., Jiang, D., Dong, Y. M., Shi, X. Y., Jing, W., Zhang, W. H. 2015. Physiological characterization and fine mapping of a salt-tolerant mutant in rice (*Oryza sativa*). *Func Plant Biol.* 42(11): 1026–1035. <https://doi.org/10.1071/FP15126>
- Dixon, R.A., Paiva, N.L. 1995. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell.* 7, 1085-1097. <https://doi.org/10.1105/tpc.7.7.1085>
- De Corato, U. 2019. Improving the shelf-life and quality of fresh and minimally processed fruits and vegetables for a modern food industry: A comprehensive critical review from the traditional technologies into the most promising advancements. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 60, 940-975. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1553025>
- Du, W-X., Avena-Bustillos, R., Breksa, A., McHugh, T., 2014. UV-B light as a factor affecting total soluble phenolic contents of various whole and fresh-cut specialty crops. *Postharvest Biol. Technol.* 93, 72-82. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2014.02.004>
- Ebisawa, M., Shoji, K., Kato, M., Shimomura, K., Goto, F., Yoshihara, T. 2008. Supplementary ultraviolet radiation B together with blue light at night increased quercetin content and flavonol synthase gene expression in leaf lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Environ. Control Biol.* 46, 1-11. <https://doi.org/10.2525/ecb.46.1>
- Escalona, V. H., Verlinden, B. E., Geysen, S., and Nicolai, B. M. (2006). Changes in respiration of fresh-cut butterhead lettuce under controlled atmospheres using low and super-atmospheric oxygen conditions with different carbon dioxide levels. *Postharvest Biol. Technol.* 39: 48-55. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2005.09.003>
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2023 (a). FAOSTAT database, crops, and livestock section. Recuperado en marzo de 2023, desde <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2023(b). Global map of salt affected soils. Soils maps and databases. Recuperado en marzo de 2023, desde <https://www.fao.org/soils-portal/data-hub/soil-maps-and-databases/global-map-of-salt-affected-soils/en/>
- Fan, X.X., Xu, Z.G., Liu, X.Y., Tang, C.M., Wang, L.W., Han, X.L. 2013. Effects of light intensity on the growth and leaf development of young tomato plants grown under a combination of red and blue light. *Sci. Hort.* 153, 50-55. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2013.01.017>
- Ferreira, B., Silveira, A., Viera, G., Pereira, A., Arujo, H., Dos Santos Ferraz, L., Costa, P., de Barros, E. 2023. Recent advances in processing and preservation of minimally processed fruits and vegetables: A review – Part 2: Physical methods and global market Outlook. *Food Chem. Adv.* 2, 100304. <https://doi.org/10.1016/j.focha.2023.100304>
- Galieni, A., Di Mattia, C., De Gregorio, M., Specca, S., Mastrocola, D., Pisante, M., Stagnari, F. 2015. Effects of nutrient deficiency and abiotic environmental stresses on yield, phenolic compounds, and antiradical activity in lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Sci. Hort.* 187, 93-101. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.02.036>
- Garrido, Y., Tudela, J.A., Marín, A., Mestre, T., Martínez, V., and Gil, M.I. 2013. Physiological, phytochemical, and structural changes of multi-leaf lettuce caused by salt stress. *J. Sci. Food Agric.* 94, 1592-1599. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6462>

Ghidelli, C., Pérez-Gago, M.B. 2016. Recent advances in modified atmosphere packaging and edible coatings to maintain quality of freshcut fruits and vegetables. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 58: 662-679. <http://dx.doi.org/10.1080/10408398.2016.1211087>

Guo, Z., Liu, H., Chen, X., Huang, L., Fan, J., Zhou, J., Chang, X., Du, B., Chang, X. 2019. Modified-atmosphere packaging maintains the quality of postharvest whole lettuce (*Lactuca sativa* L. Grand Rapid) by mediating the dynamic equilibrium of the electron transport chain and protecting mitochondrial structure and function. *Postharvest Biol. Technol.* 147, 206–13. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2018.09.001>

Hall, M.K.D., Jobling, J. J., Rogers, G.S. 2013. Influence of storage temperature on the seasonal shelf life of perennial wall rocket and annual garden rocket. *Int. J. Veg. Sci.* 19, 83–95. <https://doi.org/10.1080/19315260.2012.716387>

Higuchi, Y., Hisamatsu, T. 2016. Light acts as a signal for regulation of growth and development. In T. Kozai, K. Fujiwara, & E. Runkle (Eds.), *LED lighting for urban agriculture* (pp. 57-73). Singapore: Springer.

Huché-Thélier, L., Crespel, L., Le Gourrierec, J., Morel, P., Sakr, S., Leduc, N. 2016. Light signaling and plant responses to blue and UV radiations-perspectives for applications in horticulture. *Environ. Exper. Bot.* 121, 22-38. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envexpbot.2015.06.009>

Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos. 2023. Base de Datos de Actividad Antioxidante (ORAC) y de Contenido de Polifenoles Totales (PFT) en Hortalizas. Recuperado en marzo de 2023 desde <http://portalantioxidantes.com/base-de-datos-de-actividad-antioxidante-orac-y-de-contenido-de-polifenoles-totales-pft-en-hortalizas-2/>

Ioannidis, D., Bonner, L Johnson, C. 2002. UV-B is Required for Normal Development of Oil Glands in *Ocimum basilicum* L. (Sweet Basil). *Ann. Bot.* 90, 453-460. <https://doi.org/10.1093/aob/mcf212>

Iraki, N., Bressan, R., Hasegawa, P.M., Carpita, N. 1989. Alteration of the Physical and Chemical Structure of the Primary Cell Wall of Growth-Limited Plant Cells Adapted to Osmotic Stress. *Plant Physiol.* 91, 39-47. <https://doi.org/10.1104/pp.91.1.39>

Jansen, M., Hectors, K., O'Brien, N., Guisez, Y., Potters, G. 2008. Plant stress and human health: Do human consumers benefit from UV-B acclimated crops? *Plant Sci.* 175, 449–458. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2008.04.010>

Kakani, V.G., Reddy, K.R., Zhao, D., and Sailaja, K. 2003. Field crop responses to ultraviolet-B radiation: a review. *Agric. Forest Meterol.* 120, 191–218 <https://doi.org/10.1016/j.agrformet.2003.08.015>

Keutgen, A., Pawelzik, E. 2007. Cultivar-Dependent Cell Wall Modification of Strawberry Fruit under NaCl Salinity Stress. *J. Agric. Food Chem.* 55, 7580–7585. <https://doi.org/10.1021/jf071216o>

Khanam, U.K.S., Oba, S., Yanase, E., Murakami, Y. 2012. Phenolic acids, flavonoids, and total antioxidant capacity of selected leafy vegetables. *J. Func. Foods* 4, 979–987. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2012.07.006>

Kim, D.O., Lee, C.Y. 2004. Comprehensive study on vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of various polyphenolics in scavenging a free radical and its structural relationship. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 44, 253-273. <https://doi.org/10.1080/10408690490464960>

Kim, M., Moon, Y., Tou, J., Mou, B., and Waterland, N. 2016. Nutritional value, bioactive compounds, and health benefits of lettuce (*Lactuca sativa* L.). *J. Food Compost. Anal.* 49, 19-34. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2016.03.004>

Kozai, T., & Zhang, G. 2016. Some aspects of the light environment. In T. Kozai, K. Fujiwara, & E. Runkle (Eds.), *LED lighting for urban agriculture* (pp. 49-55). Singapore: Springer.

Kumar., V., Shriram, V., Nikam, T.D., Jawali, N., Shitole, M.G. 2008. Sodium Chloride-Induced Changes in Mineral Nutrients and Proline Accumulation in Indica Rice Cultivars Differing in Salt Tolerance. *J. Plant Nutr.* 31, 1999-2017. <https://doi.org/10.1080/01904160802403466>

Kumari, P., Panwar, S., Thaneshwari, T., Kaushal, P. 2017. Pigment Profiling of Flower Crops: A Review. *Eco. Env. & Cons.* 23, 1000-1008. https://www.researchgate.net/publication/337151834_Pigment_Profiling_of_Flower_Crops_A_Review

Lafarga, T., Villaró, S., Rivera, A., Bobo, G., Aguiló-Aguayo, I. 2020. Bioaccessibility of polyphenols and antioxidant capacity of fresh or minimally processed modern or traditional lettuce (*Lactuca sativa* L.) varieties. *J. Food Sci. Technol.* 57, 754–763. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-04108-7>

Larson, R. 1988. The antioxidants of higher plants. *Phytochem.* 27, 969-978. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(88\)80254-1](https://doi.org/10.1016/0031-9422(88)80254-1)

Liu, X., Ardo, S., Bunning, M., Parry, J., Zhou, K., Stushnoff, C., Stoniker, F., Yu, L., Kendall, P. 2007. Total phenolic content and DPPH* radical scavenging activity of lettuce (*Lactuca sativa* L.) grown in Colorado. *LWT Food Sci. Technol.* 40, 552-557. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2005.09.007>

Liu, C., Han, X., Cai, L., Lu, X., Ying, T., Jiang, Z. 2011. Postharvest UV-B irradiation maintains sensory qualities and enhances antioxidant capacity in tomato fruit during storage. *Postharvest Biol. Technol.* 59, 232-237. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2010.09.003>

Llorach, R., Martínez-Sánchez, A., Tomás-Barberán, F.A., Gil, M.I., Ferreres, F. 2008. Characterization of polyphenols and antioxidant properties of five lettuce varieties and escarole. *Food Chem.* 108, 1028–1038. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.11.032>

Lucini, L., and Bernardo, L. 2015. Comparison of proteome response to saline and zinc stress in lettuce. *Front. Plant Sci.* 6, 240. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00240>

Lucini, L., Roupheal Y., Carderelli, M., Canaguier, R., Kumar, P., Colla, G. 2015. The effect of a plant-derived bio stimulant on metabolic profiling and crop performance of lettuce grown under saline conditions. *Sci. Hort.* 182, 124-133. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2014.11.022>

Martínez-Ispizua, Eva, Ángeles Calatayud, José Ignacio Marsal, Claudio Cannata, Federico Basile, Abdelsattar Abdelkhalik, Salvador Soler, José Vicente Valcárcel, and Mary-Rus Martínez-Cuenca. 2022. "The Nutritional Quality Potential of Microgreens, Baby Leaves, and Adult Lettuce: An Underexploited Nutraceutical Source" *Foods* 11, no. 3: 423. <https://doi.org/10.3390/foods11030423>

Martínez-Sánchez, A., Tudela, J., Luna, C., Allende, A., Gil, M. 2011. Low oxygen levels and light exposure affect quality of fresh-cut Romaine lettuce. *Postharvest Biol. Technol.* 59: 34–42 <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2010.07.005>

Meitha, K., Pramesti, Y., Suhandono, S. 2020. Reactive Oxygen Species and Antioxidants in Postharvest Vegetables and Fruits. *Int. J. Food Sci.* 2020, 8817778. <https://doi.org/10.1155/2020/8817778>

Miller, G., Suzuki, N., Ciftci-Yilmaz, S., Mittler, R. 2010. Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. *Plant Cell Environ.* 33, 453–467 <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2009.02041.x>

Mittler, R. 2006. Abiotic stress, the field environment and stress combination. *Trends Plant Sci.* 11, 15-19. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2017.02.001>

Mulabagal, V., Ngouajio, M., Nair, A., Zhang, Y., and Gottumukkala, A. 2010. In vitro evaluation of red and green lettuce (*Lactuca sativa*) for functional food properties. *Food Chem.* 118, 300-306. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.04.119>

- Munns, R., and Tester, M. 2008. Mechanisms of salinity tolerance. *Ann. Rev. Plant Biol.* 59, 651-681. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092911>
- Murakami, K., & Matsuda, R. 2016. Optical and physiological properties of a leaf. In T. Kozai, K. Fujiwara, & E. Runkle (Eds.), LED lighting for urban agriculture (pp. 113-123). Singapore: Springer.
- Negacz, K., Malek, Z., de Vos, A., Vellinga, P. 2022. Saline soils worldwide: Identifying the most promising areas for saline agriculture. *J. Arid Environ.* 203, 104775 <https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2022.104775>
- Neveu, V., Perez-Jiménez, J., Vos, F., Crespy, V., du Chaffaut, L., Mennen, L., Knox, C., Eisner, R., Cruz, J., Wishart, D., Scalbert, A. 2010. Phenol-Explorer: an online comprehensive database on polyphenol contents in foods. Database. <https://doi.org/10.1093/database/bap024>
- Nicolle, C., Cardinault, N., Gueux, E., Jaffrelo, L., Rock, E., Mazur, A., Amouroux, P., Rémésy, C. 2004. Health effect of vegetable-based diet: Lettuce consumption improves cholesterol metabolism and antioxidant status in the rat. *Clin. Nutr.* 23, 605–614. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2003.10.009>
- Niu, G. 2016. Light. In T. Kozai, G. Niu, & M. Takagaki (Eds.), Plant Factory: An indoor vertical farming system for efficient quality food production (pp. 115-127). Amsterdam, The Netherlands: Academic Press. <https://www.sciencedirect.com/book/9780128166918/plant-factory>
- Nocchi, N., Monteiro, H., Crespo, R., Ungaretti, T., Ribeiro, A. 2020. Effects of UV-B radiation on secondary metabolite production, antioxidant activity, photosynthesis, and herbivory interactions in *Nymphoides humboldtiana* (Menyanthaceae). *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 212, 112021. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2020.112021>
- Muñoz. 2020. Boletín de hortalizas frescas. Enero de 2020. ODEPA. Recuperado de <https://www.odepa.gob.cl/publicaciones/boletines/boletin-de-hortalizas-frescas-enero-de-2020>
- Oh, M.M., Carey, E. E., Rajasherkar, C.B. 2009. Environmental stresses induce health-promoting phytochemicals in lettuce. *Plant Physiol. Biochem.* 47, 578-583. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2009.02.008>
- Ordidge, M., García-Macías, P., Battey, N., Gordon, M., Hadley, P., John, P., Lovegrove, J., Vysini, E., Wagstaffe, A. 2010. Phenolic contents of lettuce, strawberry, raspberry, and blueberry crops cultivated under plastic films varying in ultraviolet transparency. *Food Chem.* 119, 1224–1227. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.08.039>
- Palumbo, M., Attolico, G., Capozzi, V., Cozzolino, R., Corvino, A., de Chiara, M.L.V., Pace, B., Pelosi, S., Ricci, I., Romaniello, R., Cefola, M. 2022. Emerging Postharvest Technologies to Enhance the Shelf-Life of Fruit and Vegetables: An Overview. *Foods.* 11, 3925. <https://doi.org/10.3390/foods11233925>
- Parida, A., Das, A. 2005. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 60, 324-349. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2004.06.010>
- Parihar, P., Singh, S., Singh, R., Singh, V. P., Prasad, S. M. 2015. Changing scenario in plant UV-B research: UV-B from a generic stressor to a specific regulator. *J. Photochem. Photobiol. B, Biol.* 153, 33-343. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2015.10.004>
- Pasternak, D., De Malach, Y., Borovic, I., Shram, M., Aviram, C. 1986. Irrigation with brackish water under desert conditions. IV. Salt tolerance studies with lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Agric. Water Manag.* 11, 303-311. [https://doi.org/10.1016/0378-3774\(86\)90046-6](https://doi.org/10.1016/0378-3774(86)90046-6)
- Pérez-López, U., Pinzino, C., Quartacci, F., Ranieri, A., Sgherri, C. 2014. Phenolic Composition and Related Antioxidant Properties in Differently Colored Lettuces: A Study by Electron Paramagnetic Resonance (EPR) Kinetics. *J. Agric. Food Chem.* 62, 12001–12007 <https://doi.org/10.1021/jf503260v>
- Pérez-López, U., Sgherri, C., Miranda-Apodaca, J., Micaelli, F., Lacuesta, M., Mena-Petite, A., Quartacci, MF., Muñoz-Rueda, A. 2018. Concentration of phenolic compounds is increased in lettuce

grown under high light intensity and elevated CO₂. *Plant Physiol. Biochem.* 123, 233-41. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.12.010>

Pepe, G., Sommella, E., Manfra, M., De Nisco, M., Tenore GC., Scopa, A., Sofo, A., Marzocco, S., Adesso, S., Novellino, T., Campiglia, P. 2015. Evaluation of anti-inflammatory activity and fast UHPLC-DAD-IT-TOF profiling of polyphenolic compounds extracted from green lettuce (*Lactuca sativa* L.; var Maravilla de Verano). *Food Chem.* 167, 153-161. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.06.105>

Pyle JA, Keeble J, Abraham NL, Chipperfield MP, Griffiths PT. 2022. *Nature.* 608(7924):719-723. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04968-8>

Romani, A., Pinelli, P., Galardi, C., Sani, G., Cimato, A., and Heimler, D. 2002. Polyphenols in greenhouse and open-air-grown lettuce. *Food Chem.* 79, 337-342. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00170-X](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00170-X)

Saini, R.K., Shang, X.M., Ko, E. Y., Choi, J.H., Keum, Y.S. 2016. Stability of carotenoids and Saini, R.K., Shang, X.M., Ko, E. Y., Choi, J.H., Keum, Y.S. 2016. Stability of carotenoids and tocopherols in ready-to-eat baby-leaf lettuce and salad rocket during low-temperature storage. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 67, 489-495. <http://dx.doi.org/10.3109/09637486.2016.1172059>

Santos, J., Mendiola, J.A., Oliveira, M.B., Ibanez, E., Herrero, M. 2012. Sequential determination of fat- and water-soluble vitamins in green leafy vegetables during storage. *J Chromatogr. A.* 1261, 179–188. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.04.067>

Sgherri, C., Pérez-López, U., Micaelli, F., Miranda-Apodaca, J., Mena-Petite, A., Munoz-Rueda, A., Frank Quartacci, M. 2017. Elevated CO₂ and salinity are responsible for phenolics-enrichment in two differently pigmented lettuces. *Plant Physiol. Biochem.* 115, 269-278. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.04.006>

Shabala, S., and Munns, R. 2012. Salinity stress: Physiological constraints and adaptive mechanisms. In Shabala, S. (ed.) *Plant Stress Physiology* (59-93). CABI, Wallingford, UK. <https://doi.org/10.1079/9781845939953.0059>

Sharma, P., Jha, A. B., Dubey, R. S., Pessaraki, M. 2012. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *J. Exp. Bot.* 2012, 217037. <https://doi.org/10.1155/2012/217037>

Sloan, A. E. 2014. The Top Ten Functional Food Trends. *Food Technol.* 68(4). Recuperado de <https://www.ift.org/news-and-publications/food-technology-magazine/issues/2014/april/features/toptentrends>

Sloan, A. E. 2016. Top 10 Functional Foods Trends. *Food Technol.* 70 (4). <https://www.ift.org/news-and-publications/food-technology-magazine/issues/2016/april/features/top-10-functional-food-trends-2016>

Sloan, A. E. 2018. Top 10 Functional Food Trends. *Food Technol.* 72 (4). <https://www.ift.org/news-and-publications/food-technology-magazine/issues/2018/april/features/top-10-functional-food-trends-2018>

Sloan, A. E. 2020. Top 10 food trends. *Food Technol.* 74 (3). <https://www.ift.org/news-and-publications/food-technology-magazine/issues/2020/april/features/the-top-10-functional-food-trends>

Suzuki, N., Rivero, R. M., Shulaev, V., Blumwald, E., & Mittler, R. 2014. Abiotic and biotic stress combinations. *New Phytol.* 203, 32-43. <https://doi.org/10.1111/nph.12797>

Tanji, K. K., & Kielen, N. C. 2002. *Agricultural Drainage Water Management in Arid and Semi-Arid Areas* (FAO Irrigation and Drainage Paper 61). FAO Corporate Document Repository. Recuperado de <http://www.fao.org/3/a-ap103e.pdf>

Teigiserova, D.A., Hamelin, L. and Thomsen, M. 2019. Towards transparent valorization of food surplus, waste and loss: Clarifying definitions, food waste hierarchy, and role in the circular economy. *Sci. Total Environ.* <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.136033>

Terfa, MT., Roro, AG., Olsen, JE., Torr , S. 2014. Effects of UV radiation on growth and postharvest characteristics of three pot rose cultivars grown at different altitudes. *Sci. Hortic.* 178, 184–191. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2014.08.021>

Vastakaite, V., Virsile, A., Brazaitytė, A., Samuolienė, G., Jankauskienė, J., Sirtautas, R., Novi kovas, A., Daba insk s, L., Sakalauskienė, S., Miliauskienė, J., & Duchovskis, P. 2015. The effect of blue light dosage on growth and antioxidant properties of microgreens. Scientific works of the Institute of Horticulture, Lithuanian Research Centre for Agriculture and Forestry, and Aleksandras Stulginskis University. *Sodinink. dar inink.* 34, 1-2. Retrieved from <https://hdl.handle.net/20.500.12259/88567>

Wargent, J., Elfadly, E., Moore, J., Paul., ND. 2011. Increased exposure to UV-B radiation during early development leads to enhanced photoprotection and improved long-term performance in *Lactuca sativa*. *Plant Cell Environ.* 34, 1401-1413. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2011.02342.x>

Waszczak, C., Carmody, M., Kangasj rvi, J. 2018. Reactive oxygen species in plant signaling *Annu. Rev. Plant Biol.* 69, 209–236. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042817-040322>

Xu., C., Natarajan, S., Sullian., JH. 2008. Impact of solar ultraviolet-B radiation on the antioxidant defense system in soybean lines differing in flavonoid contents. *Environ. Exp. Bot.* 63, 39–48. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2007.10.029>

Xu, C., Mou, B. 2015. Evaluation of Lettuce Genotypes for Salinity Tolerance. *HortScience* 50, 1441–1446. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.50.10.1441>

Xu, J., Su, X., Li, Y., Sun, X., Wang, D., Wang, W. 2019. Response of Bioactive Phytochemicals in Vegetables and Fruits to Environmental Factors. *EJNFS.* 9, 233-247. <https://doi.org/10.9734/EJNFS/2019/v9i330062>

Yang, X., Gil, M.I., Yang, Q., Tomás-Barberán, F. 2021. Bioactive compounds in lettuce: Highlighting the benefits to human health and impacts of preharvest and postharvest practices. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 21, 4–45. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12877>

Zhen, S., Iersel, M. 2016. Far-red light is needed for efficient photochemistry and photosynthesis. *J. Plant Physiol.* 209, 115–122. <https://doi.org/10.1016/j.jiplph.2016.12.004>

Zhen, S., Iersel, M., Bugbee, B. 2021. Why Far-Red Photons Should Be Included in the Definition of Photosynthetic Photons and the Measurement of Horticultural Fixture Efficacy. *Front. Plant Sci.* 12, 693445. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.693445>

Zlotek, U., Swieca, M., Jakubczyk, A. 2014. Effect of abiotic elicitation on main health-promoting compounds, antioxidant activity and commercial quality of butter lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Food Chem.* 148, 253–260. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.10.031>

Zoltowski, B., e Imaizumi, T. 2014. Structure and function of the ZTL/FKF1/LKP2 group proteins in Arabidopsis. *Enzymes.* 35, 213–239. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801922-1.00009-9>

Z rb, C., H hling, K., Kutschera, U., Geilfus, C.M. 2015. Salinity Stiffens the Epidermal Cell Walls of Salt-Stressed Maize Leaves: Is the Epidermis Growth-Restricting? *PLoS One.* 10, e0118406. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118406>

2.- Hipótesis

I.- El estrés abiótico controlado (salinidad o radiación UV-B), aplicado durante el cultivo, es capaz de incrementar la síntesis de compuestos fenólicos en lechugas tipo Lollo Bionda y Lollo Rosso cultivadas en un sistema hidropónico.

II.- Estrategias de postcosecha que involucran bajas temperaturas y una mezcla de gases compuesta por bajo O₂ y moderado CO₂ son capaces de mantener las concentraciones altas de compuestos fenólicos alcanzados durante el cultivo de lechugas tipo Lollo Bionda y Lollo Rosso sometidas a estrés abiótico, incrementando así el valor funcional de estos tipos de lechuga.

Con el fin de abordar y responder adecuadamente la presente hipótesis, se formuló el siguiente objetivo general y los siguientes objetivos específicos.

3.- Objetivos

3.1.- Objetivo general

Evaluar el valor funcional de lechugas mediante la estimulación de la síntesis de compuestos fenólicos, en respuesta a la aplicación de estímulos / estreses abióticos controlados durante el cultivo y asegurar su llegada al consumidor mediante el uso de estrategias de postcosecha que involucran bajas temperaturas y una concentración de gases de bajo O₂ y moderado CO₂.

3.2.- Objetivos específicos

I.- Evaluar la evolución de la síntesis de compuestos fenólicos mediante cosechas sucesivas en lechugas tipo Lollo Bionda y Lollo Rosso sometidas a diferentes niveles y tipos de estímulos / estreses abióticos.

II.- Evaluar el rendimiento y calidad funcional de lechugas tipo Lollo Bionda y Lollo Rosso cultivadas bajo diferentes niveles y tipos de estímulos / estreses abióticos, identificar y determinar la concentración de los compuestos fenólicos mediante cromatografía líquida.

III.- Evaluar el comportamiento, durante el almacenamiento, de la concentración de compuestos fenólicos alcanzada en el cultivo mediante el uso de estrategias de postcosecha que involucran bajas temperaturas en combinación con una concentración de gases con bajo O₂ y moderado CO₂ en lechugas tipo Lollo Bionda y Lollo Rosso.

4.- Metodología

4.1.- Material vegetal y condiciones de cultivo

El experimento se llevó a cabo en el Centro de Estudios Postcosecha (CEPOC) de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile, ubicado en los 32° 40' de latitud sur, 70° 32' de longitud oeste y a una altitud de 625 msnm (La Pintana, Santiago, Chile). Como material vegetal se utilizaron dos tipos de lechugas, Lollo Bionda cultivar 'Levistro' de hojas verdes y Lollo Rosso cultivar 'Carmolí' de hojas rojas, ambas de la empresa Rijk Zwaan (Chile). La germinación de las semillas fue testada según los estándares propuestos por la International Seed Testing Association (ISTA, 2017) resultando tener un 99 % de germinación.

La siembra se realizó en una bandeja alveolada de 200 celdas, utilizando una mezcla de lana de roca granulada (Agrolan®, El Volcán S.A., Chile) y perlita expandida A6 (Harbolite Chile Ltda., Chile), ambas pre hidratadas en proporción volumétrica 2:1. Se sembró una semilla por alvéolo a 0,5 cm de profundidad, asegurándose que la semilla quedara cubierta por el sustrato. Una vez sembradas, las bandejas fueron llevadas a una cámara de germinación a 22 °C, 80 % de humedad relativa y en oscuridad, durante 24 horas hasta la emisión de la radícula. Una vez emergida la radícula, las bandejas fueron llevadas al invernadero donde las plántulas fueron regadas con agua potable hasta la etapa de cotiledones expandidos. Una vez que alcanzaron este estado, se regaron con solución nutritiva al 50 % de la concentración hasta el trasplante. La composición de la solución nutritiva utilizada fue la propuesta por Sonneveld y Straver (1994) para hortalizas de hoja, cuya composición al 100% consistió en (mol L⁻¹): 1,25*10⁻³ NH₄; 11,0*10⁻³ K; 4,5*10⁻³ Ca; 1,0*10⁻³ Mg; 19,0*10⁻³ NO₃; 1,125*10⁻³ SO₄; 2,0*10⁻³ H₂PO₄; 40*10⁻⁶ Fe; 5*10⁻⁶ Mn; 4*10⁻⁶ Zn; 30*10⁻⁶ B; 0,75*10⁻⁶ Cu; 0,5*10⁻⁶ Mo. El pH de esta solución se mantuvo entre 5,5 y 5,8 para maximizar la absorción de nutrientes por parte del cultivo. El pH fue ajustado mediante la adición de una solución de ácido nítrico.

4.2.- Montaje y diseño experimental

El montaje de cada experimento y diseño experimental se describen detalladamente en el capítulo y sección correspondiente.

4.3.- Parámetros de crecimiento de las plantas (MF, MS, % MS)

Como parámetro analítico de crecimiento se midió la masa fresca (MF) y porcentaje de masa seca (%MS). Para ello se utilizó la parte aérea de la planta y una balanza analítica con una precisión de 0,01 g (Radwag, AS 100/C/2, Poland). Una vez obtenida la MF, para la obtención de MS, las muestras fueron secadas a 70°C en una estufa de aire forzado (Labtech, LDO-150F, Corea) hasta masa constante. El % MS fue estimado mediante la relación de MS:MF y expresado en porcentaje.

4.4.- Determinación de compuestos funcionales

4.4.1.- Extracción de las fracciones fenólicas

Se recolectaron alrededor de 30 g de hojas frescas de lechuga por cada repetición y se almacenaron a -80 °C, luego fueron liofilizadas y trituradas con un molino eléctrico (Fagor, ML-2006x, EE. UU.) hasta obtener un polvo fino. Las extracciones de los compuestos fenólicos solubles se llevaron a cabo como se describe en Galieni et al. (2015) con algunas modificaciones. Para ello se mezclaron 0,2 g de polvo con 10 mL de MeOH: H₂O en una proporción de 70:30. Cada mezcla fue agitada utilizando un vórtex durante un minuto, luego colocadas en un baño de ultrasonido durante

15 min y centrifugadas a 4180 g durante 10 min a 4 °C en una centrífuga refrigerada (Hemle Labortechnik, Z326k, Alemania). Posteriormente, el sobrenadante fue filtrado con un filtro de jeringa estéril, con membrana de PVDF y 0,45 µm de tamaño de poro (Merck S.A., Chile). El extracto hidro-metanólico se almacenó a -20 °C en tubos ámbar hasta la realización de los análisis de compuestos fenólicos totales y actividad antioxidante.

4.4.2.- Determinación de la concentración de fenoles totales

El contenido de fenoles totales (FT) se midió utilizando el método propuesto por Ainsworth y Gillespie (2007). En un tubo Eppendorf de 2 mL se dejó reaccionar durante 5 min una mezcla de 100 µL del extracto MeOH: H₂O y 200 µL de reactivo de Folin-Ciocalteu al 10 %. Posteriormente se agregaron 800 µL de una solución de carbonato de sodio (Na₂CO₃) 0,7 mol L⁻¹ y luego de dos horas de reacción la muestra se centrifugó a 6000 g (HERMLE Labortechnik, Z326k, Alemania) por 2 min. La absorbancia del sobrenadante se leyó en una placa de 96 pocillos a 765 nm utilizando un espectrofotómetro multi placa (ASYS, UVM340, Reino Unido). Como corrección de la línea de base se utilizó una reacción control sin muestra. El contenido fenólico total se calculó utilizando una curva de calibración de ácido gálico (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) y se expresó como miligramos equivalentes de ácido gálico (EAG) en 100 gramos de masa fresca (mg EAG 100 g⁻¹ MF).

4.4.3.- Determinación de la capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante (CA) de las diferentes muestras se llevó a cabo mediante dos métodos. El primer método utilizado fue el de FRAP, del inglés Ferric reducing antioxidant power, el cual mide la capacidad que tienen los antioxidantes presentes en la muestra de reducir el hierro. El segundo método utilizado fue el método de DPPH, acrónimo del compuesto radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo, el cual busca cuantificar la capacidad de los antioxidantes presentes en el extracto de atrapar radicales libres.

4.4.3.1.- Método de FRAP

El método de FRAP fue realizado de acuerdo con la metodología descrita por Benzie y Strain (1996) con algunas modificaciones. Para la preparación del reactivo FRAP, se mezcló una solución tampón de acetato 0,3 mol L⁻¹ (pH 3,6), 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) 0,01 mol L⁻¹ en HCl 0,04 mol L⁻¹ y FeCl₃ 6H₂O 0,020 mol L⁻¹ en proporción 10:1:1. Esta mezcla fue calentada durante 10 min a 37°C previo a su uso. Por otro lado, se prepararon diluciones de los extractos originales de MeOH: H₂O obtenidos del material vegetal. Para la reacción se tomó una alícuota de 20 µL de la dilución obtenida y se mezcló con 600 µL de reactivo FRAP a 37°C. El producto de la reacción fue puesto en una placa de 96 pocillos y se midió la absorbancia a 593 nm cada 30 min hasta la estabilización de la lectura (2 horas) utilizando para ello un espectrofotómetro multiplaca (ASYS-UVM340, Reino Unido). La capacidad antioxidante equivalente se calculó mediante una curva de calibración de Trolox (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania). Como corrección de la línea de base se utilizó una reacción control sin muestra y todas las mediciones se realizaron por triplicado. Los resultados se expresaron como miligramos equivalentes de Trolox (eq Trolox) en 100 gramos de materia fresca (mg eq Trolox 100 g⁻¹ MF).

4.4.3.2.- Método de DPPH

Para la determinación de la de eliminación de radicales libres, se utilizó el reactivo radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) según la metodología descrita en Gupta y Prakash (2009). Para cada reacción se prepararon diluciones de los extractos vegetales originales. Al mismo tiempo, se preparó una solución de DPPH a una concentración de 0,2*10⁻³ mol L⁻¹ y se protegió de la luz hasta

su uso. Para cada reacción se colocó una alícuota de 250 μL del extracto diluido en un tubo Eppendorf de 2 mL y se le agregó 1 mL de la solución de DPPH preparada. De la reacción obtenida se colocaron 200 μL en una placa de 96 pocillos y se midió la absorbancia a 517 nm usando un espectrofotómetro multiplaca (ASYS-UVM340, Reino Unido) cada 30 min hasta la estabilización de la lectura, después de 2 horas. La capacidad antioxidante equivalente se calculó utilizando una curva de calibración de Trolox (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) como lo describen Llorach *et al.* (2008). Como corrección de la línea de base se utilizó una reacción control sin muestra. Los resultados se expresaron como miligramos equivalentes de Trolox (eq Trolox) en 100 gramos de masa fresca (mg eq Trolox 100 g^{-1} MF).

4.4.4.- Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando el software InfoStat versión 2017, un software estadístico desarrollado por la Universidad Nacional de Córdoba, Argentina (Di Rienzo *et al.*, 2017). Los datos registrados fueron sometieron a un análisis de varianza multifactorial (ANOVA). Las diferencias de medias se consideraron estadísticamente significativas cuando el valor $p < 0,05$ y fueron detectadas mediante la prueba de comparaciones múltiples LSD de Fisher.

Metodologías adicionales para cada capítulo y experimento se describen en detalle en la sección correspondiente.

5.- Capítulo 1: Corte y radiación UV-B como factores estresores

5.1.- Determinación de la dosis de UV-B a utilizar

5.1.1.- Introducción

La radiación UV-B corresponde al rango de longitudes de onda comprendido entre los 280 y los 320 nm y representa menos del 0,5% de la energía solar total que llega a la Tierra. En comparación con las longitudes de onda del espectro visible o infrarroja que también llegan a la superficie terrestre, la longitud de onda correspondiente a la radiación UV-B es la que presenta la menor longitud de onda y por tanto una mayor energía (Nocchi *et al.*, 2020). Debido a esto, pequeños aumentos en la cantidad de radiación UV-B, entendida como un aumento de la intensidad o mayores periodos de exposición, podrían tener un impacto significativo en diversos procesos fisiológicos de las plantas (Nocchi *et al.*, 2020).

Los efectos más comunes de la radiación UV-B consisten en la disminución del contenido de la concentración de clorofila (10–70%), mientras que se produce un aumento en la concentración de compuestos capaces de absorber la radiación UV-B (10–300%) como los fenoles donde destacan los de tipo flavonoide (Kakani *et al.*, 2003; Brown *et al.*, 2005; Coffey *et al.*, 2017).

Por otro lado, en condiciones de alta intensidad de radiación UV-B se estimula la producción excesiva de especies reactivas de oxígeno (EROs) que causan daño oxidativo en las plantas (Sharma *et al.*, 2012). En estas condiciones, producto del daño generado en la maquinaria fotosintética y el fotosistema II (PSII) se reduce la tasa fotosintética (3–90%) por fotoinhibición (Kakani *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2008; Wargent *et al.*, 2011; Terfa *et al.*, 2014; Pérez-López *et al.*, 2018).

Pese a lo anterior, autores como Parihar, *et al.* (2015) consideran que la radiación UV-B actúa más como un factor regulador y de aclimatación que como un factor de estrés ambiental limitante. En este sentido, Ioannidis *et al.*, (2002) mostraron que la radiación UV-B es necesaria para el desarrollo normal de las glándulas sebáceas en albahaca (*Ocimum basilicum* L), por su parte Xu *et al.* (2019) discutieron sobre cómo las hortalizas que reciben menos luz UV-B resultan en una menor acumulación de compuestos fenólicos debido a una disminución en la actividad de la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL), enzima clave en la ruta del ácido shikímico de donde se obtienen los compuestos fenólicos. Sin embargo, el efecto de la radiación UV-B puede variar dependiendo de la especie y la variedad cultivada. Ordidge *et al.* (2010) observaron un aumento de la concentración de fenoles totales, antocianinas y flavonoides cuando lechugas tipo Lollo Rosso fueron cultivadas bajo materiales de cubierta transparentes al UV, mientras que en lechugas tipo Lollo Bionda no presentaron respuesta bajo una exposición similar a la radiación UV. Debido a lo anterior, se hace indispensable estudiar el efecto de la radiación UVB y determinar la dosis umbral a utilizar para favorecer la síntesis de compuestos funcionales, sin afectar la calidad del producto.

5.1.2.- Metodología

5.1.2.1.- Material vegetal y condiciones de cultivo

Como material vegetal se cultivaron lechugas tipo Lollo Bionda cultivar 'Levistro' (hojas verdes) y de tipo Lollo Rosso cultivar 'Carmolí' (hojas rojas) de la empresa Rijk Zwaan (Chile). La germinación de las semillas de lechuga de ambos cultivares, condiciones de cultivo de los almácigos y trasplante se realizaron como se describe en la sección 4.1 durante la temporada de otoño. Una vez que las plantas alcanzaron el estado de cuatro hojas verdaderas fueron llevadas en un invernadero de 5*4 m con una cubierta de vidrio en un sistema ubicado en las dependencias de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile y trasplantadas a un sistema hidropónico recirculante de NFT (nutrient film technique). Este invernadero contó con un sistema

de climatización para mantener una temperatura día/noche de 22/18 °C. Cabe destacar que, de acuerdo con los datos de la estación meteorológica de Quinta Normal, Santiago, disponible en <https://climatologia.meteochile.gob.cl>, la radiación global acumulada del período fue de 3858,7 W h m⁻² con un fotoperiodo medio de 10,5 horas de luz por día.

5.1.2.2- Montaje y diseño experimental

Los tratamientos de radiación UV-B fueron aplicados utilizando 6 lámparas de UV-B de banda ancha TL (Philips, Países Bajos) las cuales fueron fijadas de manera perpendicular a los perfiles de NFT de 3 m de largo en una estructura metálica quedando a diferentes alturas de las plantas como se muestra en la Figura 5.1. Cuando las plantas alcanzaron un estadio de 5 a 6 hojas verdaderas, el tratamiento radiativo comenzó a ser aplicado. Las diferentes dosis acumuladas de radiación UV-B fueron obtenidas por la distancia entre las plantas y las lámparas (Figura 5.1) y un tiempo de encendido constante de 60 min al día a las 12 del día durante todo el periodo de cultivo (30 días). Las dosis acumuladas de radiación UV-B correspondieron a 34,5; 61,2; 70,8 kJ m⁻² calculadas como la sumatoria de la dosis diaria de radiación UV-B a la que las plantas fueron expuestas. Luego de los 30 días de cultivo, las lechugas fueron cosechadas y analizadas.



Figura 5.1. Montaje diseño determinación de dosis de radiación UV-B.

En la imagen se muestra el montaje del ensayo para definir la dosis máxima de radiación UV-B, permitida por la lechuga tipo Lollo Bionda cultivar 'Levistro' antes de la generación de daño físico. Las diferentes dosis acumuladas de radiación UV-B se obtuvieron por las diferencias en la distancia de las plantas a la fuente de iluminación, manteniendo constante el tiempo de encendido (60 min).

5.1.2.3.- Parámetro analítico de crecimiento de las plantas (% MS)

Como parámetro analítico de crecimiento se midió el porcentaje de masa seca (%MS) como se describe en la sección 4.3. Para ello, luego de 30 días de cultivo, cinco plantas por repetición fueron muestreadas de manera aleatoria ($n=15$ por tratamiento).

5.1.2.4.- Determinación de compuestos funcionales

5.1.2.4.1.- Extracción de las fracciones fenólicas

Para la extracción de compuestos fenólicos se seleccionaron tres muestras de cada repetición (9 muestras por tratamiento) siguiendo las recomendaciones de Galieni *et al.* (2015), como se describe en detalle en la sección 4.4.1. El extracto de MeOH: H₂O se almacenó a -20 °C en tubos ámbar hasta la realización de los análisis de compuestos fenólicos totales, flavonoides, antocianinas y actividad antioxidante.

5.1.2.4.2.- Determinación de la concentración de fenoles totales

La concentración de fenoles totales (FT) se midió utilizando el método propuesto por Ainsworth y Gillespie (2007), como se describe en la sección 4.4.2. Los resultados fueron expresados como miligramos equivalentes de ácido gálico por cada 100 gramos masa fresca (mg EAG 100 g⁻¹ MF).

5.1.2.4.3.- Determinación de la capacidad antioxidante

5.1.2.4.3.1.- Método de FRAP

El método de FRAP (Ferric reducing antioxidant power) se realizó de acuerdo con la metodología propuesta por Benzie y Strain (1996), detallado en la sección 4.4.3.1. Los resultados fueron expresados como miligramos equivalentes de Trolox (eq Trolox) por cada 100 gramos de materia fresca (mg eq Trolox 100 g⁻¹ MF).

5.1.2.4.3.2.- Método de DPPH

Para la determinación de la eliminación de radicales libres, se utilizó el reactivo radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) según la metodología descrita en Gupta y Prakash (2009) y detallada en la sección 4.4.3.2. Los resultados fueron expresados como miligramos equivalentes de Trolox (eq Trolox) por cada 100 gramos de materia fresca (mg eq Trolox 100 g⁻¹ MF).

5.1.2.5.- Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando el software InfoStat versión 2017 (Di Rienzo *et al.*, 2017) como se describe en la sección 4.4.4.

5.1.3.- Resultados y discusión

Las lechugas cultivar 'Levistro' tratadas con una dosis acumulada de 34,5 kJ m⁻² no mostraron daños visuales en las hojas (Figura 5.2 A) mientras que las tratadas con 61,2 y 70,8 kJ m⁻² presentaron quemaduras y decoloraciones en las zonas de las hojas más expuestas a la radiación (Figura 5.2 B, C). La severidad del daño aumentó con el incremento de la dosis de radiación UV-B aplicada (Figura 5.2). Estos resultados concuerdan con lo reportado por Kakani *et al.* (2003a) quienes postularon que la exposición prolongada a dosis excesivas de radiación UV-B afecta significativamente la fisiología de las plantas. Así, dosis de 15 a 16 kJ m⁻² por día de radiación UV-B

afectaron las células foliares de arroz, observándose el rompimiento de la membrana de los cloroplastos. Por otro lado, las hojas de maíz fueron afectadas de manera negativa con 9 kJ m^{-2} por día observándose colapso de las células de la epidermis y reducción en el tamaño de los cloroplastos. Este estudio mostró que las plantas sometidas a estas condiciones adversas experimentaron una alteración en su pigmentación, manifestada inicialmente como la aparición de manchas bronceadas o marrones en la epidermis foliar, similares a las observadas en este estudio en la Figura 5.2, en las hojas tratadas con dosis de $61,2$ y $70,8 \text{ kJ m}^{-2}$. Según Kakani *et al.* (2003a) a medida que el daño progresa, se observa una clorosis generalizada y una posterior desecación y necrosis de las hojas como una respuesta negativa de las plantas frente a la exposición crónica a altas dosis de radiación UV-B.

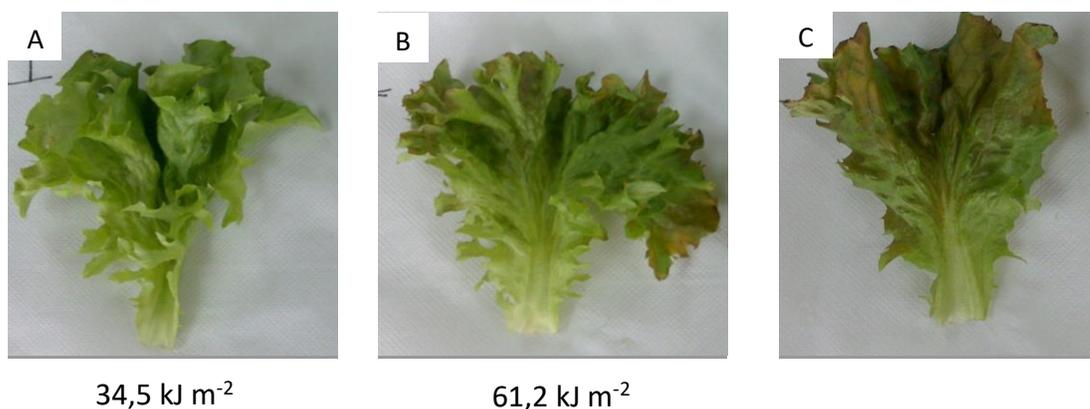


Figura 5.2. Efecto de diferentes dosis de radiación UV-B sobre hojas de lechuga cv. 'Levistro'.

Acercamiento a las hojas de lechuga cv. 'Levistro' luego de 30 días de cultivo con una exposición acumulada de radiación UV-B de $34,5$ (A); $61,2$ (B) y $70,8 \text{ kJ m}^{-2}$ (C). En la imagen se observa que para dosis de $61,2$ y $70,8 \text{ kJ m}^{-2}$ las hojas presentan un importante daño producto de la excesiva radiación (manchas marrones).

5.1.3.1.- Parámetro analítico de crecimiento de las plantas (% MS)

El porcentaje de masa seca de las plantas cultivadas bajo suplementación de radiación UV-B se incrementó a medida que aumentó la dosis acumulada de radiación, pasando de $6,0 \%$ a 0 kJ m^{-2} hasta llegar a un $7,8 \%$ bajo $70,8 \text{ kJ m}^{-2}$ (Figura 5.3). Esta respuesta se relacionaría con el aumento en el grosor de las hojas, modificación morfológica común observada cuando las plantas son expuestas a la radiación UV-B (Aksakal *et al.*, 2016) y con la modificación en la anatomía de la hoja. Kakani *et al.*, 2003b observaron un incremento en el número de células del tejido empalizado para algodón expuesto a 8 y 16 kJ m^{-2} por día de radiación UV-B. Estas modificaciones en la estructura de la hoja podrían modificar incidencia de la luz y con ello la respuesta de la planta a la radiación UV-B (Kakani *et al.*, 2003b; Aksakal *et al.*, 2016).

5.1.3.2.- Determinación de la concentración de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante

Las lechugas cultivadas con dosis iguales o superiores a $61,2 \text{ kJ m}^{-2}$, presentaron una reducción de 15 a 20% en la concentración de fenoles totales respecto de las cultivadas con $30,4 \text{ kJ m}^{-2}$ tratamiento que registró la mayor concentración de fenoles totales alcanzando $4870,6 \pm 28,9 \text{ mg EAG } 100 \text{ g}^{-1} \text{ MF}$. Sin embargo, este incremento no logró ser significativo con respecto al control sin radiación UV-B (Figura 5.4).

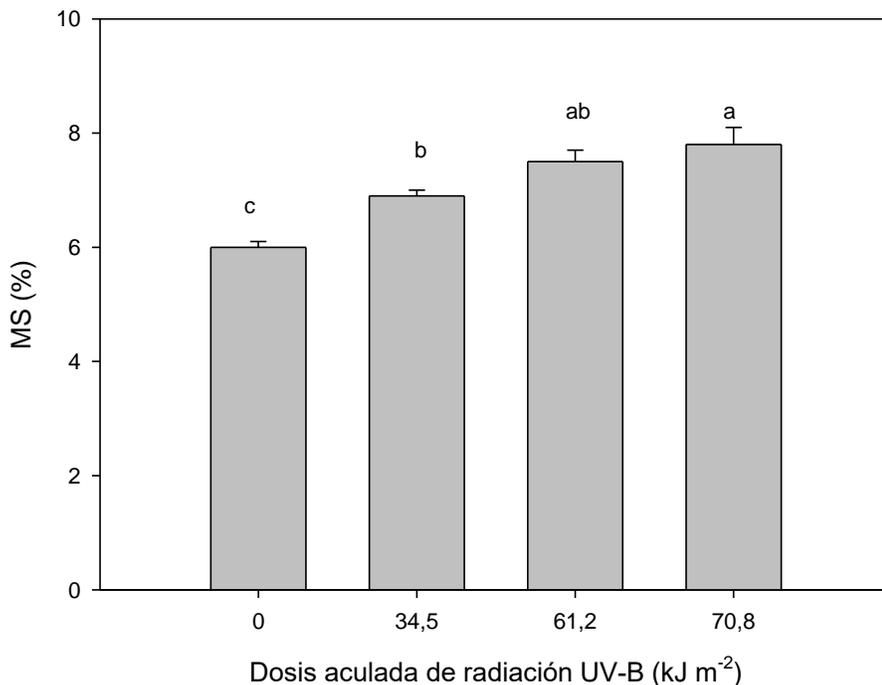


Figura 5.3. Porcentaje de masa seca de lechugas tipo Lollo Bionda cv. 'Levistro' cultivadas con diferentes dosis acumuladas de radiación UV-B.

Gráfica de la determinación de masa seca, expresada en porcentaje, de lechugas tipo Lollo Bionda cv. 'Levistro' cultivadas con diferentes dosis acumuladas de radiación UV-B (0; 34,5; 61,2; 70,8 kJ m⁻²). Barras representan valores promedio de 5 réplicas biológicas. a,b Letras diferentes corresponden a diferencias significativas determinadas por la prueba de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher con un nivel de significancia de $p < 0,05$.

De acuerdo con varios autores, la síntesis y acumulación de compuestos fenólicos, flavonoides y antocianinas es una de las respuestas más frecuente observada en las plantas expuestas a la radiación UV-B, ya que este tipo de radiación tiene la capacidad de inducir la respuesta de las enzimas fenilalanina amonio liasa (PAL) y chalcona sintasa (CHS), enzimas claves de la ruta de los flavonoides a la cual pertenecen este tipo de compuestos (Ebisawa *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2008; Zhang y Björn, 2009; Aksakal *et al.*, 2016). Frente a estos antecedentes se esperaría observar un incremento significativo debido al uso de radiación UV-B con respecto al control (0 kJ m⁻²), no obstante, los genotipos de una misma especie pueden presentar una amplia gama de sensibilidad a la radiación UV-B (Xu *et al.*, 2008). Por otro lado, la capacidad antioxidante medida por el método de FRAP presentó un comportamiento similar a la concentración de fenoles totales, incrementándose cuando las dosis de radiación UV-B utilizada fue de 34,5 kJ m⁻² para luego disminuir cuando la dosis acumulada de radiación fue de 61,2 o 70,8 kJ m⁻², sin presentar diferencias entre dosis (Figura 5.5 A). Por su parte, la capacidad antioxidante medida por DPPH presentó una reducción significativa cuando dosis de 61,2 y 70,8 kJ m⁻² fueron comparadas con respecto al control (0 kJ m⁻²) o dosis de 34,5 kJ m⁻² (Figura 5.5 B).

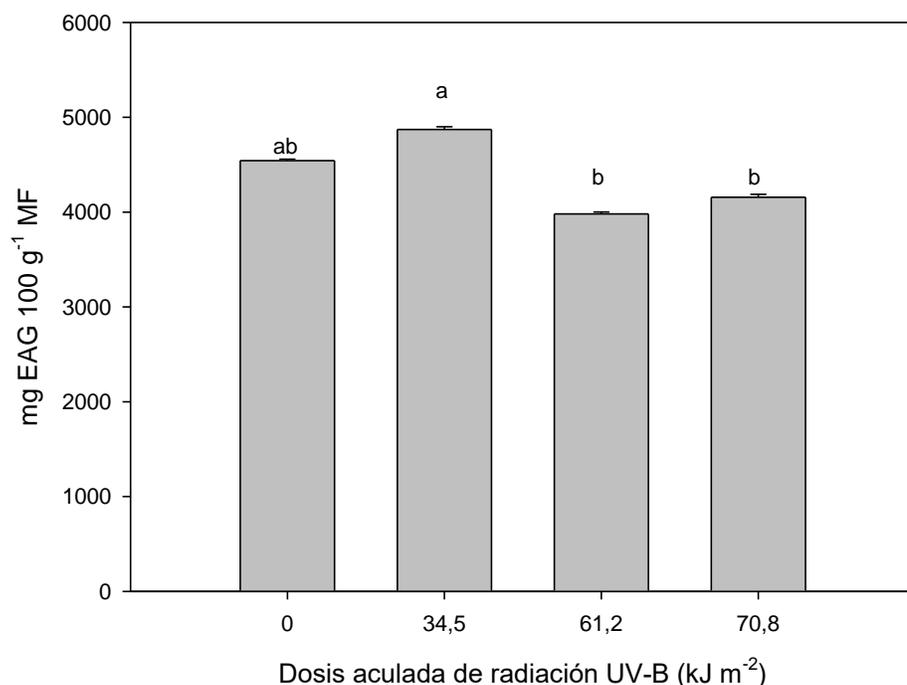


Figura 5.4. Concentración de fenoles totales en lechugas tipo Lollo Bionda cv. 'Levistro' cultivadas con diferentes dosis acumuladas de radiación UV-B.

Gráfica de la concentración de fenoles totales en lechugas tipo Lollo Bionda cv. 'Levistro' expresado en miligramos equivalentes de ácido gálico por cada 100 gramos de masa fresca (mg EAG 100g⁻¹ MF). Barras representan medias de 5 réplicas biológicas para cada tratamiento. a,b Letras diferentes corresponden a diferencias significativas determinadas por la prueba de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher con un nivel de significancia de $p < 0,05$.

Los resultados obtenidos a dosis de radiación UV-B altas (61,2 y 70,8 kJ m⁻²) muestran daños en las hojas (Figura 5.2), producto de un exceso de EROs las cuales agotarían los compuestos fenólicos (Figura 5.4; Figura 5.5) generando deterioros en la maquinaria fotosintética y en el fotosistema II (PSII), provocando fotoinhibición y muerte celular (Xu *et al.*, 2008; Wargent *et al.*, 2011; Terfa *et al.*, 2014).

El alza en la concentración de fenoles totales y capacidad antioxidante a dosis bajas de radiación y luego la disminución de los valores a dosis altas de radiación puede explicarse por lo expuesto por Hideg *et al.* (2012) quienes explican que la exposición de las plantas a un factor estresante puede causar estrés elástico reversible denominado "eustrés" el cual actúa como un estrés activador de procesos que ayudan a la planta a adaptarse al medio. Sin embargo, una vez que la exposición al factor estresante supera un límite de tolerancia la planta sufre daño irreversible, como ocurre con la exposición a altas dosis de radiación. Así, bajo condiciones de eustrés se mantienen niveles bajos de especies reactivas de oxígeno y la planta cuenta con suficiente capacidad antioxidante para contrarrestarlos. Por el contrario, en condiciones de altas dosis de radiación UV-B, se producen una concentración de especies reactivas de oxígeno que supera las que la planta puede contrarrestar, produciéndose los daños antes mencionados (Hideg *et al.*, 2012). Debido a lo anterior, es determinante considerar las dosis de exposición y sensibilidad a la radiación UV-B de las diferentes variedades y cultivares de lechuga a estudiar para obtener una hortaliza con mayores concentraciones de compuestos antioxidantes sin perjudicar el rendimiento.

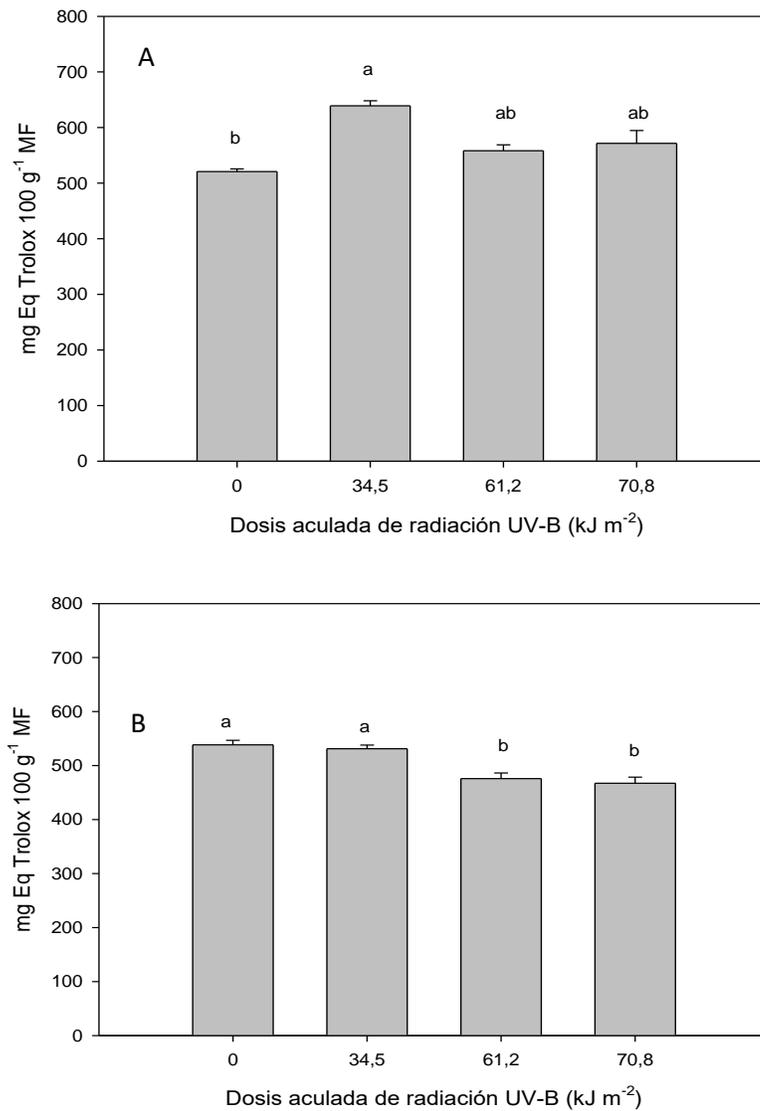


Figura 5.5. Capacidad antioxidante determinada por FRAP y DPPH para lechugas tipo Lollo Bionda cv. 'Levistro' cultivadas con diferentes dosis acumuladas de radiación UV-B.

Gráfica de la determinación capacidad antioxidante mediante los métodos de FRAP (A) y DPPH (B) expresado en miligramos equivalentes de Trolox por cada 100 gramos de masa fresca (mg eq Trolox 100g⁻¹ MF) en lechugas tipo Lollo Bionda cv. 'Levistro' cultivadas con diferentes dosis acumuladas de radiación UV-B (kJ m⁻²). Barras representan medias de 5 réplicas biológicas para cada tratamiento. ^{a,b} Letras diferentes corresponden a diferencias significativas determinadas por la prueba de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher con un nivel de significancia de $p < 0,05$.

5.1.4.- Conclusiones

Este estudio demostró que la exposición crónica de lechugas cultivar 'Levistro' a altas dosis de radiación UV-B, iguales o superiores a $61,2 \text{ kJ m}^{-2}$, resultó en alteraciones en la pigmentación del tejido foliar, en un incremento en masa seca y en una disminución en la concentración de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante en las plantas. Estos resultados resaltan la importancia de considerar las dosis de exposición y la sensibilidad a la radiación UV-B para determinar su tolerancia

5.1.5.- Bibliografía

- Ainsworth, E.A., and Gillespie, K. M. 2007. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent. *Nat. Protoc.* 2, 875- 877. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.102>
- Aksakal, O., Tabay, D., Esringu, A., Icoğlu Aksakal, F., Esim, N. 2016. Effect of Proline on Biochemical and Molecular Mechanism in Lettuce (*Lactuca sativa* L.) Exposed to UV-B radiation. *Photochem. Photobiol. Sci.* 16, 246–254. <https://doi.org/10.1039/C6PP00412A>
- Benzie, I.F. and Strain, J.J., 1996. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of ‘Antioxidant Power’: The FRAP Assay. *Anal. Biochem.* 239, 70–76. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>
- Brown, B.A., Cloix, C., Jiang, G.H., Kaiserli, E., Herzyk, P., Kliebenstein, D.J.; Jenkins, G.I. 2005. A UV-B-specific signaling component orchestrates plant UV protection. *PNAS.* 102, 18225–18230. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0507187102
- Coffey, A., Prinsen, E., Jansen, M.A.K., Conway, J. 2017. The UVB photoreceptor UVR8 mediates accumulation of UV absorbing pigments, but not changes in plant morphology, under outdoor conditions. *Plant Cell Environ.* 40, 2250–2260. <https://doi.org/10.1111/pce.13025>
- Di Rienzo, J.A., Casanoves, F., Balzarini, M.G., Gonzalez, L., Tablada, M., and Robledo, C.W. InfoStat versión., 2017. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. Disponible en <http://www.infostat.com.ar>
- Ebisawa, M., Shoji, K., Kato, M., Shimomura, K., Goto, F., Yoshihara, T. 2008. Supplementary ultraviolet radiation B together with blue light at night increased quercetin content and flavonol synthase gene expression in leaf lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Environ. Control Biol.* 46, 1-11. <https://doi.org/10.2525/ecb.46.1>
- Galieni, A., Di Mattia, C., De Gregorio, M., Specca, S., Mastrocola, D., Pisante, M., Stagnari, F., 2015. Effects of nutrient deficiency and abiotic environmental stresses on yield, phenolic compounds, and antiradical activity in lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Sci. Hort.* 187, 93-101. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.02.036>
- Gupta, S., Prakash, J., 2009. Studies on Indian Green Leafy Vegetables for Their Antioxidant Activity. *Plant Foods Hum. Nutr.* 64, 39-45. <https://doi.org/10.1007/s11130-008-0096-6>
- Hideg, E., Jansen, M., Strid, A. 2013. UV-B exposure, ROS, and stress: inseparable companions or loosely linked associates? *Trends Plant Sci.* 18, 107-15. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.09.003>
- Ioannidis, D., Bonner, L., Johnson, C. 2002. UV-B is Required for Normal Development of Oil Glands in *Ocimum basilicum* L. (Sweet Basil). *Ann. Bot.* 90, 453-460. <https://doi.org/10.1093/aob/mcf212>
- Kakani, V.G., Reddy, K.R., Zhao, D., and Sailaja, K. 2003^a. Field crop responses to ultraviolet-B radiation: a review. *Agricult. Forest Meteorol.* 120, 191–218 <https://doi.org/10.1016/j.agrformet.2003.08.015>
- Kakani, V.G., Reddy, K.R., Zhao, D., Mohammed, A.R., 2003. Ultraviolet-B radiation effects on cotton (*Gossypium hirsutum* L.) morphology and anatomy. *Ann. Bot.* 91, 817–826. <https://doi.org/10.1093/aob/mcg086>
- Nocchi, N., Monteiro, H., Crespo, R., Ungaretti, T., Ribeiro, A. 2020. Effects of UV-B radiation on secondary metabolite production, antioxidant activity, photosynthesis, and herbivory interactions in *Nymphoides humboldtiana* (Menyanthaceae). *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 212, 112021. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2020.112021>
- Ordidge, M., García-Macías, P., Battey, N., Gordon, M., Hadley, P., John, P., Lovegrove, J., Vysini, E., Wagstaffe, A. 2010. Phenolic contents of lettuce, strawberry, raspberry, and blueberry

crops cultivated under plastic films varying in ultraviolet transparency. *Food Chem.* 119, 1224–1227. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.08.039>

Parihar, P., Singh, S., Singh, R., Singh, V. P., Prasad, S. M. 2015. Changing scenario in plant UV-B research: UV-B from a generic stressor to a specific regulator. *J. Photochem. Photobiol. B, Biol.* 153, 333-343. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2015.10.004>

Pérez-López, U., Sgherri, C., Miranda-Apodaca, J., Micaelli, F., Lacuesta, M., Mena-Petite, A., Quartacci, MF., Muñoz-Rueda, A. 2018. Concentration of phenolic compounds is increased in lettuce grown under high light intensity and elevated CO₂. *Plant Physiol. Biochem.* 123, 233-41. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.12.010>

Terfa, MT., Roro, AG., Olsen, JE., Torré, S. 2014. Effects of UV radiation on growth and postharvest characteristics of three pot rose cultivars grown at different altitudes. *Sci. Hortic.* 178, 184–191. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2014.08.021>

Wargent, J., Elfadly, E., Moore, J., Paul, ND. 2011. Increased exposure to UV-B radiation during early development leads to enhanced photoprotection and improved long-term performance in *Lactuca sativa*. *Plant Cell Environ.* 34, 1401-1413. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2011.02342.x>

Xu, C., Natarajan, S., Sullivan, JH. 2008. Impact of solar ultraviolet-B radiation on the antioxidant defense system in soybean lines differing in flavonoid contents. *Environ. Exp. Bot.* 63, 39–48. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2007.10.029>

Xu, J., Su, X., Li, Y., Sun, X., Wang, D., Wang, W. 2019. Response of Bioactive Phytochemicals in Vegetables and Fruits to Environmental Factors. *EJNFS.* 9, 233-247. <https://doi.org/10.9734/EJNFS/2019/v9i330062>

Zhang, W.J. y Björn, L.O. 2009. The Effect of Ultraviolet Radiation on the Accumulation of Medicinal Compounds in Plants. *Fitoterapia*, 80, 207-218.

5.2.- Efecto de la aplicación de diferentes dosis de radiación UV-B y la realización de cosechas sucesivas en el rendimiento y concentración de compuestos fenólicos de lechugas Lollo Bionda cv. 'Levistro' y Lollo Rosso cv. 'Carmolí'

5.2.1.- Introducción

La radiación UV-B tiene suficiente energía para promover la sobreproducción de radicales libres y generar estrés oxidativo, lo que desencadena respuestas de foto protección como la disminución del área foliar y el rendimiento (Tsormpatsidis *et al.*, 2008; Sakalauskaitė *et al.*, 2012). Algunos estudios han demostrado que la radiación UV-B actúa más como un factor regulador y de aclimatación que como un factor de estrés ambiental limitante para el crecimiento y desarrollo de las plantas (Parihar *et al.*, 2015; Coffey *et al.*, 2017; Nocchi *et al.*, 2020). Estas respuestas de aclimatación a la radiación UV-B incluyen ajustes en el perfil de una gama amplia de metabolitos, especialmente en la síntesis de compuestos fenólicos y flavonoides (Brown *et al.*, 2005; Parihar *et al.*, 2015; Ebisawa *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2008; Coffey *et al.*, 2017). Por otro lado, la radiación UV-B puede generar cambios morfológicos en las células de la planta (Staxén y Bornman 1994; Kakani *et al.*, 2003), resultando en la reducción del área foliar y modificando la densidad estomática (Hollosy, 2002; Aksakal, *et al.*, 2016). Por tanto, controlar las respuestas de adaptación de las plantas frente a la radiación UV-B ofrece una oportunidad para mejorar la calidad funcional de las hortalizas mediante el uso de ambientes controlados donde se suplemente radiación UV-B en las dosis adecuadas (Oh *et al.*, 2009).

Por otro lado, los daños físicos como el corte de hojas durante el cultivo también podrían generar una mayor producción de compuestos fenólicos al aumentar la actividad de la fenilalanina amoniaco liasa (Bi y Felton, 1995). Muchos compuestos derivados de la ruta fenilpropanoide son inducidos en respuesta a las heridas (Dixon y Paiva, 1995). Una de las respuestas más rápidas de las células vegetales frente a heridas es la producción acelerada de especies reactivas de oxígeno (EROs) como mecanismo protector contra el estrés (War *et al.*, 2012). Para controlar y regular este estallido oxidativo, se gatilla también un incremento en la síntesis de metabolitos secundarios, siendo los fenoles uno de compuestos defensivos más comunes y extendidos. Así, diferentes fuentes de estrés, como ataques de microorganismos o plantas competidoras, dan como resultado la acumulación de compuestos fenólicos que actúan como un mecanismo defensivo (Usha y Jyothsna, 2010; War *et al.*, 2012).

En este contexto, y debido a que se han utilizado prácticas ambientales, culturales y de manejo para mejorar la calidad de la lechuga y sus contenidos fitoquímicos y atributos promotores de la salud (Mulabagal *et al.*, 2010), el propósito del estudio fue evaluar el efecto del corte generado al realizar cosechas sucesivas de hojas, en diferentes estados fenológicos y la suplementación de diferentes dosis de radiación UV-B, aplicadas durante el cultivo, como factores estresantes sobre la biosíntesis de compuestos y capacidad antioxidante, parámetros agronómicos y anatomía celular foliar de lechugas tipo Lollo Bionda cv. 'Levistro' y Lollo Rosso cv. 'Carmolí'. La biosíntesis de compuestos antioxidantes se determinó evaluando la concentración de fenoles, flavonoides y antocianinas totales y determinando la capacidad antioxidante por los métodos de FRAP y DPPH. Se analizaron también la masa fresca y seca de las lechugas como parámetros agronómicos, y para la evaluación de los cambios producidos en la anatomía celular foliar se realizó un recuento de la densidad celular y estomática y una cuantificación del espacio intercelular en el tejido foliar.

5.2.2.- Metodología

5.2.2.1.- Material vegetal y condiciones de cultivo

Como material vegetal se cultivaron lechugas tipo Lollo Bionda cultivar 'Levistro' (hojas verdes) y de tipo Lollo Rosso cultivar 'Carmolí' (hojas rojas) de la empresa Rijk Zwaan (Chile). La germinación de las semillas de lechuga de ambos cultivares, condiciones de cultivo de los almácigos y trasplante se realizaron como se describe en la sección 4.1 durante la temporada de otoño.

El período de crecimiento de las lechugas se llevó a cabo en un invernadero plástico tipo capilla de 8 m de ancho, 33 m de largo y 5,8 m de altura cenital y cubierto con una película de polietileno transparente de 200 μm de espesor la cual permitió una transmisión del 90 % y una difusión global de la luz el 20 % (Proamco, Chile). El invernadero contó con ventanas cenitales de apertura manual y un sistema automático de apertura y cierre de ventanas laterales, ambas cubiertas con malla anti-áfidos.

Las condiciones ambientales de cultivo: temperatura mínima y máxima del aire, temperatura promedio, conductividad eléctrica, oxígeno disuelto y pH de la solución nutritiva y la media diaria de radiación solar total fueron registradas durante todo el periodo de cultivo y se presentan en la Figura 5.6.

Para determinar el efecto del corte, el tiempo de cosecha y el uso de radiación UV-B como prácticas agrícolas de cultivo sobre la concentración de compuestos fenólicos en lechugas verdes y rojas se realizaron dos experimentos continuos. El objetivo del primer experimento fue aislar el efecto del corte y el tiempo de cosecha sobre los parámetros antes mencionados.

El objetivo del segundo experimento fue evaluar el efecto de la suplementación UV-B en combinación con diferentes tiempos de cosecha en los mismos parámetros. En este segundo experimento, como evaluación adicional, se consideró la concentración de prolina como un indicador de estrés, y también se evaluaron los cambios anatómicos de las hojas.

5.2.2.2.- Montaje de los ensayos y diseños experimentales

Experimento 1:

El experimento fue realizado para los cultivares de lechuga 'Levistro' y 'Carmolí' y fue dispuesto en tres bloques con un arreglo de parcelas divididas, donde se consideraron dos factores. El primer factor fue el tiempo de cosecha (1^{a} , 2^{a} , 3^{a}) y el segundo a la ejecución del corte previo o sin él (con: cc y sin: sc). El corte de las hojas fue realizado utilizando unas tijeras de acero inoxidable sanitizada entre cortes con una solución al 70 % de etanol. Debido a que en este experimento la primera cosecha no tuvo corte previo, estos datos fueron analizados y presentados como valor de referencia inicial.

Experimento 2:

El experimento fue realizado para lechugas tipo Lollo Bionda cv. 'Levistro' y tipo Lollo Rosso cv. 'Carmolí' y fue dispuesto en tres bloques con un arreglo de parcelas divididas, donde se consideraron dos factores. El primer factor fue el tiempo de cosecha (1^{a} , 2^{a} , 3^{a}) y el segundo factor la dosis de radiación UV-B (0; 5,2; 10,5 kJ m^{-2}). Cada bloque representó una repetición, por lo que se dispuso de tres sistemas hidropónicos de raíz flotante independientes para cada dosis de radiación UV-B evaluada. Cada repetición consistió en una lámina de poliestireno expandido con una densidad de plantación de 50 plantas m^{-2} de $0,5*1,5*0,025$ m y 25 kg m^{-3} de densidad. Sobre esta repetición se aplicaron los tratamientos de radiación UV-B utilizando 2 lámparas de UV-B de banda ancha TL (Philips, Países Bajos). Las lámparas fueron fijadas en el centro de una estructura rectangular de acrílico transparente de 6 mm de espesor con las siguientes dimensiones: 0,63 m

ancho, 1,54 m largo y 0,80 m alto. La radiación UV-B fue aplicada a una distancia de 60 cm sobre la base del cultivo.

Para seleccionar las dosis de UV-B se consideraron los resultados de la sección 5.1, donde una dosis acumulada de $34,5 \text{ kJ m}^{-2}$ no generó daños visibles en las hojas (Figura 5.2). Con esta información preliminar se definieron 3 dosis de radiación UV-B acumulada ajustando el tiempo de encendido de las lámparas en 0, 30 y 60 min respectivamente, una vez por día, durante 10 días consecutivos. De esta forma se obtuvieron dosis de 0 kJ m^{-2} , utilizado como control; $5,2 \text{ kJ m}^{-2}$ y $10,5 \text{ kJ m}^{-2}$ de radiación UV-B. La intensidad de radiación UV-B fue medida con un fotómetro y radiómetro (Solar Light, modelo PMA 2200, EE. UU.) utilizando un sensor de eritema PMA2101 UV-B (Solar Light, EE. UU.). Debido a que la cubierta del invernadero fue de polietileno, el cual no permitió el paso de la radiación UV-B natural, las plantas sólo recibieron la radiación UV-B aplicada por las lámparas. Los tratamientos de radiación UV-B comenzaron a ser aplicados cada día a las 10 am y, debido a que el material acrílico de la caja permitió el paso de la radiación fotosintéticamente activa (PAR) natural ($970 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), las plantas de lechuga recibieron el tratamiento de radiación UV-B en presencia de las otras longitudes de onda. De acuerdo con los datos de la estación meteorológica de Quinta Normal, Santiago disponible en <https://climatologia.meteochile.gob.cl>, la radiación global acumulada del período (abril 2016) fue de $2251,7 \text{ W h m}^{-2}$, con un fotoperiodo medio de 10,5 horas de luz por día.

5.2.2.3.- Parámetros analíticos del crecimiento de las plantas (MF, MS, % MS)

Para el primer experimento, las plantas se dividieron en dos grupos etiquetados con (cc) y sin (sc) corte previo. Para el primer grupo, las hojas completamente expandidas de la misma planta se cortaron los días 10 (hojas $5^{\text{a}} + 6^{\text{a}}$), 20 (hojas $7^{\text{a}} + 8^{\text{a}}$) y 30 (hojas $9^{\text{a}} + 10^{\text{a}}$) y etiquetadas como primera (1^{a}), segunda (2^{a}) y tercera (3^{a}) cosecha. Para el segundo grupo, fueron muestreadas las hojas totalmente expandidas en las mismas etapas fenológicas, provenientes de diferentes plantas con corte (cc) y sin corte (sc) previo. En el segundo experimento, después de la aplicación de radiación UV-B (0 ; $5,2$ y $10,5 \text{ kJ m}^{-2}$) se realizaron cosechas sucesivas. En la primera (1^{a}) cosecha, luego de 10 días desde el trasplante, se recolectaron las hojas verdaderas número 5 y 6. La segunda (2^{a}) cosecha fue realizada 20 días tras trasplante y se recolectaron las hojas verdaderas número 7 y 8. La tercera (3^{a}) y última cosecha, fue realizada luego de 30 días desde el trasplante sobre las hojas verdaderas número 9 y 10. El corte para cada cosecha fue realizado utilizando una tijera de acero inoxidable esterilizada con una solución de etanol al 70 % previo a cada corte.

Las mediciones de masa fresca (MF) y seca (MS), se realizaron como se describió en la sección 4.3. Para cada cosecha, fueron seleccionadas cinco réplicas biológicas por repetición ($n= 15$ por tratamiento).

5.2.2.4.- Parámetros de color (L, C*, hue)

Los parámetros de color fueron evaluados como una característica de calidad de las hojas, para ello en cada cosecha, se seleccionaron cinco hojas al azar por repetición, provenientes de 5 plantas diferentes ($n= 15$ por tratamiento). El color se midió utilizando un colorímetro compacto tri estímulo (espectrofotómetro Konica Minolta CM-2500d, EE. UU.), con una fuente de luz D65 y un ángulo de observación de 10° . Se midieron dos puntos en el haz de la hoja, por cada hoja, evitando la nervadura central. Los datos fueron analizados utilizando el espacio de color CIE $L^*a^*b^*$ y el software SpectraMagic NX, obteniéndose los valores de luminosidad (L), saturación de color o croma (C^*) y el ángulo del tono o matiz (hue) (McGuire, 1992).

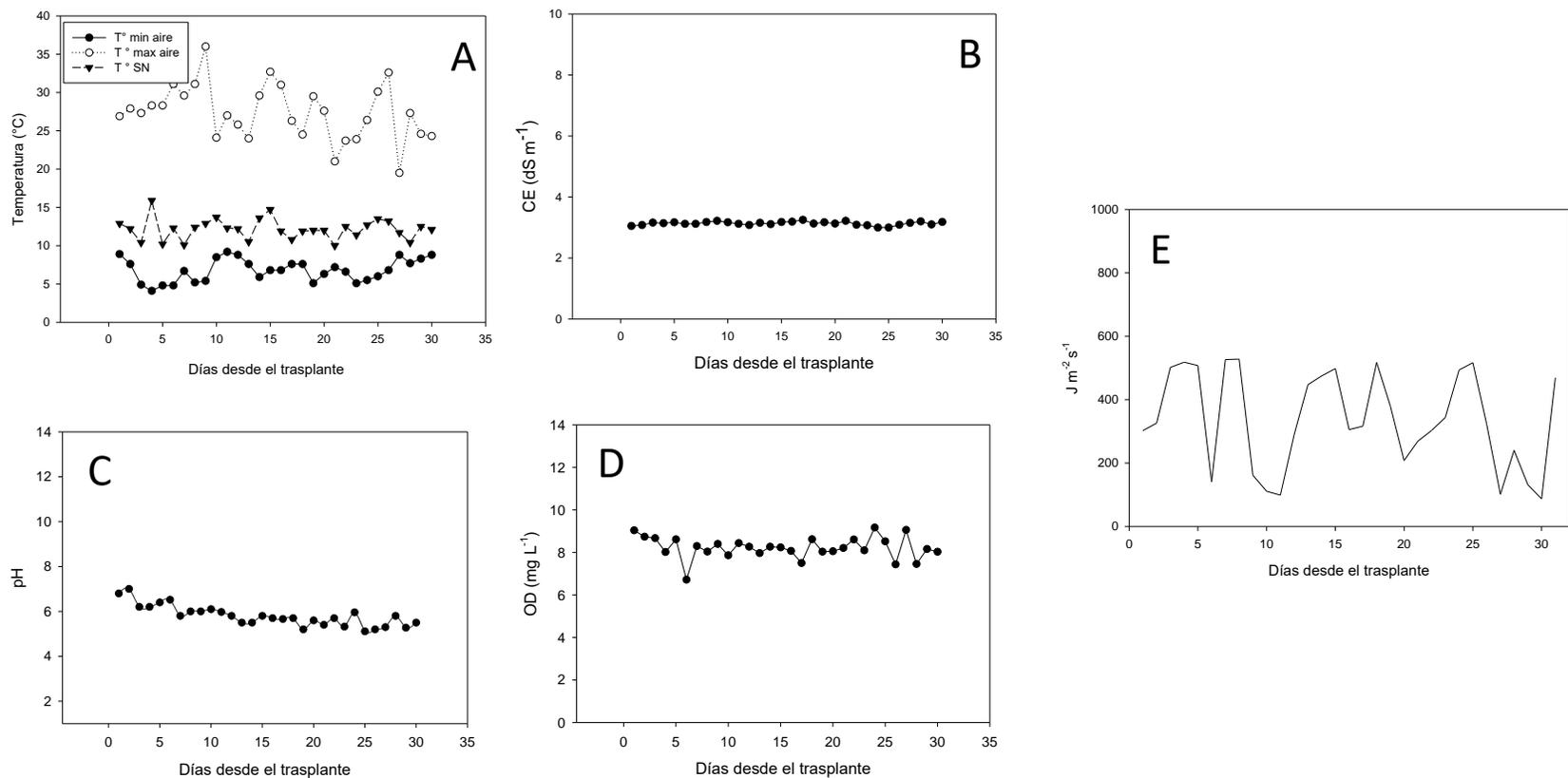


Figura 5.6. Temperaturas medias mínimas y máximas del aire en el invernadero y temperaturas de la solución nutritiva, conductividad eléctrica, pH y concentración de oxígeno disuelto de la solución nutritiva y radiación total global registradas durante el cultivo.

En la figura se presentan los parámetros ambientales registrados durante el cultivo de lechugas tipo Lollo Bionda cv. 'Levistro' y Lollo Rosso cv. 'Carmolí' con aplicación de diferentes dosis acumuladas de radiación UV-B: 0; 5,2 y 10,5 kJ m⁻². A: Temperaturas máximas y mínimas del aire dentro del invernadero y temperaturas de la solución nutritiva (SN) en °C. B: Conductividad eléctrica (CE) de la SN expresada en dS m⁻¹, C: pH de la SN. D: oxígeno disuelto expresado en mg L⁻¹ presente en la SN. E: Promedio diario de la radiación total global expresada en J m⁻² s⁻¹. Puntos representan medias ± EE del registro diario, a las 10 am, de tres mediciones por repetición (n=3). Registro de temperaturas mínimas y máximas del aire realizadas con data logger.

5.2.2.5.- Determinación de la concentración de compuestos funcionales

5.2.2.5.1- Extracción de las fracciones fenólicas

Para la extracción de compuestos fenólicos se seleccionaron tres muestras de cada repetición (9 muestras por tratamiento) siguiendo las recomendaciones de Galieni *et al.* (2015), como se describe en detalle en la sección 4.4.1. El extracto de MeOH: H₂O se almacenó a -20 °C en tubos ámbar hasta la realización de los análisis de compuestos fenólicos totales, flavonoides, antocianinas y actividad antioxidante por los métodos de FRAPP y DPPH.

5.2.2.5.2.- Determinación de la concentración de fenoles totales

La concentración de fenoles totales (FT) se midió utilizando el método propuesto por Ainsworth y Gillespie (2007), como se describe en la sección 4.4.2. Los resultados fueron expresados como miligramos equivalentes de ácido gálico por cada 100 gramos masa fresca (mg EAG 100 g⁻¹ MF).

5.2.2.5.3.- Determinación de la concentración de flavonoides totales

La concentración de flavonoides totales se midió siguiendo el método propuesto por Tharasena y Lawan (2014). En un tubo Eppendorf de 2 mL, se mezclaron 100 µL del extracto MeOH: H₂O con 100 µL de solución de NaNO₂ al 5 % y se dejó reaccionar 5 min en oscuridad. Una vez transcurrido este tiempo, se añadieron 100 µL de una solución de AlCl₃ al 10 % y se mezcló en vortex. La mezcla se dejó reaccionar 6 min en oscuridad. Finalmente, se añadieron 670 µL de NaOH 1 mol L⁻¹ y se leyó la absorbancia en una placa de 96 pocillos a 510 nm utilizando un espectrofotómetro multiplaca (ASYS, UVM340, Reino Unido). Como corrección de la línea de base se utilizó una reacción control sin muestra. La concentración de flavonoides totales se calculó utilizando una curva de calibración de rutina (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) y se expresaron como miligramos equivalentes de rutina (eq Rut) en 100 gramos de masa fresca (mg eq Rut 100 g⁻¹ MF).

5.2.2.5.4.- Determinación de la concentración de antocianinas totales

La concentración de antocianinas totales se determinó utilizando el método de pH diferencial siguiendo las recomendaciones de Du *et al.* (2014). Este método consistió en el uso de dos sistemas de tampones. El primero, una solución tampón de cloruro de potasio 0,025 mol L⁻¹ a pH 1,0 y el segundo una solución de acetato de sodio 0,4 mol L⁻¹ a pH 4,5. Los extractos de MeOH: H₂O fueron preparados como se describe en el punto 4.4.1 y diluidos con metanol hasta alcanzar una absorbancia a 520 nm en el rango de 0,1 a 1,2. Para la reacción se mezcló una alícuota de 100 µL de la muestra diluida con 900 µL de cada tampón. La absorbancia de cada reacción se leyó a dos longitudes de onda (520 y 700 nm) utilizando un espectrofotómetro multiplaca (ASYS, UVM340, Reino Unido). Como corrección de la línea de base se utilizó una reacción control sin muestra. La absorbancia final se calculó utilizando la siguiente expresión:

$$A = (A_{520\text{ nm}} - A_{700\text{ nm}})pH_{1,0} - (A_{520\text{ nm}} - A_{700\text{ nm}})pH_{4,5}$$

Una vez obtenido el valor de absorbancia final, se calculó la concentración de antocianinas totales como equivalente de cianidina-3-glucósido (mg L⁻¹), utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Antocianinas totales (mg L}^{-1}\text{)} = \frac{A * PM * FD * 1000}{\epsilon * l}$$

Donde A= absorbancia, PM= peso molecular de la Cianidina-3-glucósido (449,2 g mol⁻¹), FD= factor de dilución, ε= coeficiente de absorptividad molar de la Cianidina-3-glucosido (26900 L mol⁻¹ cm⁻¹), l= ancho de la cubeta (cm).

La concentración de antocianinas totales se expresó como miligramos equivalentes de cianidina-3-glucósido (eq Cian3gluc) en 100 gramos de masa fresca (mg eq Cian3gluc 100 g⁻¹ MF).

5.2.2.5.5.- Determinación de la capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante (CA) de las diferentes muestras se llevó a cabo mediante dos métodos descritos en la sección 4.4.3.

5.2.2.5.5.1.- Método de FRAP

El método de FRAP (Ferric reducing antioxidant power) se realizó de acuerdo con la metodología propuesta por Benzie y Strain (1996), detallado en la sección 4.4.3.1. Los resultados fueron expresados como miligramos equivalentes de Trolox (eq Trolox) por cada 100 gramos de materia fresca (mg eq Trolox 100 g⁻¹ MF).

5.2.2.5.5.2.- Método de DPPH

Para la determinación de la eliminación de radicales libres, se utilizó el reactivo radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) según la metodología descrita en Gupta y Prakash (2009) y detallada en la sección 4.4.3.2. Los resultados fueron expresados como miligramos equivalentes de Trolox (eq Trolox) por cada 100 gramos de materia fresca (mg eq Trolox 100 g⁻¹ MF).

5.2.2.6.- Determinación de la concentración de prolina

La concentración de prolina total se determinó según la metodología propuesta por Bates *et al.* (1973). Para ello, se suspendieron 0,2 g de polvo de lechuga liofilizado en 10 mL de solución de ácido sulfosalicílico al 3 % y se colocó en un baño de ultrasonido durante 10 min. Luego, las muestras fueron centrifugadas durante 10 min a 4 °C para separar el sobrenadante de las partes sólidas. Al mismo tiempo, se preparó una solución de ninhidrina ácida utilizando 1,25 g de ninhidrina, 30 mL de ácido acético glacial y 20 mL de ácido fosfórico a una concentración de 6 mol L⁻¹. Una vez que las muestras fueron centrifugadas, se colocó 1 mL del sobrenadante en un tubo de vidrio y se agregó 1 mL de solución de ácido-ninhidrina y 1 mL de ácido acético glacial. La mezcla se puso en un baño termostático a 100°C donde se dejó reaccionar durante 1 h. Una vez transcurrido el tiempo de reacción, ésta se detuvo utilizando un baño de hielo por 2 min. Cuando la mezcla estuvo fría, se añadieron 2 mL de tolueno y se agitó durante 20 segundos en un vortex. La solución se mantuvo a temperatura ambiente durante 30 min hasta que se observó claramente la separación de dos fases. La absorbancia de la fase superior (tolueno) se midió a 520 nm utilizando un espectrofotómetro multiplaca (ASYS, UVM340, Reino Unido). Como corrección de la línea de base se utilizó una reacción control sin muestra. La concentración de prolina total se determinó mediante una curva estándar de D-prolina (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania). Los resultados se expresaron como microgramos de prolina por cada 100 gramos de materia fresca (µg de prolina 100 g⁻¹ MF).

5.2.2.7.- Análisis de la anatomía celular foliar

Para la evaluación de la anatomía celular foliar se cortaron muestras circulares de hojas frescas con un perforador de 1 cm² de 5 plantas por repetición. Un conjunto de 15 muestras de tejido fresco por tratamiento fue utilizado para observar y cuantificar la densidad estomática y celular. Otro conjunto formado también por 15 muestras por tratamiento fue fijado en una solución de formaldehído, alcohol y ácido acético (FAA) en una proporción de 10%, 50% y 5% en agua, para luego ser incorporadas en resina. Posteriormente sobre esta resina se realizaron cortes histológicos del tejido foliar y finalmente se determinó el espacio intercelular.

5.2.2.7.1.- Determinación de la densidad estomática, densidad celular e índice estomático

Para determinar la densidad estomática y celular e índice estomático se utilizaron 15 muestras por tratamiento, provenientes del tejido foliar de 5 plantas por repetición. Las muestras fueron obtenidas del punto medio de la lámina de la hoja entre la nervadura central y el margen (Xie *et al.*, 2012). De las muestras circulares del tejido foliar fresco se cortaron trozos cuadrados de 5*5 mm con un bisturí y cada sección fue puesta en un portaobjetos de vidrio. Se raspó gentilmente la cara adaxial de la hoja para ayudar a fijar la tinción de rojo neutro para contar los estomas por la cara abaxial (Xie *et al.* 2012). Las muestras fueron observadas bajo un microscopio trinocular de campo claro (BA310 Motic, China) con un lente que permitió un acercamiento de 400 X y fueron fotografiadas por una cámara digital (Moticam 5.0 MP, China). La densidad estomática y celular se determinó luego del análisis de cinco imágenes por sección, con el programa ImageJ, un programa desarrollado por los Institutos Nacionales de Salud (NIH) versión v1.51j8 (Schneider *et al.*, 2012). La densidad estomática y celular fue expresada como N° de estomas mm⁻² y N° de células mm⁻², respectivamente. Finalmente se calculó el índice estomático (IE) utilizando la siguiente fórmula (Xie *et al.*, 2012).

$$\text{Índice estomático (IE)} = (\text{Densidad de estomas} / (\text{Densidad de estomas} + \text{densidad de células epidérmicas})) * 100$$

5.2.2.7.2.- Análisis histológico para la determinación del espacio intercelular foliar

Este análisis se realizó únicamente para las muestras provenientes de la 3ª cosecha. Se utilizaron 15 muestras de 1 cm² por tratamiento, obtenidas a partir de las hojas de 5 plantas diferentes por repetición. El tejido fue fijado con solución FAA. Luego se realizaron una serie de lavados con etanol al 50, 70, 90, 95% y dos lavados con etanol absoluto (Sivankalyani *et al.*, 2016). Una vez tratadas se obtuvieron cortes de 5*5 mm utilizando un bisturí. Se seleccionaron al azar tres cuadrados de 25 mm² por tratamiento para cada cultivar y se incluyeron en una resina utilizando el kit de inclusión JB-4, de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Sigma, Aldrich, Darmstadt, Alemania). A partir de cada muestra incluida en la resina se obtuvieron diez cortes de 10 µm de espesor utilizando un micrótopo manual (1516 Leitz, Alemania). Los cortes fueron colocados en un portaobjetos de vidrio y teñidos con ácido peryódico de Schiff (PAS) y azul de anilina, según el método propuesto por Sumner (2015) con algunas modificaciones. Así, los portaobjetos se sumergieron en ácido peryódico acuoso al 1 % durante 10 min y se lavaron con H₂O destilada durante 5 min. Luego, se sumergieron en el reactivo de Schiff por 15 min y se lavaron nuevamente con H₂O destilada por 10 min. Posteriormente, los portaobjetos permanecieron 2 min en una solución de sulfato de sodio al 2 % y se lavaron con H₂O destilada durante 10 min. Finalmente, los

portaobjetos con los cortes se sumergieron en anilina azul-negro como contra tinción durante 3 min y se lavaron con H₂O destilada hasta que no se detectó color en el agua.

Los cortes teñidos fueron observados bajo un microscopio trinocular de campo claro (BA310, Motic, China) con un lente que permitió observar las células con un acercamiento de 100X. Se obtuvieron imágenes utilizando una cámara digital (Moticam 5.0 MP, China) acoplada al microscopio. Se analizaron treinta de las imágenes obtenidas para cada tratamiento, utilizando el programa de procesamiento de imágenes ImageJ versión v1.51j8 (Schneider *et al.*, 2012). Para ello, cada imagen se calibró a la barra de escala obtenida del microscopio, se seleccionó manualmente el borde del tejido para así eliminar el fondo de la imagen y obtener el área total del tejido foliar fotografiado. Luego se aplicaron los filtros 'Convolve' y 'Minimun' a la imagen, para finalmente ponerla en blanco y negro ('Binary'). Una vez obtenida la imagen binaria se ajustó el umbral de análisis de partícula y con ello se obtuvo el área de los espacios intercelulares. La sumatoria de estos espacios correspondió al espacio intercelular total. Los resultados fueron expresados finalmente como porcentaje de espacio intracelular en el área total del tejido foliar observado.

5.2.2.8.- Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando el software InfoStat versión 2017 (Di Rienzo *et al.*, 2017) como se describe en la sección 4.4.4.

5.2.3.- Resultados y discusión

5.2.3.1.- Efecto de las cosechas sucesivas en lechugas tipo Lollo Bionda y Lollo Rosso (Experimento 1)

5.2.3.1.1.- Parámetros analíticos del crecimiento de las plantas

Se observó un efecto significativo del corte para en el cultivar 'Levistro' donde los valores significativamente más altos fueron registrados en las plantas sin corte previo (sc = 22,6 g), reduciendo la masa fresca obtenida en un 27 % con respecto a las plantas no cortadas (cc = 16,58 g) (Figura 5.7 A). Para el mismo cultivar, el porcentaje de MS presentó un valor significativamente mayor en la tercera cosecha de 8,64 % con respecto a la segunda de 6,80 % (Figura 5.7 B). En cambio, para el cultivar 'Carmolí' hubo una interacción entre los factores tiempo de cosecha y corte para MF y MS. El valor significativamente más alto de MF se observó en la tercera cosecha sin corte previo, alcanzando una masa fresca de 25,5 g. Este resultado dobló la masa fresca de las hojas con el mismo estado fenológico de plantas previamente cortadas (Figura 5.7 C). Por otro lado, se observó un aumento significativo en el porcentaje de MS en el mismo tiempo de cosecha de las plantas a las cuales se les realizó un corte previo, alcanzando valores de 7,84 %, con respecto a misma cosecha sin corte con 6,41 % (Figura 5.7 D). Este aumento en el porcentaje de MS puede deberse a la mayor síntesis de lignina y otros compuestos desencadenados en respuesta al corte (War *et al.*, 2012).

5.2.3.1.2.- Parámetros de color

En el cultivar 'Levistro' se observó una diferencia significativa en los tres parámetros de color (L, C* y hue) en función del tiempo de cosecha. Los valores de luminosidad y del ángulo hue incrementaron significativamente desde 48,27 a 52,54 y de 105,28 a 108,24° cuando se compararon la segunda con la tercera cosecha mientras que, en los mismos tiempos de cosecha, los valores de croma se redujeron significativamente de 49,07 a 46,73 (Figura 5.8). El aumento significativo de 3 puntos en el ángulo hue, indicaría un ligero movimiento hacia las tonalidades más verdes y un alejamiento de las amarillas, mientras que el mayor valor de croma alcanzado en la segunda

cosecha, mostraría un color verde más intenso (McGuire, 1992). Para el cultivar 'Carmolí' se registró una interacción significativa entre el tiempo de cosecha y el corte para la luminosidad, presentando un valor significativamente más alto de 17,09 en la tercera cosecha sin corte con respecto a las otras combinaciones (Figura 5.8). De manera similar, se observó un efecto significativo debido al corte, sobre el croma (C^*), registrando un mayor valor de 22,09 en las plantas con corte previo, lo cual indicaría un color más intenso que aquellas sin corte las cuales registraron un valor de 16,73. Estas diferencias en el color concuerdan con el reporte de Liu *et al.* (2007) quienes indican que las diferencias en el color de las plantas de lechuga fueron sensibles a las condiciones ambientales de cultivo.

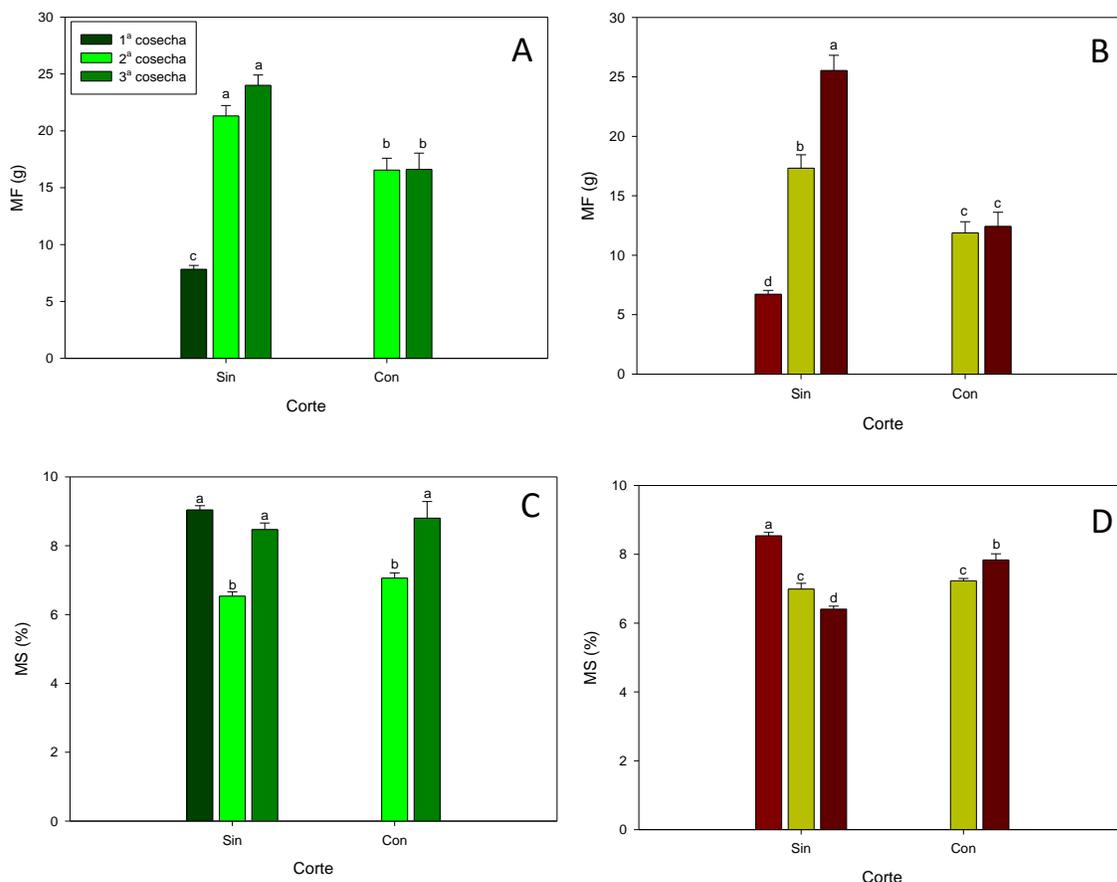


Figura 5.7. Masa fresca (MF) y porcentaje de masa seca (%MS) para lechugas Lollo Bionda cv. 'Levistro' y Lollo Rosso cv. 'Carmolí' luego de la realización (con) o la no realización (sin) de un corte previo durante tres tiempos de cosecha.

Las gráficas muestran el efecto del corte sobre la masa fresca y porcentaje de masa seca en lechugas Lollo Bionda cv. 'Levistro' (A, C) y Lollo Rosso cv. 'Carmolí' (B, D) durante varias cosechas sucesivas (2ª, 3ª cosecha). Barras representan medias (\pm EE) de 15 datos (5 muestras biológicas por cada réplica de tratamiento) por de materia fresca (MF) (A, B) y contenido de masa seca (MS) (C, D). ^{a,b,c,d} Letras diferentes corresponden a diferencias significativas determinadas por la prueba de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher con un nivel de significancia de $p < 0,05$. Los valores de la 1ª cosecha sin corte previo se reportan como valor referencial inicial.

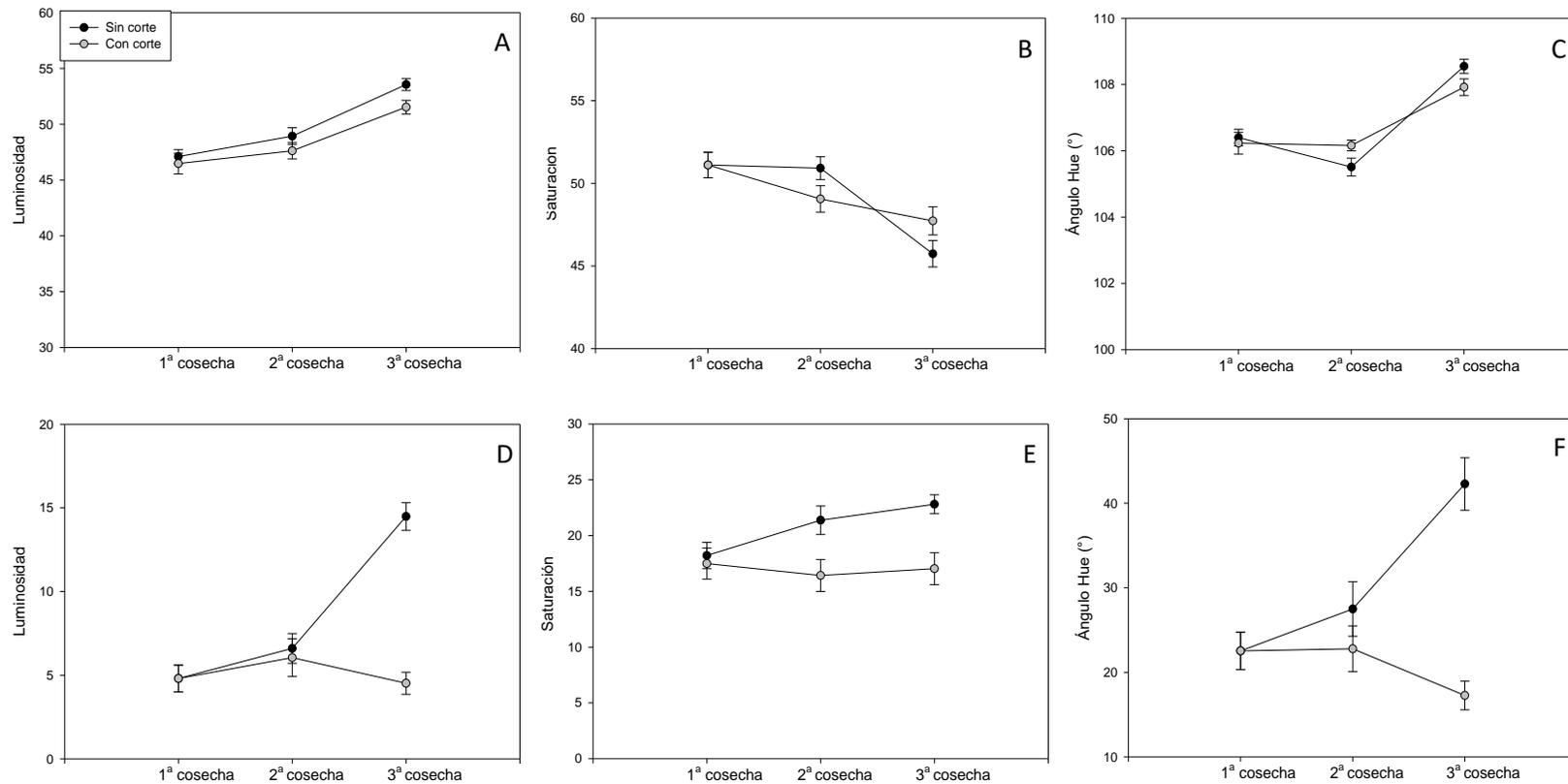


Figura 5.8. Luminosidad, croma y ángulo hue en lechugas tipo Lollo Bionda cv. 'Levistro' y tipo Lollo Rosso cv. 'Carmolí' luego de la realización (con) o la no realización (sin) de un corte previo durante tres tiempos de cosecha.

Las gráficas muestran los valores medios (\pm EE) de los diferentes parámetros que definen el color: Luminosidad (A, D); Saturación (B, E); y ángulo hue (C, F). De lechugas de hoja verde 'Levistro' (A-C) y hoja roja 'Carmolí' (D-F) crecidas con o sin la aplicación de radiación UV-B durante varias cosechas sucesivas (1ª, 2ª, 3ª cosecha).

5.2.3.1.3.- Concentración de fenoles, flavonoides, antocianinas totales y capacidad antioxidante

De acuerdo con este experimento en el cultivar 'Levistro' se observaron diferencias significativas debido a la cosecha para la concentración de fenoles y flavonoides totales. Para este cultivar la concentración de FT se incrementó desde 1280,44 hasta 1654,15 mg EAG 100 g⁻¹ MF entre la segunda y tercera cosecha, lo cual representa un incremento del 29%. Además, en el mismo periodo hubo un aumento significativo en la concentración de flavonoides totales desde 737,69 hasta 1029,72 mg Rut eq 100 g⁻¹ MF, mostrando un aumento del 40%. Por otro lado, el cultivar 'Carmolí', mostró una interacción significativa entre el momento de cosecha y el corte para la concentración de fenoles y flavonoides totales. En ambos parámetros los valores más altos se presentaron en la tercera cosecha con cortes previos, mostrando un aumento del 46 y 62 %, cuando se compararon con los valores alcanzados en la tercera cosecha sin corte de 2254,19 mg EAG 100 g⁻¹ MF y de 1021,90 mg Rut eq 100 g⁻¹ MF para fenoles y flavonoides respectivamente (Tabla 5.1). Del mismo modo, se registró una mayor concentración de antocianinas en 'Carmolí' cuando las plantas fueron previamente cortadas, incrementando su concentración en un 30 % con respecto a las plantas sin corte (Tabla 5.1). Cortar algunas hojas de plantas durante el cultivo podría generar una respuesta similar al estrés biótico causado por la herbivoría, provocando una mayor producción de compuestos fenólicos al aumentar la actividad de la fenilalanina amonio liasa (PAL) en el tejido debido al corte de la hoja (Bi y Felton, 1995). Por otro lado, de acuerdo con War *et al.* (2012) y Usha y Jyothsna (2010), los fenoles constituyen uno de los grupos de compuestos defensivos más comunes y extendidos en las plantas y Luna *et al.* (2012), indican que la herida por corte induce una acumulación de compuestos fenólicos en lechuga, lo cual podría explicar las diferencias registradas en este nuevo estudio en Levistro y Carmolí. De igual manera, Sellami *et al.* (2009) demostraron que hubo un efecto de la etapa de crecimiento sobre la concentración y composición de la fracción fenólica de la mejorana dulce, presentando una mayor concentración de fenoles totales durante la etapa que los autores denominan etapa vegetativa tardía, por sobre las etapas vegetativa temprana, brotación, y floración. Por su parte Pinto *et al.* (2014) informaron que el valor nutricional mineral, clorofila y carotenoides de la lechuga dependía en gran medida de la etapa de crecimiento y que sus concentraciones disminuyen en función de la edad de las hojas. Marcando la relevancia de estudiar los compuestos de interés asociados a la edad del cultivo. Las mayores concentraciones de fenoles totales, flavonoides y antocianinas para el cultivar 'Carmolí' sobre el cultivar 'Levistro' confirmaron las diferencias en la concentración de estos compuestos antioxidantes entre cultivares rojos y verdes (Pérez-López *et al.*, 2014; Sgherri *et al.*, 2017).

Con respecto a la capacidad antioxidante (CA) el cultivar 'Levistro' presentó menor CA que 'Carmolí' presentando un comportamiento característico entre lechugas verdes y rojas (Liu *et al.*, 2007; Llorach *et al.*, 2008). La CA medida por DPPH mostró un comportamiento similar a la concentración de fenoles y flavonoides totales para 'Levistro', presentando diferencias significativas en respuesta al tiempo de cosecha. Esta relación se explica debido a que este tipo de compuestos presentan una conocida actividad antioxidante (Gazula *et al.*, 2007). La tercera cosecha mostró valores de 159,95 mg eq Trolox 100 g⁻¹ MF, mientras que la segunda presentó un valor de 131,21 mg eq Trolox 100 g⁻¹ MF, lo cual representa un aumento del 22 % (Tabla 5.1). En este mismo cultivar, la CA medida por FRAP presentó una interacción significativa entre la cosecha y el corte. El mayor valor se registró en la tercera cosecha con corte previo (451,88 mg eq Trolox 100 g⁻¹ MF), lo cual representa un incremento del 38 % con respecto a la segunda cosecha con corte (326,93 mg eq Trolox 100 g⁻¹ MF) y fue mayor a los valores reportados por Llorach *et al.* (2008) para lechugas verdes quienes reportaron concentraciones entre 63,5 y 125,5 mg 100 g⁻¹ MF para lechugas tipo Romana y Continental. Para el cultivar 'Carmolí' la CA medida tanto por el método de FRAP como por el método de DPPH presentó una interacción significativa entre la cosecha y el corte. Los mayores

valores de DPPH se registraron en la tercera cosecha con corte previo, registrando un valor de 290,59 mg eq Trolox 100 g⁻¹ MF. A pesar de mostrar una tendencia similar a la de fenoles y flavonoides totales, el aumento en la CA fue de solo un 15 % en comparación con la tercera cosecha sin corte previo (253,23 mg eq Trolox 100 g⁻¹ MF). Asimismo, la CA medida por FRAP, registró el valor más alto en la tercera cosecha con corte anterior, alcanzando 862,13 mg eq Trolox 100 g⁻¹ MF, lo que representa un incremento del 18 % con respecto al valor más bajo de 732,91 mg eq Trolox 100 g⁻¹ MF, registrados en la segunda cosecha con corte anterior (Tabla 5.1) y corresponde con los valores registrados por Llorach *et al.* (2008) para Lollo Rosso quienes reportaron 775,3 mg eq Trolox 100 g⁻¹ MF. Estos resultados confirman además que las plantas generan una respuesta antioxidante frente al estrés por corte y producto de la edad fenológica descrita por Bi y Felton (1995) y Pinto *et al.* (2014).

5.2.3.2.- Efecto de la radiación UV-B y el tiempo de cosecha en lechugas tipo Lollo Bionda y Lollo Rosso (Experimento 2)

5.2.3.2.1.- Parámetros analíticos del crecimiento de las plantas

La aplicación de radiación UV-B durante el cultivo de las lechugas y las cosechas sucesivas afectaron la MF y el porcentaje de MS para el cultivar 'Levistro'. Sin embargo, sólo el tiempo de cosecha afectó los mismos parámetros para el cultivar 'Carmolí'. A medida que aumentó el tiempo de cosecha, aumentó la MF y el porcentaje de MS en ambos cultivares, obteniéndose los mayores valores en la tercera cosecha (Figura 5.9). Cuando se comparó la tercera cosecha con la primera, el cultivar 'Levistro' mostró un aumento desde 4,64 a 15,52 g, lo que representa un incremento del 230 % en MF (Figura 5.9 A). Por el contrario, el cultivar 'Carmolí' sólo presentó un aumento desde 3,34 a 4,66 g (41 %) cuando se compararon los mismos tiempos de cosecha (Figura 5.9 C). Para el caso del porcentaje de masa seca, al comparar la primera con la tercera cosecha, 'Levistro' y 'Carmolí' registraron un incremento desde 6,55 a 6,72% y desde 5,8 a 7,46% respectivamente. Las diferencias en MF y % MS registradas producto de la radiación UV-B y los diferentes estadios fenológicos, que en el caso de este experimento corresponden a los estados de desarrollo de 5^a y 6^a hojas verdaderas para la 1^a cosecha; 7^a y 8^a hojas verdaderas para la 2^a cosecha; y 9^a y 10^a hojas verdaderas para la 3^a cosecha, son consistentes con los resultados reportados por Sakalauskaitė *et al.* (2012) quienes mostraron que en *Ocimum basilicum* intensidades de 2 y 4 kJ m⁻² día⁻¹ de radiación UV-B incrementaron el porcentaje de MS desde 8,5% a un 8,7% para el estadio de 3^a y 4^a hojas verdaderas y desde 9,9% a 12,1% en el estadio de floración.

Por otro lado, la radiación UV-B produjo una disminución significativa de la MF en 'Levistro' desde 10,93 g, registrado en el control (0 kJ m⁻²), hasta 8,66 g obtenidos con 10,5 kJ m⁻² lo cual representa una disminución de un 20 % en la MF. Mientras que en estas condiciones se generó un aumento significativo del porcentaje de masa seca para el mismo cultivar desde 6,30% registrado en las lechugas control (0 kJ m⁻²) y de 6,62 en las cultivadas con 10,5 kJ m⁻² de radiación UV-B (Figura 5.9 A y B). Esta respuesta se relacionaría con el aumento en el grosor de las hojas, modificación morfológica común observada cuando las plantas de lechuga son expuestas a dosis de 3,3 Wm⁻² durante 12 horas de radiación UV-B, lo que equivale a una dosis acumulada de 142 kJ m⁻² (Aksakal *et al.*, 2016).

Bajo las condiciones de radiación UV-B estudiadas, el cultivar 'Carmolí' sólo mostró una tendencia similar a 'Levistro' pero sin registrarse diferencias significativas (Figura 5.9 D). Este comportamiento, observado en el cultivar 'Carmolí', difiere de los resultados obtenidos por Tsormpatsidis *et al.* (2008) para lechugas tipo Lollo Rosso, donde reportaron una reducción significativa en el crecimiento vegetativo en presencia de radiación UV-B, expresado como una

reducción en el número total de hojas de 27 a 21 cuando las lechugas fueron cultivadas bajo una transmisión de UV (280-400 nm) del 0 y 81% respectivamente. Sin embargo, Tsormpatsidis *et al.* (2008) también reportaron que bajo un bloqueo completo de radiación UV (0% de transmisión de UV en el rango de 280-400 nm), las plantas alcanzaron entre un 40 y 122% más masa seca (g) que las plantas crecidas bajo el tratamiento de transparencia de UV (81% de transmisión de UV en el rango de 280-400 nm), comportamiento opuesto al observado para el cultivar 'Carmolí', perteneciente al mismo tipo de lechugas estudiado por estos autores.

5.2.3.2.2.- Parámetros de color

Se ha observado una relación directa entre los cambios de color y la concentración de compuestos fenólicos para diferentes cultivares de lechuga verde y roja cultivadas bajo distintas condiciones ambientales (Gazula *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2007). Así, Gazula *et al.* (2007) mostraron que la concentración de antocianinas ($\mu\text{g g MS}^{-1}$) en 9 cultivares de lechuga roja, se relaciona con la reflectancia medida a 635 nm con un $R^2= 0,89$; con el ángulo hue con un $R^2= 0,51$, y con la saturación del color o croma con un $R^2= 0,80$. Por otro lado, Zhao *et al.* (2007), discuten que la radiación UV-B induce la síntesis de antocianinas y otros flavonoides y que las lechugas 'Red Sails' cultivadas a campo abierto presentaron un color rojo más pronunciado en primavera y mayores concentraciones de ácido clorogénico, diferentes derivados de quercetina, y mayores concentraciones de luteolina que las cultivadas bajo invernadero. En cuanto a los diferentes parámetros de color, sólo la luminosidad (L) en el cultivar 'Levistro' presentó diferencias significativas respecto al tratamiento con radiación UV-B. En este sentido, se observó una reducción de la L en las hojas tratadas con 5,2 o 10,5 kJ m^{-2} , lo cual indicaría un oscurecimiento respecto al control sin radiación UV-B (0 kJ m^{-2}) (Figura 5.10 A). Asimismo, hubo un efecto significativo de las cosechas sucesivas sobre la saturación del color o croma (C^*) cuyo comportamiento dependió de cada cultivar. Para el cultivar 'Levistro' el C^* alcanzó el valor más alto en la segunda cosecha (55,82) y el valor más bajo en la primera cosecha (50,03) (Figura 5.10 B). Por el contrario, el cultivar 'Carmolí' presentó su valor más bajo en la segunda cosecha (5,06), indicando un color menos intenso (Figura 5.10 E).

En relación con el ángulo hue, hubo un efecto significativo de las cosechas sucesivas para el cultivar 'Levistro'. Las muestras de la primera cosecha alcanzaron 105,74°, valor significativamente más alto que los obtenidos para la 2ª y 3ª cosecha de 104,54 y 104,75°, respectivamente (Figura 5.10 C). Sin embargo, en el cultivar 'Carmolí' no se observó un efecto significativo de la radiación UV-B ni de las cosechas sucesivas en el ángulo hue (Figura 5.10 F). Cabe señalar que los valores de ángulo hue registrados para el cultivar 'Levistro' de 104 y 106° corresponden a tonalidades amarillo-verde y que los de 'Carmolí' de 15 y 16° corresponden a tonalidades rojas (McGuire, 1992). Según la revisión de Kakani *et al.* (2003) las plantas de cultivo extensivo como, algodón, arroz, maíz, y plantas de arveja, haba y pepino, cultivadas bajo condiciones de excesiva radiación UV-B como 16 $\text{kJ m}^{-2} \text{d}^{-1}$, muestran un cambio de coloración, presentando inicialmente manchas bronceadas o marrones en la superficie de las hojas, lo que conduce posteriormente a una clorosis, necrosis y desecación de las hojas. En este sentido se observaron algunas hojas con manchas color marrón en el cultivar 'Levistro' (Figura 5.11 A, B) y unas manchas color verde en hojas del cultivar 'Carmolí' (Figura 5.11 C, D) cuando fueron cultivadas a 10,5 kJ m^{-2} . La presencia de estas manchas a dosis de 10,5 kJ m^{-2} indicarían que estas serían excesivas para estos cultivares y provocaron daño en las zonas más expuestas de la hoja.

Tabla 5.1. Concentración de fenoles, flavonoides, antocianinas totales y capacidad antioxidante para lechugas Lollo Bionda cv. ‘Levistro’ y Lollo Rosso cv. ‘Carmolí’, luego de la realización (con) o la no realización (sin) de un corte previo durante tres tiempos de cosecha.

| Factor | Nivel | Fenoles | | | | Flavonoides | | | | Antocianinas | | Capacidad antioxidante | | | | | | | |
|-----------------------|------------------------|---|-------------|---------------------|-------------|--|-------------|---------------------|-------------|--|------------|---|-------------|---|-------------|--------------------|------------|--------------------|------------|
| | | ‘Levistro’ | | ‘Carmolí’ | | ‘Levistro’ | | ‘Carmolí’ | | ‘Carmolí’ | | FRAP | | DPPH | | | | | |
| | | -----mg EAG 100 g ⁻¹ MF----- | | | | -----mg eq Rut 100 g ⁻¹ MF----- | | | | mg eq Cian3gluc 100 g ⁻¹ MF | | -----mg eq Trolox 100 g ⁻¹ MF----- | | -----mg eq Trolox 100 g ⁻¹ MF----- | | | | | |
| | Media | EE | Media | EE | Media | EE | Media | EE | Media | EE | Media | EE | Media | EE | Media | EE | Media | EE | |
| Tiempo de cosecha (1) | 1 ^a | (1811,2) | 26,5 | (2944,7) | 88,0 | (953,0) | 57,9 | (1464,5) | 66,8 | (5,8) | 0,1 | (469,6) | 25,2 | (787,5) | 32,3 | (163,0) | 0,6 | (321,3) | 2,2 |
| | 2 ^a | 1280,4 ^b | 53,7 | 2706,8 | 74,7 | 737,7 ^b | 33,2 | 1398,2 | 43,5 | 5,4 | 0,4 | 335,0 | 11,9 | 752,4 | 19,3 | 131,2 ^b | 0,9 | 269,4 | 1,3 |
| | 3 ^a | 1654,2 ^a | 61,3 | 2774,5 | 236,3 | 1029,7 ^a | 46,0 | 1336,7 | 142,4 | 6,1 | 0,5 | 414,6 | 18,5 | 801,6 | 33,8 | 160,0 ^a | 0,5 | 271,9 | 8,4 |
| Corte (2) | Sin (sc) | 1532,5 | 96,5 | 3058,0 ^a | 118,2 | 928,4 | 68,5 | 1561,5 ^a | 50,6 | 6,4 ^a | 0,4 | 389,4 | 30,0 | 797,5 | 37,2 | 146,5 | 6,3 | 278,7 | 5,4 |
| | Con (cc) | 1402,1 | 97,9 | 2423,3 ^b | 87,3 | 839,0 | 78,8 | 1173,4 ^b | 70,1 | 5,0 ^b | 0,3 | 360,1 | 11,5 | 756,5 | 14,1 | 144,6 | 6,6 | 262,6 | 4,2 |
| (1 x 2) | 2 ^a x sc | 1362,2 | 72,0 | 2821,1 ^b | 78,8 | 797,1 | 22,2 | 1471,6 ^b | 51,4 | 5,9 | 0,5 | 326,9 ^b | 21,3 | 732,9 ^b | 31,2 | 132,5 | 1,4 | 266,7 ^c | 1,1 |
| | 3 ^a x sc | 1702,9 | 111,1 | 3294,9 ^a | 87,0 | 1059,7 | 77,3 | 1651,5 ^a | 45,3 | 7,0 | 0,3 | 451,9 ^a | 12,1 | 862,1 ^a | 42,2 | 160,6 | 0,1 | 290,6 ^a | 1,9 |
| | 2 ^a x cc | 1198,7 | 50,4 | 2592,4 ^b | 92,7 | 678,3 | 38,6 | 1324,9 ^c | 37,7 | 4,9 | 0,5 | 343,0 ^b | 13,8 | 771,9 ^{ab} | 22,5 | 129,9 | 0,3 | 272,0 ^b | 0,8 |
| | 3 ^a x cc | 1605,4 | 63,7 | 2254,2 ^c | 30,6 | 999,7 | 61,0 | 1021,9 ^d | 14,2 | 5,1 | 0,4 | 377,3 ^b | 13,2 | 741,1 ^b | 16,0 | 159,3 | 1,0 | 253,2 ^d | 1,2 |
| | valor <i>p</i> (1) | ** | | ns | | *** | | ns | | ns | | *** | | ns | | *** | | *** | |
| | valor <i>p</i> (2) | ns | | *** | | ns | | *** | | * | | ns | | ns | | ns | | ns | |
| | valor <i>p</i> (1 x 2) | ns | | *** | | ns | | *** | | ns | | * | | * | | ns | | *** | |

Corte: Sin corte (sc); Con corte (cc). Tiempo de cosecha: primera (1^a); segunda (2^a); tercera (3^a). Valores medios de 10 datos para el tiempo de cosecha, 10 mediciones para la realización o no realización de corte y de 5 mediciones para la interacción (1 x 2). Primera cosecha (1^a) incorporada como valor referencial inicial. ^{a,b,c,d} Letras diferentes corresponden a diferencias significativas determinadas por la prueba de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher con un nivel de significancia de $p < 0,05$. ns: no significativo; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$.

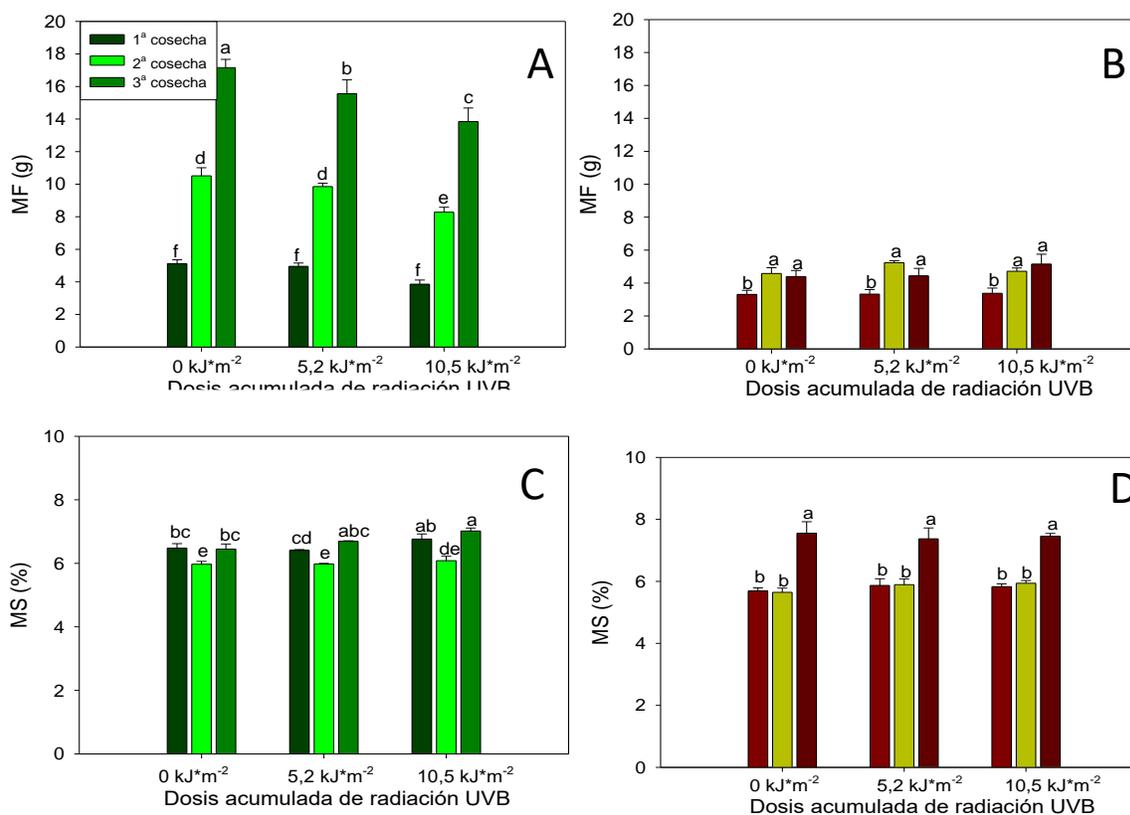


Figura 5.9. Masa fresca (MF) y porcentaje de masa seca (% MS) de lechugas Lollo Bionda ‘Levistro’ y Lollo Rosso ‘Carmolí’ durante tres tiempos de cosecha cultivadas con diferentes dosis de radiación UV-B.

Las gráficas muestran la materia fresca (MF) (A, B) y porcentaje de masa seca (% MS) (C, D) de lechugas Lollo Bionda cv. ‘Levistro’ (A, C) y Lollo Rosso cv. ‘Carmolí’ (B, D) cultivadas con diferentes dosis de radiación UV-B durante varias cosechas sucesivas (1ª, 2ª, 3ª cosecha). Barras representan de medias (± EE) de 5 réplicas biológicas por repetición (n=15). ^{a,b,c,d,e} Letras diferentes corresponden a diferencias significativas determinadas por la prueba de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher con un nivel de significancia de $p < 0,05$.

5.2.3.2.3.- Concentración de fenoles, flavonoides, antocianinas totales y capacidad antioxidante

La síntesis y acumulación de compuestos fenólicos, flavonoides y antocianinas son una de las respuestas más frecuentemente observadas en plantas expuestas a radiación UV-B ya que activa la ruta metabólica de los fenilpropanoides por la cual estos compuestos se sintetizan (Brown *et al.*, 2005; Morales *et al.*, 2013). Se ha demostrado que la radiación UV-B aumenta la actividad de la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL) (Galieni *et al.*, 2015), la flavanona 3-hidroxilasa (F3H), la chalcona sintasa (CHS) y chalcona isomerasa (CHI), entre otras (Brown *et al.*, 2005), que en lechuga la radiación UV-B activa la enzima flavonol sintasa (FLS) (Ebisawa *et al.*, 2008) y que dosis de 15,7 kJ m⁻² son suficientes para activar la ruta y la acumulación de flavonoides (Parihar *et al.*, 2015). En lechugas tipo Lollo Rosso la radiación UV-B induce la acumulación de fenoles, flavonoides y antocianinas totales (Tsormpatsidis *et al.*, 2008).

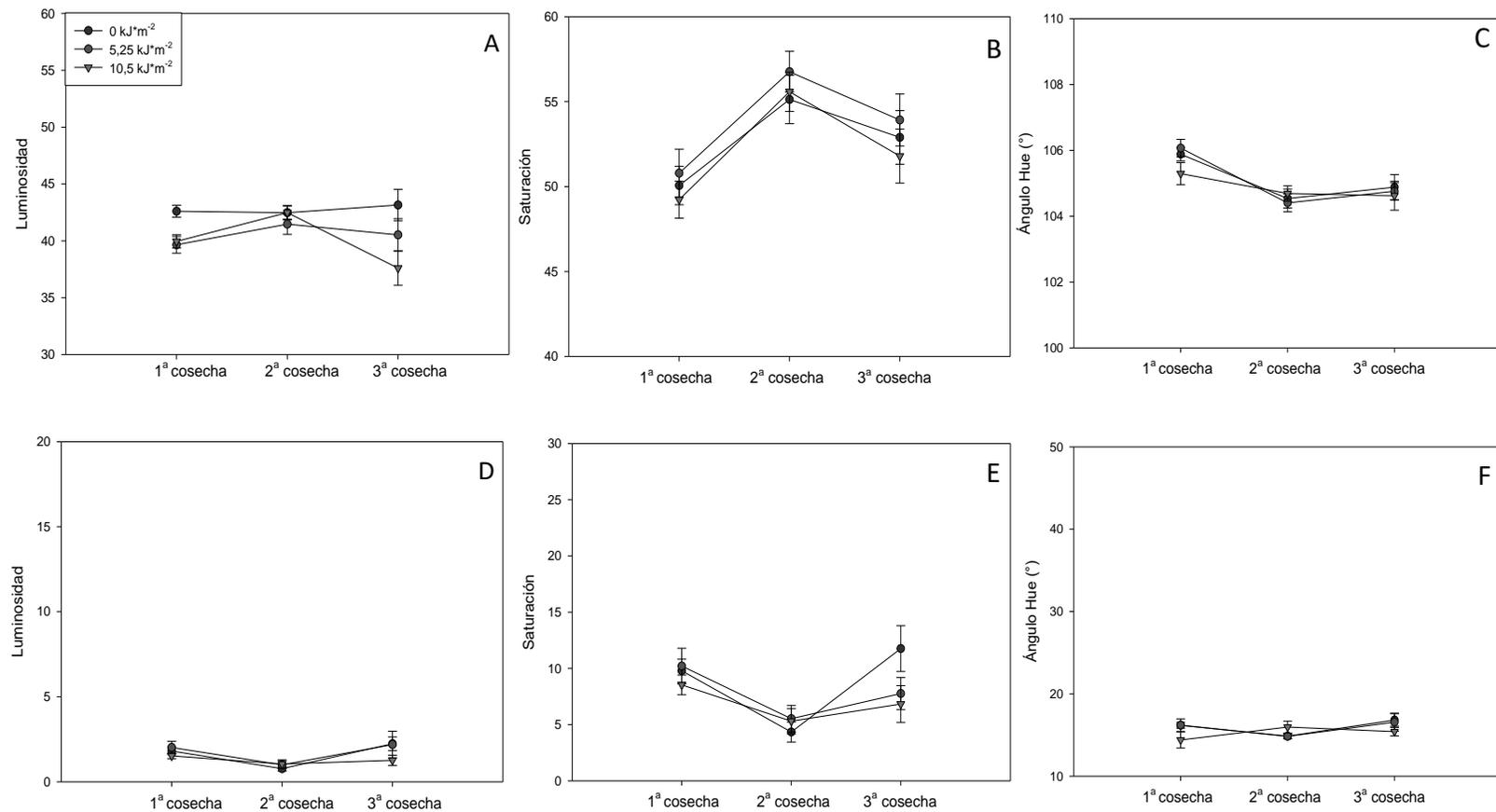


Figura 5.10. Luminosidad, saturación o croma y ángulo hue en lechugas Lollo Bionda 'Levistro' y Lollo Rosso 'Carmolí' durante tres tiempos de cosecha cultivadas con diferentes dosis de radiación UV-B.

Las gráficas muestran los valores medios (\pm EE) de los diferentes parámetros que definen el color: Luminosidad (A, D); Saturación o croma (B, E); y ángulo hue (C, F). De lechugas cv. 'Levistro' (A-C) y cv. 'Carmolí' (D-F) crecidas con la aplicación de diferentes dosis de radiación UV-B y durante varias cosechas sucesivas (1^a, 2^a, 3^a cosecha).

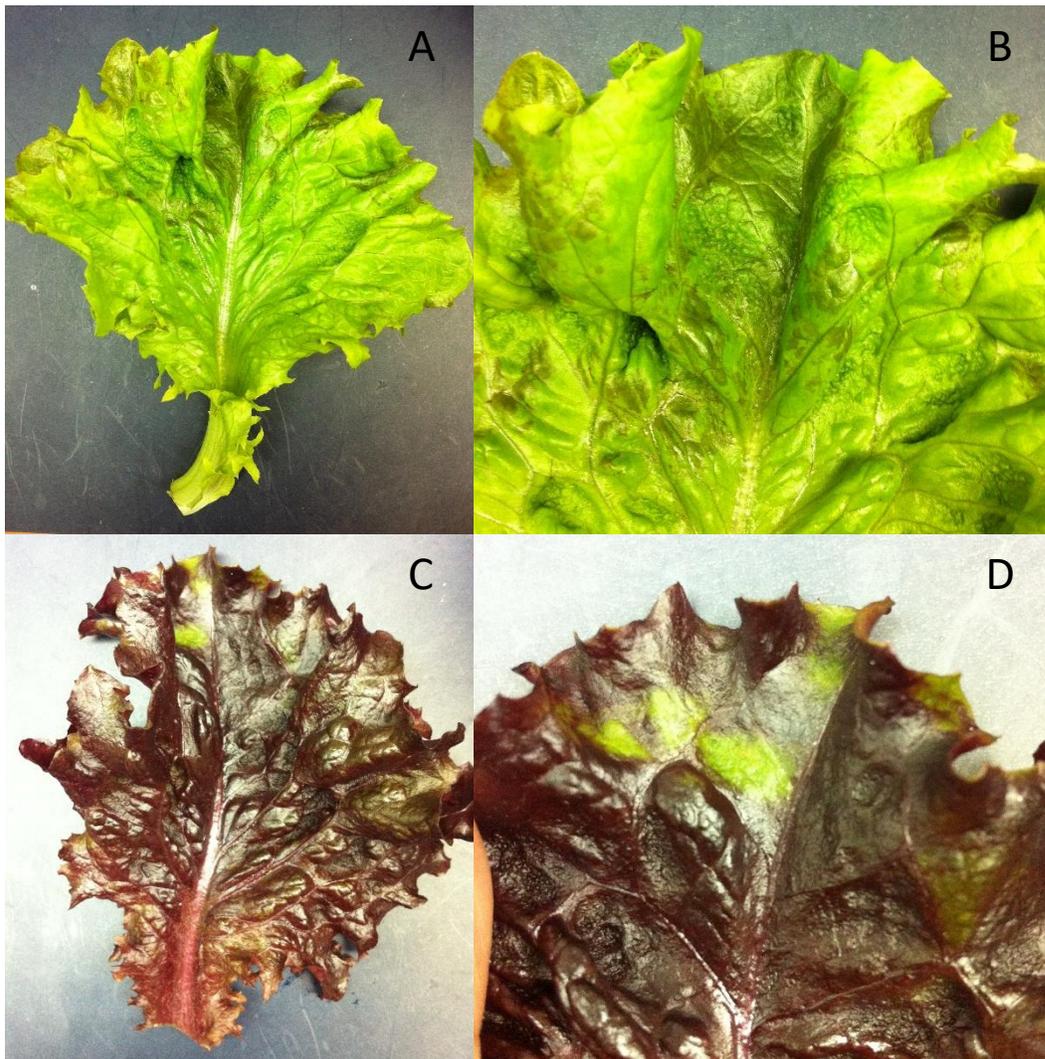


Figura 5.11. Daño visual en hojas de lechuga inducido por la radiación UV-B.

Imagen A: Daño foliar producido por una alta dosis de radiación UV-B en cultivar 'Levistro'; B: Acercamiento al daño foliar en cultivar 'Levistro'. C: Daño foliar producido por una alta dosis de radiación UV-B en cultivar 'Carmolí'. D: Acercamiento al daño foliar en cultivar 'Carmolí' UV-B.

Debido a lo anterior es importante determinar la concentración de fenoles totales (FT), flavonoides y antocianinas totales, como también la capacidad antioxidante (CA) en respuesta a la aplicación de radiación UV-B durante el cultivo de lechugas tipo Lollo Bionda y Lollo Rosso.

En el cultivar 'Levistro' se observó un aumento significativo en la concentración de fenoles totales desde 207,0 hasta 271,9 mg EAG*100 g⁻¹ MF cuando se comparó la tercera cosecha con la primera, lo cual representa un incremento del 31 %, mientras que para el cultivar 'Carmolí' aumentó desde 430,85 hasta 650,73 mg EAG*100 g⁻¹ MF, un incremento del 51 %, entre las mismas cosechas (Tabla 5.2). Cabe destacar que los valores de fenoles totales para el cultivar 'Levistro', entre 190,2 y 298,1 mg EAG*100 g⁻¹ MF, fueron más altos que los reportados por Llorach *et al.* (2008) y Zlotek *et al.* (2014) para lechugas verdes. Estos autores reportaron entre 63,5 y 125,2 mg EAG*100 g⁻¹ MF

para lechugas Romana y Continental y entre 40 y 140 mg EAG*100 g⁻¹ MF para lechuga variedad capitata, respectivamente. Sin embargo, los valores medidos para el cultivar 'Carmolí', entre 407,1 y 675,8 mg EAG*100 g⁻¹ MF, fueron similares a los reportados por Llorach *et al.* (2008) para lechuga Lollo Rosso, de 571,2 mg EAG*100 g⁻¹ MF. Respecto de las dosis de UV-B aplicadas, no hubo un efecto significativo en la concentración de fenoles totales en 'Levistro' ni en 'Carmolí' (Tabla 5.2).

Según Morales *et al.* (2013) la biosíntesis de flavonoides y antocianinas estarían involucradas en la aclimatación a la radiación UV-B, por lo que deben tratarse individualmente. Para el cultivar 'Levistro' hubo una interacción entre el factor tiempo de cosecha y dosis de radiación UV-B para la concentración de flavonoides totales, encontrándose valores significativamente mayores en la tercera cosecha, de las plantas tratadas con 5,2 y 10,5 kJ m⁻² de radiación UV-B, con un valor entre 1071,5 y 1257 mg Rut eq 100g⁻¹ MF (Tabla 5.2) respecto a las otras cosechas con diferentes intensidades de radiación. Esto representa un aumento del 91 % en la concentración de flavonoides totales entre las plantas de la tercera cosecha tratadas con 10,5 kJ m⁻² radiación UV-B versus plantas de la primera cosecha sin aplicación de radiación (0 kJ m⁻²). Cabe destacar que el rango de concentración encontrado para flavonoides totales corresponde a los valores reportados por Zlotek *et al.* (2014) para lechugas verdes, entre 300 y 3.200 mg equivalentes de quercetina 100 g⁻¹ MF.

En lechuga de hoja roja, como las de tipo Lollo Rosso, la radiación UV-B puede inducir la síntesis de antocianinas y otros flavonoides (Tsormpatsidis *et al.*, 2008). Estos autores mostraron un incremento en la concentración de flavonoides cuando las lechugas Lollo Rosso cv. 'Revolution' fueron cultivadas con plásticos transparentes al UV-B. Según los datos expuestos en la Tabla 5.2 la concentración total de flavonoides y de antocianinas del cultivar 'Carmolí' respondieron tanto al tiempo de cosecha como a la dosis de radiación UV-B aplicada, presentando las mayores concentraciones en la tercera cosecha o en presencia de radiación UV-B, independiente de las dosis (Tabla 5.2). Para este cultivar, se observó un aumento del 95 % al comparar los valores de la tercera cosecha (2.214,7 mg eq rutina 100 g⁻¹ MF) con respecto a la primera (1.130,2 mg eq rutina 100 g⁻¹ MF). Por otro lado, la dosis 10,5 kJ m⁻² de radiación UV-B registró 1.737,3 mg eq rutina 100 g⁻¹ MF y sólo generó un aumento del 14 % en la concentración total de flavonoides en comparación con el control (0 kJ m⁻²) donde se registró una concentración de 1.522,2 mg eq rutina 100 g⁻¹ MF. Pese a lo anterior, incluso el valor más bajo registrado en la concentración de flavonoides totales fue superior a los valores de 4 y 280 mg de quercetina 3-glucósido 100 g⁻¹ MF informados para Lollo Rosso por Kim *et al.* (2016), demostrando que el cultivar 'Carmolí' es rico en este tipo de compuestos. Por otro lado, se registró un aumento en la concentración total de antocianinas del 65 % entre la tercera y la primera cosecha donde se registraron concentraciones de 8,6 y 5,2 mg cianidina 3-glucosido 100 g⁻¹ MF, respectivamente. Adicionalmente y, a pesar de que Huché-Thélier *et al.* (2016), describen que la suplementación del cultivo de lechuga con longitudes de onda UV-A, UV-B o luz azul, incrementaron la síntesis y acumulación de antocianinas entre 11 y 800 % respecto a los controles. En este experimento, la suplementación con 5,2 kJ m⁻² de radiación UV-B logró un aumento significativo del 16 % con respecto al control (0 kJ m⁻²). Cabe destacar que los valores encontrados de 5 a 9,5 mg cianidina 3-glucosido 100 g⁻¹ MF fueron similares al rango de 2 a 100 mg cianidina 100 g⁻¹ MF informado por Kim *et al.* (2016) para lechugas Lollo Rosso.

Respecto de la capacidad antioxidante (CA) medida por FRAP, se observó un comportamiento similar al de fenoles totales, presentando diferencias significativas producto del tiempo de cosecha. El mayor valor se obtuvo en la tercera cosecha, alcanzando un valor de 398,8 mg eq Trolox 100 g⁻¹ MF para 'Levistro' y de 1.075,9 mg eq Trolox 100 g⁻¹ MF para 'Carmolí' (Tabla 5.2). Estos valores representan un incremento del 45 % y 20 % cuando fueron comparados con los valores registrados para los cultivares 'Levistro' y 'Carmolí' en la primera cosecha de 273,6 y 891,9 mg eq Trolox 100 g⁻¹ MF, respectivamente. Además, el tiempo de cosecha influyó en la CA medida por DPPH para ambos cultivares. Durante la tercera cosecha se registraron incrementos

significativos del 39 % y 44 % respecto a la primera para 'Levistro' y 'Carmolí', respectivamente (Tabla 5.2). A su vez, para este parámetro, la radiación UV-B solo influyó en el cultivar 'Carmolí', mostrando un comportamiento similar a la concentración de antocianinas totales y registrando las mayores concentraciones, 373,58 mg eq Trolox 100 g⁻¹ MF, bajo 10,5 kJ m⁻² de radiación UV-B, lo cual constituye un aumento del 17 % respecto del control (0 kJ m⁻²) donde se registraron 318,3 mg eq Trolox 100 g⁻¹ MF.

La relación entre la capacidad antioxidante y la concentración de antocianinas totales presente en el cultivar 'Carmolí', podría deberse a la fuerte actividad antioxidante de las antocianinas (Llorach *et al.*, 2008). Según Caldwell (2003), la cianidina 3-malonilglucósido, es una antocianina presente en la lechuga roja con alta capacidad antioxidante representa alrededor del 15 % de la actividad antioxidante total en el extracto, pudiendo ser el compuesto responsable de este comportamiento.

5.2.3.2.4.- Concentración de prolina total

La prolina es un aminoácido que actúa como osmoprotector, quelante de metales, inhibidor de la peroxidación de la membrana lipídica y eliminador de especies reactivas de oxígeno (EROs) (Aksakal *et al.*, 2016). Este aminoácido se acumula cuando la planta necesita un ajuste osmótico y juega un papel importante en condiciones de estrés (Munns y Tester, 2008; Bandurska *et al.*, 2013; Lucini y Bernardo, 2015). Bandurska *et al.* (2013) describieron que la acumulación de osmolitos como la prolina también interviene en la respuesta de la planta frente a la radiación UV-B. Adicionalmente, Aksakal *et al.* (2016) mostraron que la adición de prolina exógena afectó la acumulación de hormonas endógenas en lechuga y mejorando su adaptación al estrés producido por la radiación UV-B. A pesar de esto, para 'Levistro' y 'Carmolí', la concentración de prolina registrada bajo los tratamientos de 5,2 y 10,5 kJ m⁻² no presentaron diferencias significativas respecto al control (0 kJ m⁻²). Por otro lado, en ambos cultivares una reducción significativa en la acumulación de prolina debido al tiempo de cosecha, indicando una mayor concentración de este compuesto en estadios tempranos de desarrollo (Tabla 5.3).

Para el cultivar 'Levistro' la concentración de prolina en la primera cosecha fue de 52,6 µg 100 g⁻¹ MF, mientras que en la tercera cosecha fue de 16,0 µg 100 g⁻¹ MF, representando un tercio del valor inicial. Por otro lado, en la primera cosecha el cultivar 'Carmolí' registró una concentración de 14,8 µg 100 g⁻¹ MF que disminuyó a la mitad en las cosechas siguientes alcanzando valores de 7,0 y 7,6 µg 100 g⁻¹ MF para la tercera y segunda cosecha, respectivamente (Tabla 5.3).

En un estudio realizado en arvejas por Zdunek-Zastocka *et al.* (2021) mostraron que la mayor concentración de prolina se registró en las hojas más jóvenes e inmaduras, mientras que las hojas más antiguas y bien desarrolladas presentaron una menor concentración de prolina. Estos autores mostraron que la mayor concentración de prolina encontrada en las hojas más jóvenes coincidió con un mayor registro en la transcripción de dos genes (PsP5CS1 y PsP5CS2) que codifican para la proteína D1-pirrolina-5-carboxilato sintetasa, enzima involucrada en la síntesis de prolina. En contraste con la expresión de los genes PsP5CS1 y 2, el nivel de ARNm del gen PsPDH1, un gen que codifica para la enzima la prolina deshidrogenasa, involucrada en la degradación de prolina, fue menor en las hojas jóvenes que en las hojas adultas. Esta mayor síntesis y menor degradación de prolina en las hojas jóvenes explicaría la mayor concentración de prolina reportada en la primera cosecha.

Tabla 5.2. Concentración de fenoles, flavonoides, antocianinas totales y capacidad antioxidante para lechugas Lollo Bionda cv. ‘Levistro’ y Lollo Rosso cv. ‘Carmoli’ luego de la aplicación de diferentes dosis de radiación UV-B durante tres cosechas sucesivas.

| Factor | Nivel | Fenoles | | Flavonoides | | | | Antocianinas | | Capacidad antioxidante | | | | | | | | | |
|-----------------------|-------------------------|-------------------------------|-------|----------------------------------|-------|--|-------|-------------------------------------|-------|-------------------------------------|-------|--------------------|-------|---------------------|-------|--------------------|-------|--------------------|------|
| | | ‘Levistro’ | | ‘Carmoli’ | | ‘Levistro’ | | ‘Carmoli’ | | FRAP | | DPPH | | | | | | | |
| | | mg EAG 100 g ⁻¹ MF | | mg eq Rut 100 g ⁻¹ MF | | mg eq Cian3gluc 100 g ⁻¹ MF | | mg eq Trolox 100 g ⁻¹ MF | | mg eq Trolox 100 g ⁻¹ MF | | | | | | | | | |
| | Media | EE | Media | EE | Media | EE | Media | EE | Media | EE | Media | EE | Media | EE | Media | EE | Media | EE | |
| Tiempo de cosecha (1) | 1 ^a | 207,0 ^b | 16,2 | 430,8 ^c | 22,7 | 692,2 | 68,5 | 1130,2 ^c | 71,7 | 5,2 ^c | 0,2 | 273,6 ^b | 26,6 | 891,9 ^b | 90,0 | 239,0 ^b | 21,9 | 289,2 ^c | 17,4 |
| | 2 ^a | 222,7 ^b | 2,3 | 505,7 ^b | 6,1 | 813,0 | 14,8 | 1595,8 ^b | 24,5 | 7,4 ^b | 0,1 | 305,1 ^b | 8,0 | 782,9 ^b | 14,5 | 267,6 ^b | 3,5 | 334,8 ^b | 14,5 |
| | 3 ^a | 271,9 ^a | 5,9 | 650,7 ^a | 14,4 | 1069,7 | 43,7 | 2214,7 ^a | 59,4 | 8,6 ^a | 0,0 | 398,8 ^a | 12,2 | 1075,1 ^a | 25,2 | 333,7 ^a | 9,9 | 419,7 ^a | 11,5 |
| Dosis UV-B (2) | 0 kJ m ⁻² | 218,0 | 12,1 | 500,7 | 24,6 | 776,9 | 51,4 | 1522,2 ^b | 97,2 | 6,6 ^b | 0,2 | 310,9 | 21,8 | 893,3 | 68,9 | 256,4 | 16,6 | 318,3 ^b | 17,0 |
| | 5,2 kJ m ⁻² | 247,4 | 11,3 | 537,4 | 22,3 | 906,1 | 50,3 | 1681,2 ^a | 102,6 | 7,6 ^a | 0,2 | 342,4 | 18,1 | 929,2 | 55,7 | 300,1 | 16,0 | 351,8 ^a | 14,8 |
| | 10,5 kJ m ⁻² | 236,3 | 10,0 | 549,3 | 23,8 | 891,9 | 64,3 | 1737,3 ^a | 105,4 | 7,1 ^{ab} | 0,2 | 324,3 | 20,6 | 927,4 | 52,5 | 283,9 | 14,4 | 373,6 ^a | 15,6 |
| (1 x 2) | 1 ^a x 0 | 198,2 | 35,9 | 407,1 | 52,0 | 657,9 ^{de} | 146,1 | 994,0 | 141,7 | 5,0 | 0,5 | 262,0 | 59,5 | 873,0 | 197,8 | 224,0 | 48,0 | 257,3 | 38,0 |
| | 2 ^a x 0 | 219,4 | 5,1 | 484,6 | 3,5 | 792,3 ^{cde} | 24,1 | 1560,7 | 27,5 | 6,8 | 0,0 | 316,2 | 13,3 | 757,6 | 17,2 | 267,3 | 5,4 | 314,4 | 7,9 |
| | 3 ^a x 0 | 236,4 | 5,3 | 610,4 | 23,8 | 880,5 ^{bc} | 25,2 | 2012,1 | 79,5 | 7,8 | 0,2 | 354,5 | 19,6 | 1049,4 | 38,0 | 277,8 | 11,6 | 383,3 | 16,9 |
| | 1 ^a x 5,2 | 232,8 | 31,4 | 430,8 | 24,6 | 805,6 ^{cde} | 136,0 | 1142,2 | 94,4 | 5,4 | 0,2 | 314,6 | 48,9 | 904,6 | 152,1 | 270,5 | 43,2 | 285,0 | 18,1 |
| | 2 ^a x 5,2 | 228,1 | 4,0 | 515,2 | 13,8 | 841,1 ^{cd} | 27,4 | 1615,4 | 65,7 | 8,0 | 0,1 | 315,4 | 7,1 | 805,3 | 32,0 | 279,3 | 7,0 | 340,0 | 12,4 |
| | 3 ^a x 5,2 | 281,2 | 4,9 | 666,0 | 22,7 | 1071,5 ^{ab} | 13,6 | 2285,8 | 80,0 | 9,5 | 0,1 | 397,1 | 13,9 | 1077,6 | 36,7 | 350,5 | 9,4 | 431,0 | 17,2 |
| | 1 ^a x 10,5 | 190,2 | 12,8 | 454,7 | 39,5 | 613,0 ^e | 57,9 | 1254,3 | 128,2 | 5,3 | 0,4 | 244,3 | 25,4 | 898,2 | 129,4 | 222,6 | 18,4 | 325,4 | 29,9 |
| | 2 ^a x 10,5 | 220,5 | 2,1 | 517,3 | 8,9 | 805,6 ^{cde} | 25,4 | 1611,2 | 23,8 | 7,4 | 0,1 | 283,7 | 17,5 | 785,8 | 24,1 | 256,4 | 3,0 | 350,5 | 6,2 |
| | 3 ^a x 10,5 | 298,1 | 5,6 | 675,8 | 24,8 | 1257,0 ^a | 94,7 | 2346,2 | 117,2 | 8,5 | 0,2 | 444,9 | 19,2 | 1098,2 | 57,0 | 372,7 | 11,1 | 444,8 | 21,2 |
| valor p (1) | *** | | *** | | *** | | *** | | *** | | *** | | *** | | ** | | *** | | *** |
| valor p (2) | ns | | ns | | ns | | * | | * | | ns | | ns | | ns | | ns | | ** |
| valor p (1 x 2) | ns | | ns | | * | | ns | | ns | | ns | | ns | | ns | | ns | | ns |

Dosis de radiación UV-B: 0 kJ m⁻² (control); 5,2 kJ m⁻²; 10,5 kJ m⁻². Tiempo de cosecha: primera (1^a); segunda (2^a); tercera (3^a). FRAP: Ferric reducing antioxidant power, DPPH: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, EAG: equivalentes de ácido gálico; Eq Rut: equivalentes de rutina; Eq Cian3gluc: equivalentes de cianidina 3 glucósido; eq Trolox: equivalentes de Trolox; MF: masa fresca. Los valores representan medias de 27 datos para la cosecha y dosis acumulada de radiación UV-B y de nueve mediciones para la interacción (1 x 2). ^{a,b,c,d,e} Letras diferentes corresponden a diferencias significativas determinadas por la prueba de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher con un nivel de significancia de $p < 0,05$. ns: no significativo; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$.

Tabla 5.3. Concentración de prolina para lechugas Lollo Bionda cv. 'Levistro' y Lollo Rosso cv. 'Carmolí' luego de la aplicación de diferentes dosis de radiación UV-B durante tres cosechas sucesivas.

| Factor | Nivel | Prolina | | | |
|-------------------------------------|-------------------------|-------------------|-----|-------------------|-----|
| | | 'Levistro' | | 'Carmolí' | |
| -----µg 100 g ⁻¹ FM----- | | | | | |
| | | Media | EE | Media | EE |
| Tiempo de cosecha (1) | 1 ^a | 52,6 ^a | 2,9 | 14,8 ^a | 1,8 |
| | 2 ^a | 13,5 ^b | 1,8 | 7,6 ^b | 0,9 |
| | 3 ^a | 16,0 ^b | 1,4 | 7,0 ^b | 0,5 |
| Dosis UV-B (2) | 0 kJ m ⁻² | 26,2 | 6,2 | 10,0 | 1,5 |
| | 5,2 kJ m ⁻² | 28,9 | 6,5 | 10,5 | 1,8 |
| | 10,5 kJ m ⁻² | 27,0 | 7,2 | 9,0 | 1,8 |
| valor <i>p</i> (1) | | *** | | *** | |
| valor <i>p</i> (2) | | ns | | ns | |
| valor <i>p</i> (1 x 2) | | ns | | ns | |

Dosis de radiación UV-B: 0 kJ m⁻² (control); 5,2 0 kJ m⁻² y 10,5 0 kJ m⁻². Tiempo de cosecha: primera (1^a); segunda (2^a); tercera (3^a). MF: masa fresca. Los valores representan medias de 27 datos para la cosecha y dosis acumulada de radiación UV-B. ^{a,b} Letras diferentes corresponden a diferencias significativas determinadas por la prueba de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher con un nivel de significancia de $p < 0,05$. ns: no significante; ***: $p < 0,001$.

5.2.3.2.5.- Densidad estomática y celular y espacio intercelular

La radiación UV-B modifica la morfología de las plantas aumentando el grosor de las hojas, promoviendo la ramificación axilar, reduciendo la longitud del hipocótilo, disminuyendo el área foliar y disminuyendo las frecuencias estomáticas (Hollosoy *et al.*, 2002; Aksakal, *et al.*, 2016). De acuerdo con Hollosy *et al.* (2002) el aumento en el grosor de las hojas se ha interpretado como un mecanismo protector contra la radiación UV-B. Sin embargo, en plantas como maíz (*Zea mays*) se ha observado el efecto contrario donde el grosor de la hoja disminuye como resultado al colapso del tejido foliar de la epidermis y por la disminución en el contenido de agua causado por la radiación UV-B. Por otro lado, Zlatev *et al.* (2012) comentan que cambios morfológicos producidos por la radiación UV-B podrían ser interpretados como efectos perjudiciales causados por procesos foto-destructivos o como respuestas foto-morfogénicas mediadas por fotorreceptores. Estos mismos autores mencionan que en respuesta a la exposición a la radiación UV-B se observa un aumento en la densidad estomática, lo cual incrementa la conductancia estomática y por tanto la pérdida de agua. Así, en el cultivar 'Levistro' la densidad estomática presentó una interacción entre el tiempo de cosecha y la radiación UV-B, mostrando el valor más alto, de 67,1 estomas mm⁻², en la tercera cosecha bajo radiación UV-B, independiente de la dosis (Tabla 5.4).

Por otro lado, el cultivar 'Carmolí' mostró un aumento significativo en la densidad estomática del 22 % a 5,2 kJ m⁻² respecto a 0 kJ m⁻², donde se registraron valores de 63,0 y 51,4 estomas mm⁻², respectivamente y un aumento del 26 % con respecto a 10,5 kJ m⁻² donde se registró un valor de 49,7%.

Por su parte, tanto el tiempo de cosecha como el tratamiento con radiación UV-B tuvieron un efecto significativo sobre la densidad celular en los dos cultivares estudiados (Tabla 5.4). El cultivar 'Levistro' registró 682 células mm⁻² en la tercera cosecha, lo que representa un incremento del 57% respecto de la primera. Por su parte, el cultivar 'Carmolí' registró un valor significativamente mayor en la segunda cosecha, alcanzando 923 células mm⁻², un incremento del 29% con respecto a

la primera cosecha. Jiang *et al.* (2011) y Zlatev *et al.* (2012) señalan, que la radiación UV-B modifica tanto la tasa y como la duración de la división y alargamiento celular como un mecanismo de protección que evita que las células con daño en su ADN puedan dividirse, explicando así la inhibición del crecimiento. Jiang *et al.* (2011) mostraron que este efecto se debe a una baja en la expresión de los genes de las histonas *H4* y *E2Fa*, marcadores de transición de las fases de crecimiento (G1) a la de síntesis (S) del ciclo celular, cuando los niveles de radiación superan los $0,45 \text{ J s}^{-1} \text{ m}^{-2}$. Si bien la división celular es retrasada, ambos cultivares presentaron el mayor número de células por superficie a $10,5 \text{ kJ m}^{-2}$, registrando 637 y 917 células mm^{-2} para el cultivar 'Levistro' y 'Carmolí' respectivamente (Tabla 5.4). Estos valores representarían un incremento del 21 y 32 % entre $10,5 \text{ kJ m}^{-2}$ y el control para 'Levistro' y 'Carmolí', respectivamente. Debido a que la expansión celular es impulsada por la presión de turgencia, este incremento en el recuento celular podría estar relacionado con la presencia de células más pequeñas debido a la baja eficiencia en el uso del agua y el incremento en la tasa de respiración de las plantas expuestas a la radiación UV-B (Staxén y Bornman, 1994).

Paralelamente, se observaron manchas de color marrón en las hojas del cultivar 'Levistro' (Figura 5.11 A, B) y de color verde en las hojas de 'Carmolí' (Figura 5.11 C, D) a dosis de $10,5 \text{ kJ m}^{-2}$ de radiación UV-B, posiblemente debido a un exceso de radiación UV-B (Kakani *et al.*, 2003).

Respecto al índice estomático, 'Levistro' disminuyó significativamente su valor después de la primera cosecha y no varió frente a la radiación UV-B estudiada (Tabla 5.4). Por el contrario, el índice estomático de 'Carmolí' respondió tanto al tiempo de cosecha como a la radiación UV-B, alcanzando el menor valor en la segunda cosecha, con un índice de 5,3, lo que representa una disminución del 34 % respecto a la primera cosecha. Por otro lado, a $10,5 \text{ kJ m}^{-2}$ de radiación UV-B, se registró un índice de 5,4 que representa una reducción del 23 % respecto al control (0 kJ m^{-2}) (Tabla 5.4). Estos resultados coinciden con los reportados por Staxén y Bornman (1994), quienes observaron una reducción significativa en el índice estomático en *Petunia hybrid* respecto al control cuando las plantas fueron cultivadas con suplementación de radiación UV-B a una intensidad de $3,0 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

Después de la aplicación de los tratamientos con radiación UV-B, no se observaron cambios visuales en la evaluación histológica del tejido foliar. El espacio intercelular (ein), el tejido parenquimático empalizado (pe) y esponjoso (pes) no mostraron cambios aparentes para el cultivar 'Levistro' (Figura 5.12) ni 'Carmolí' (Figura 5.13). Sin embargo, al cuantificar el porcentaje de espacio intercelular del tejido foliar a través del procesamiento de imágenes, se encontró que, existe una interacción entre el cultivar y el tratamiento de radiación UV-B (Tabla 5.5). El cultivar 'Levistro' registró el porcentaje intercelular más alto de 37,1 % a $10,5 \text{ kJ m}^{-2}$ mientras que 'Carmolí' registró el porcentaje más bajo de 8,2 % a la misma dosis de radiación (Tabla 5.5).

Los compuestos fenólicos de tipo flavonoide, incluidas las antocianinas, protegen a las células del daño causado por la radiación UV-B (Aksakal *et al.*, 2016), lo cual podría explicar las diferencias en distribución celular observada en ambos cultivares.

5.2.4.- Conclusiones

Las prácticas culturales, como las cosechas sucesivas y la suplementación con UV-B, mostraron tener un impacto significativo en la masa fresca y seca de las hojas de lechuga, específicamente para los cultivares 'Levistro' y 'Carmolí'. Estas prácticas también juegan un papel crucial en la acumulación de compuestos fenólicos totales, flavonoides totales y capacidad antioxidante. La concentración total de flavonoides en el cultivar 'Levistro' aumentó significativamente en respuesta a una estrategia combinada del uso de radiación UV-B y corte hecho por las cosechas sucesivas, mientras que para 'Carmolí' cada estrategia por separado fue capaz de incrementar la concentración de compuestos antioxidantes. Al implementar estas estrategias, es

posible cultivar variedades específicas de lechuga con concentraciones elevadas de compuestos fenólicos, lo que ofrecería una vía prometedora para obtener hortalizas de hojas ricas en antioxidantes. Además, según la etapa de desarrollo de la hoja, correspondientes a los diferentes tiempos de cosechas (primera cosecha: hojas 5ª y 6ª; segunda cosecha: hojas 7ª y 8ª; tercera cosecha: hojas 9ª y 10ª), se observaron variaciones significativas en la acumulación de compuestos fenólicos, flavonoides y antocianinas totales en el cultivar 'Carmolí', lo que muestra su gran potencial en la acumulación de compuestos antioxidantes. Asimismo, vale la pena señalar que diferentes cultivares de lechuga, como 'Levistro' y 'Carmolí', exhiben distintas estrategias anatómicas de distribución de células en respuesta al estrés UV-B. El cultivar 'Levistro' mostró un aumento en el espacio intercelular, mientras que 'Carmolí' redujo el espacio intercelular. Para cultivar hortalizas con características que promueven la salud, sería esencial implementar estrategias de agricultura controlada que consideren la variabilidad en la respuesta entre diferentes cultivares al mismo estímulo, particularmente cuando se emplean variedades de diferente color. Este reconocimiento de la variabilidad permitirá enfoques de cultivo personalizados que optimicen las características deseadas para cada cultivar.

*Este ensayo dio origen al artículo científico titulado "Changes in Agronomic, Antioxidant Compounds, and Morphology Parameters of Green and Red Lettuces (*Lactuca sativa* L.) by Successive Harvests and UV-B Supplementation" publicado en junio de 2023 por los autores Mónica Flores, Asunción Amorós y Víctor Hugo Escalona, en la revista Horticulturae de MDPI (<https://doi.org/10.3390/horticulturae9060677>).

Tabla 5.4. Densidad estomática, densidad celular e índice estomático para lechugas Lollo Bionda cv. ‘Levistro’ y Lollo Rosso cv. ‘Carmolí’ luego de la aplicación de diferentes dosis de radiación UV-B durante tres cosechas sucesivas.

| Factor | Nivel | Densidad estomática | | | | Densidad celular | | | | Índice estomático | | | |
|-----------------------|-------------------------|----------------------------------|------|-------------------|------|-----------------------------------|------|--------------------|-------|-------------------|-----|------------------|-----|
| | | ‘Levistro’ | | ‘Carmolí’ | | ‘Levistro’ | | ‘Carmolí’ | | ‘Levistro’ | | ‘Carmolí’ | |
| | | --- Estomas mm ⁻² --- | | | | ----Células mm ⁻² ---- | | | | | | | |
| | | Media | EE | Media | EE | Media | EE | Media | EE | Media | EE | Media | EE |
| Tiempo de cosecha (1) | 1 ^a | 44,8 | 2,3 | 58,0 | 3,0 | 432,7 ^c | 8,7 | 715,4 ^b | 53,7 | 9,4 ^a | 0,4 | 8,0 ^a | 0,5 |
| | 2 ^a | 45,6 | 3,1 | 51,4 | 4,4 | 546,3 ^b | 27,4 | 923,4 ^a | 33,0 | 7,8 ^b | 0,4 | 5,3 ^b | 0,5 |
| | 3 ^a | 59,7 | 5,0 | 54,7 | 4,4 | 682,2 ^a | 38,6 | 719,5 ^b | 36,5 | 8,1 ^b | 0,5 | 7,2 ^a | 0,5 |
| Dosis UV-B (2) | 0 kJ m ⁻² | 43,9 | 3,1 | 51,4 ^b | 3,7 | 527,2 ^b | 27,9 | 695,5 ^b | 34,0 | 7,8 | 0,4 | 7,1 ^a | 0,6 |
| | 5,2 kJ m ⁻² | 50,6 | 4,5 | 63,0 ^a | 4,2 | 497,4 ^b | 30,9 | 746,0 ^b | 40,2 | 9,2 | 0,5 | 8,0 ^a | 0,5 |
| | 10,5 kJ m ⁻² | 55,5 | 3,7 | 49,7 ^b | 3,5 | 636,6 ^a | 40,0 | 916,8 ^a | 51,1 | 8,2 | 0,5 | 5,4 ^b | 0,5 |
| (1 x 2) | 1 ^a x 0 | 44,8 ^{bc} | 5,2 | 59,7 | 6,4 | 455,1 | 14,4 | 567,0 | 38,3 | 8,9 | 0,8 | 9,5 | 0,7 |
| | 2 ^a x 0 | 42,3 ^{bc} | 3,5 | 44,8 | 6,4 | 489,9 | 13,9 | 850,5 | 37,7 | 7,9 | 0,6 | 4,9 | 0,6 |
| | 3 ^a x 0 | 44,8 ^{bc} | 7,5 | 49,7 | 5,9 | 636,6 | 65,4 | 669,0 | 42,1 | 6,6 | 0,8 | 6,9 | 0,7 |
| | 1 ^a x 5,2 | 47,2 ^{bc} | 3,2 | 59,7 | 3,2 | 397,9 | 12,8 | 666,5 | 35,4 | 10,6 | 0,6 | 8,4 | 0,7 |
| | 2 ^a x 5,2 | 37,3 ^c | 2,5 | 64,7 | 7,3 | 457,6 | 28,9 | 937,5 | 52,6 | 7,6 | 0,2 | 6,6 | 0,8 |
| | 3 ^a x 5,2 | 67,1 ^a | 10,4 | 64,7 | 10,6 | 636,6 | 58,6 | 634,1 | 53,4 | 9,3 | 1,0 | 9,0 | 1,0 |
| | 1 ^a x 10,5 | 42,3 ^{bc} | 3,5 | 54,7 | 5,9 | 445,1 | 8,4 | 912,7 | 124,8 | 8,7 | 0,7 | 6,2 | 1,0 |
| | 2 ^a x 10,5 | 57,2 ^{ab} | 6,3 | 44,8 | 7,6 | 691,3 | 33,3 | 982,3 | 72,3 | 7,9 | 1,2 | 4,5 | 0,7 |
| | 3 ^a x 10,5 | 67,1 ^a | 5,9 | 49,8 | 4,5 | 773,4 | 71,7 | 855,4 | 63,0 | 8,2 | 0,7 | 5,6 | 0,6 |
| valor p (1) | | ** | | ns | | *** | | *** | | * | | *** | |
| valor p (2) | | ns | | * | | *** | | *** | | ns | | *** | |
| valor p (1 x 2) | | * | | ns | | ns | | ns | | ns | | ns | |

Dosis de radiación UV-B: 0 kJ m⁻² (control); 5,2 kJ m⁻² y 10,5 kJ m⁻². Tiempo de cosecha: primera (1^a); segunda (2^a); tercera (3^a). MF: masa fresca. Los valores representan medias de 15 datos para la cosecha y dosis acumulada de radiación UV-B, mientras que para la interacción (1 x 2) la media fue calculada usando 5 repeticiones biológicas. El análisis de 7 imágenes contribuyó a la obtención del dato de cada réplica biológica. ^{a,b,c} Letras diferentes corresponden a diferencias significativas determinadas por la prueba de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher con un nivel de significancia de $p < 0,05$. ns: no significante; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$.

Tabla 5.5. Espacio intercelular de lechugas Lollo Bionda cv. ‘Levistro’ y Lollo Rosso cv. ‘Carmolí’ luego de la aplicación de diferentes dosis de radiación UV-B.

| Factor | Nivel | Espacio intercelular | | | |
|----------------|-------------------------|------------------------------|-----|-------------------|-----|
| | | ‘Levistro’ | | ‘Carmolí’ | |
| | | % área con respecto al total | | | |
| | | Media | EE | Media | EE |
| Dosis UV-B | 0 kJ m ⁻² | 24,0 ^b | 1,1 | 17,2 ^c | 1,1 |
| | 5,2 kJ m ⁻² | 19,6 ^c | 0,9 | 16,2 ^c | 0,9 |
| | 10,5 kJ m ⁻² | 36,6 ^a | 3,8 | 8,2 ^d | 0,6 |
| valor <i>p</i> | | *** | | | |

Dosis de radiación UV-B: 0 kJ m⁻² (control); 5,2 kJ m⁻² y 10,5 kJ m⁻². Los valores corresponden a medias del procesamiento de datos de 108 imágenes para cada cultivar. ^{a,b,c} Letras diferentes corresponden a diferencias significativas determinadas por la prueba de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher con un nivel de significancia de $p < 0,05$. ***: $p < 0,001$.

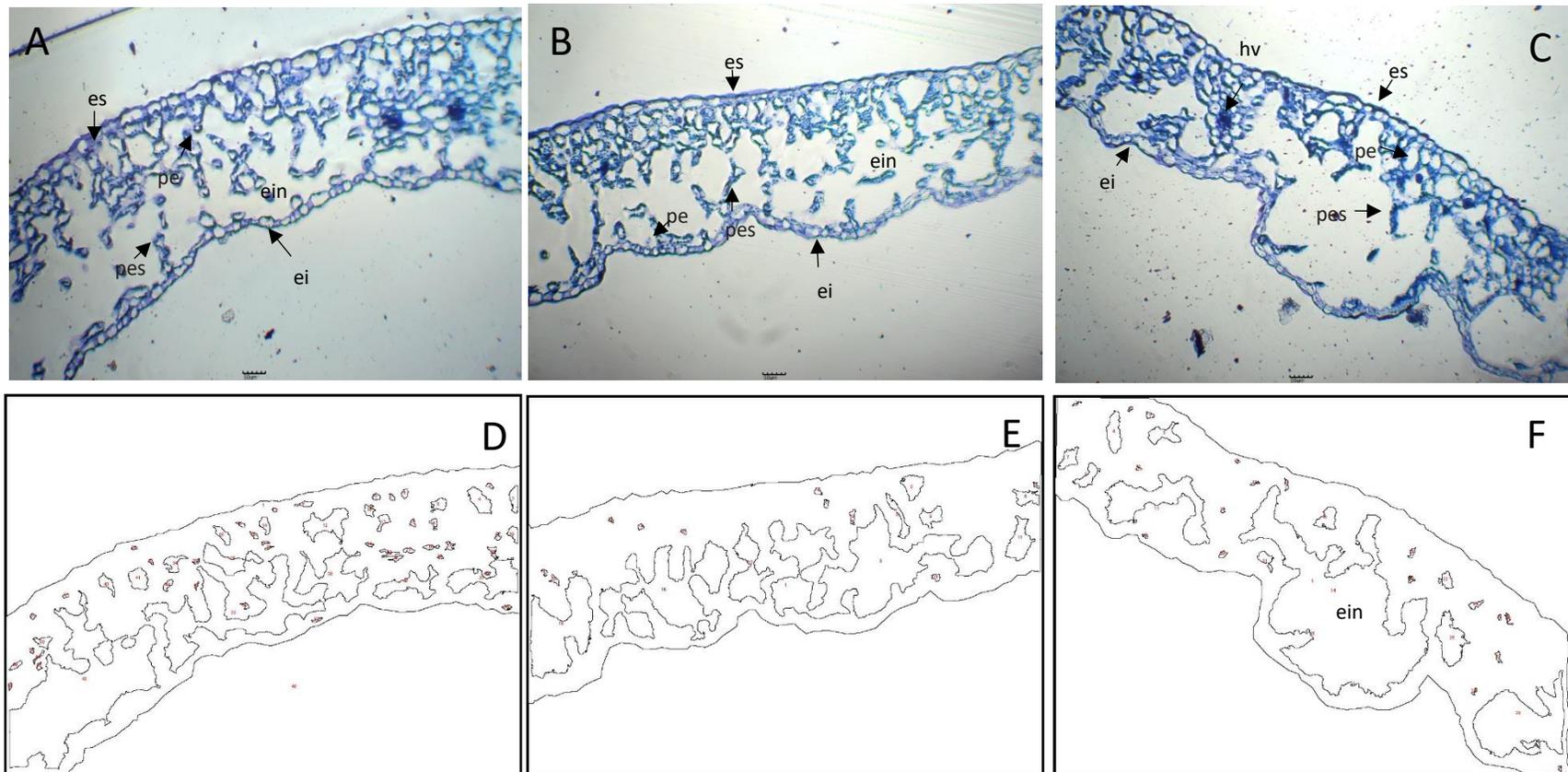


Figura 5.12. Imágenes del corte transversal del tejido foliar de hojas lechuga Lollo Bionda cv. 'Levistro' cultivadas con diferentes dosis de radiación UV-B.

Dosis de radiación UV-B: 0 kJ m^{-2} (A), 5.2 kJ m^{-2} (B) y 10.5 kJ m^{-2} (C). Imágenes capturadas por un microscopio óptico con un objetivo de 100X. (D-F) corresponden a imágenes procesadas por el software ImageJ para A-C donde se destacan los espacios intercelulares del tejido foliar. es: epidermis superior; ei: epidermis inferior; pe: parénquima empalizado; pes: parénquima esponjoso, ein: espacio intercelular; hv: haz vascular.

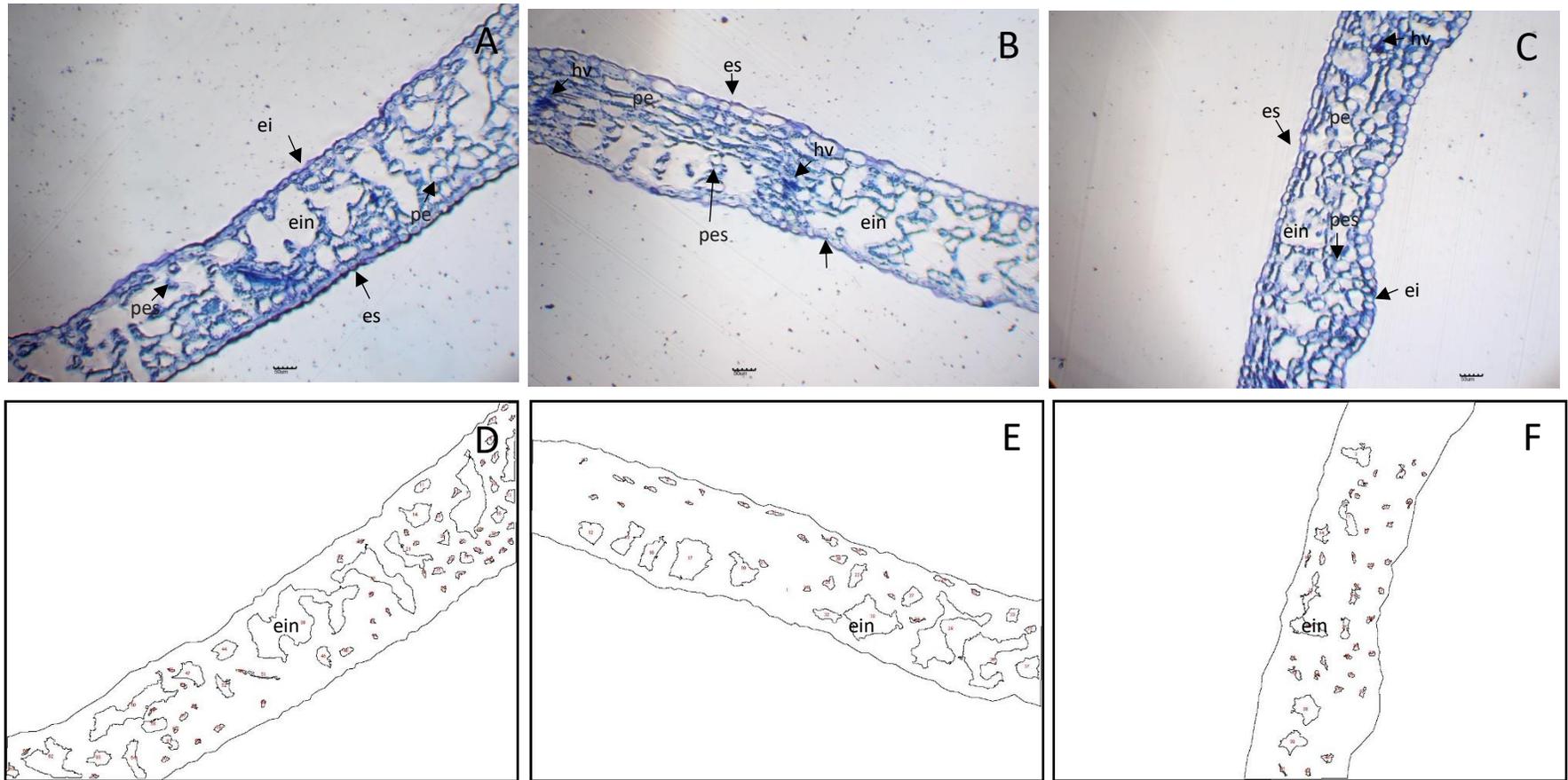


Figura 5.13. Imágenes del corte transversal del tejido foliar de hojas lechuga Lollo Rosso cv. 'Carmoli' cultivadas con diferentes dosis de radiación UV-B.

Dosis de radiación UV-B: 0 kJ m^{-2} (A), 5.2 kJ m^{-2} (B) y 10.5 kJ m^{-2} (C) de radiación UV-B. Imágenes capturadas por un microscopio óptico con un objetivo de 100X. (D-F) corresponden a imágenes procesadas por el software ImageJ para A-C donde se destacan los espacios intercelulares del tejido foliar. es: epidermis superior; ei: epidermis inferior; pe: parénquima empalizado; pes: parénquima esponjoso, ein: espacio intercelular; hv: haz vascular.

5.2.5.- Bibliografía

Ainsworth, E.A., Gillespie, K. M., 2007. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent. *Nat. Protoc.* 2, 875- 877. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.102>

Aksakal, O., Tabay, D., Esringu, A., Icoğlu Aksakal, F., Esim, N. 2016. Effect of Proline on Biochemical and Molecular Mechanism in Lettuce (*Lactuca sativa* L.) Exposed to UV-B radiation. *Photochem. Photobiol. Sci.* 16, 246–254. <https://doi.org/10.1039/C6PP00412A>

Bandurska, H., Niedziela, J., Chadzinikolau., T. 2013. Separate and combined responses to water deficit and UV-B radiation. *Plant Sci.* 213, 98-105. <http://dx.doi.org/10.1016/j.plantsci.2013.09.003>

Bates, L., Waldren, R., and Teare, I. 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant Soil* 39, 205-207. <https://doi.org/10.1007/BF00018060>

Benzie, I.F. and Strain, J.J., 1996. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of 'Antioxidant Power': The FRAP Assay. *Anal. Biochem.* 239, 70–76. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>

Bi, J.L. and Felton, G.W. 1995. Foliar oxidative stress and insect herbivory: primary compounds, secondary metabolites, and reactive oxygen species as components of induced resistance. *J. Chem. Ecol.* 21, 1511-30. <https://doi.org/10.1007/BF02035149>

Brown, B.A., Cloix, C., Jiang, G.H., Kaiserli, E., Herzyk, P., Kliebenstein, D.J.; Jenkins, G.I. 2005. A UV-B-specific signaling component orchestrates plant UV protection. *PNAS.* 102, 18225–18230. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0507187102

Caldwell, C. 2003. Alkylperoxyl Radical Scavenging Activity of Red Leaf Lettuce (*Lactuca sativa* L.) Phenolics. *J. Agric. Food Chem.* 51, 4589–4595. <https://doi.org/10.1021/jf030005q>

Coffey, A., Prinsen, E., Jansen, M.A.K., Conway, J. 2017. The UVB photoreceptor UVR8 mediates accumulation of UV absorbing pigments, but not changes in plant morphology, under outdoor conditions. *Plant Cell Environ.* 40, 2250–2260. <https://doi.org/10.1111/pce.13025>

Di Rienzo, J.A., Casanoves, F., Balzarini, M.G., Gonzalez, L., Tablada, M., and Robledo, C.W. InfoStat versión., 2017. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. Disponible en <http://www.infostat.com.ar>

Dixon, R.A., Paiva, N.L. 1995. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell.* 7, 1085-1097. <https://doi.org/10.1105/tpc.7.7.1085>

Du, W.-X., Avena-Bustillos, R., Breksa, A., McHugh, T., 2014. UV-B light as a factor affecting total soluble phenolic contents of various whole and fresh-cut specialty crops. *Postharvest Biol Technol.* 93, 72-82. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2014.02.004>

Ebisawa, M., Shoji, K., Kato, M., Shimomura, K., Goto, F., Yoshihara, T. 2008. Supplementary ultraviolet radiation B together with blue light at night increased quercetin content and flavonol synthase gene expression in leaf lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Environ. Control Biol.* 46, 1-11. <https://doi.org/10.2525/ecb.46.1>

Galieni, A., Di Mattia, C., De Gregorio, M., Specca, S., Mastrocola, D., Pisante, M., Stagnari, F., 2015. Effects of nutrient deficiency and abiotic environmental stresses on yield, phenolic compounds, and antiradical activity in lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Sci. Hort.* 187, 93-101. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.02.036>

Gazula, A., Kleinhenz, M., Scheerens, J., Ling, P. 2007. Anthocyanin Levels in Nine Lettuce (*Lactuca sativa*) Cultivars: Influence of Planting Date and Relations among Analytic, Instrumented, and Visual Assessments of Color. *HORTSCIENCE* 42, 232–238. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.42.2.232>

Gupta, S., Prakash, J., 2009. Studies on Indian Green Leafy Vegetables for Their Antioxidant Activity. *Plant Foods Hum. Nutr.* 64, 39-45. <https://doi.org/10.1007/s11130-008-0096-6>

- Hollosy, F. 2002. Effects of ultraviolet radiation on plant cells. *Micron* 33, 179-197. [https://doi.org/10.1016/s0968-4328\(01\)00011-7](https://doi.org/10.1016/s0968-4328(01)00011-7)
- Huché-Thélier L, Crespel L, Le Gourrierc J, Morel P, Sakr S, Leduc N, 2016. Light signaling and plant responses to blue and UV radiations-perspectives for applications in horticulture. *Environ. Exper. Bot.* 121, 22-38. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envexpbot.2015.06.009>
- Jiang, L., Wang, Y., Olof, L., Li, S. 2011. Does cell cycle arrest occur in plant under solar UV-B radiation? *Plant Signal. Behav.* 6, 892-894. <https://doi.org/10.4161/psb.6.6.15317>
- Kakani, V.G., Reddy, K.R., Zhao, D., and Sailaja, K. 2003. Field crop responses to ultraviolet-B radiation: a review. *Agricult. Forest Meterol.* 120, 191–218 <https://doi.org/10.1016/j.agrformet.2003.08.015>
- Kim, M., Moon, Y., Tou, J., Mou, B., Waterland, N., 2016. Nutritional value, bioactive compounds, and health benefits of lettuce (*Lactuca sativa* L.). *J. Food Comp. Anal.* 49,19-34. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2016.03.004>
- Liu, X., Ardo, S., Bunning, M., Parry, J., Zhou, K., Stushnoff, C., Stoniker, F., Yu, L., Kendall, P., 2007. Total phenolic content and DPPH* radical scavenging activity of lettuce (*Lactuca sativa* L.) grown in Colorado. *LWT Food Sci. Technol.* 40, 552-557. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2005.09.007>
- Llorach, R., Martínez-Sánchez, A., Tomás-Barberán, F.A., Gil, M.I., Ferreres, F., 2008. Characterization of polyphenols and antioxidant properties of five lettuce varieties and escarole. *Food Chem.* 108, 1028–1038. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.11.032>
- Lucini, L., and Bernardo, L. 2015. Comparison of proteome response to saline and zinc stress in lettuce. *Front. Plant Sci.* 6, 240. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00240>
- Luna, M.C., Tudela, J.A., Martínez-Sánchez, A., Allende, A., Marín, A., Gil, M.I. 2012. Long-term deficit and excess of irrigation influences quality and browning related enzymes and phenolic metabolism of fresh-cut iceberg lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Postharvest Biol. Technol.* 73, 37–45. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2012.05.011>
- McGuire, R. 1992. Reporting of objective color measurements. *HortScience* 27, 1254-1255. <https://doi.org/10.21273/hortsci.27.12.1254>
- Morales, L., Brosché, M., Vainonen, J., Jenkins, G., Wargent, J., Sipari, N., Strid, A., Lindfors, A., Tegelberg, R., Aphalo, P. 2013. Multiple Roles for UV RESISTANCE LOCUS8 in Regulating Gene Expression and Metabolite Accumulation in Arabidopsis under Solar Ultraviolet Radiation. *Plant Physiol.* 161, 744–759. www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.112.211375
- Mulabagal, V., Ngouajio, M., Nair, A., Zhang, Y., and Gottumukkala, A. 2010. In vitro evaluation of red and green lettuce (*Lactuca sativa*) for functional food properties. *Food Chem.* 118, 300-306. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.04.119>
- Munns, R., and Tester, M. 2008. Mechanisms of salinity tolerance. *Ann. Rev. Plant Biol.* 59, 651-681. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092911>
- Nocchi, N., Monteiro, H., Crespo, R., Ungaretti, T., Ribeiro, A. 2020. Effects of UV-B radiation on secondary metabolite production, antioxidant activity, photosynthesis, and herbivory interactions in *Nymphoides humboldtiana* (Menyanthaceae). *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 212, 112021. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2020.112021>
- Oh, M.M., Carey, E. E., Rajasherkar, C.B. 2009. Environmental stresses induce health-promoting phytochemicals in lettuce. *Plant Physiol. Biochem.* 47, 578-583. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2009.02.008>
- Parihar, P., Singh, S., Singh, R., Singh, V. P., Prasad, S. M. 2015. Changing scenario in plant UV-B research: UV-B from a generic stressor to a specific regulator. *J. Photochem. Photobiol. B, Biol.* 153, 33-343. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2015.10.004>

- Pinto, E., Almeida, A., Aguilar, A., and Ferreira, I. 2014. Changes in macro minerals, trace elements and pigments content during lettuce (*Lactuca sativa* L.) growth: Influence of soil composition. *Food Chem.* 152, 603-611. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.12.023>
- Sakalauskaitė, J., Viskelis, P., Dambrauskienė, E., Sakalauskienė, S., Samuolienė, G., Brazaityte, A., Duchovskis, P., Urbonavicienė, 2012. The effects of different UVB radiation intensities on morphological and biochemical characteristics in *Ocimum basilicum* L. *J. Sci. Food. Agric.* 93, 1266-1271. <https://doi.org/10.1002/jsfa.5879>
- Schneider, C.A., Rasband, W.S., Eliceiri, K.W., 2012. NIH image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods* 9, 671-675. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>
- Sellami, I.H., Maamouri, E., Chahed, T., Wannes, W.A., Kchouk, M.E., and Marzouk, B. 2009. Effect of growth stage on the content and composition of the essential oil and phenolic fraction of sweet marjoran (*Origanum majorana* L.) *Ind Crops Prod.* 30, 95-402. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2009.07.010>
- Sivankalyani, V., Sela, N., Feygenberg, O., Zemach, H., Maurer, D., Alkan, N., 2016. Transcriptome dynamics in mango fruit peel reveals mechanisms of chilling stress. *Front. Plant. Sci.* 7, 1579. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01579>
- Staxén, I., Bornman, J. 1994. A morphological and cytological study of *Petunia hybrida* exposed to UV-B radiation. *Physiol. Plant.* 91, 735-740. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1994.tb03013.x>
- Sumner, M. J. 2015. Epoxy resins for light and transmission electron microscopy. In E.C.T. Yeung, C. Stasolla, M. Summer, & B. Huang (Eds.), *Plant Microtechniques and Protocols* (pp. 83-101). Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-19944-3_5
- Tharasena, B., Lawan, S., 2014. Phenolics, flavonoids and antioxidant activity of vegetables as Thai side dish. *APCBEEProcedia* 8, 99–104. <https://doi.org/10.1016/j.apcbee.2014.03.008>
- Tsormpatsidis, E., Henbest, RGC., Davis, NH., Hadley, P., Wagstaffe, A. 2008. UV irradiance as a major influence on growth, development, and secondary products of commercial importance in Lollo Rosso lettuce 'Revolution' grown under polyethylene films. *Environ. Exp. Bot.* 63; 232–239. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2007.12.002>
- Usha Rami, P., Jyothisna, Y. 2010. Biochemical and enzymatic changes in rice plants as a mechanism of defense. *Acta Physiol. Plant.* 32,695-704. <https://doi.org/10.1007/s11738-009-0449-2>
- War, A.R. Paulraj, M.G., Ahmad, T., Buhroo, A.A., Ignacimuthu, S., Sharma, H.C. 2012. Mechanisms of plant defense against insect herbivores. *Plant Signal. Behav.* 7, 1306-1320 <https://doi.org/10.4161/psb.21663>
- Xie, C., Zhang, R., Qu, Y., Miao, Z., Zhang, Y., Shen, X., Wang, T., Dong, J., 2012. Overexpression of MtCAS31 enhances drought tolerance in transgenic Arabidopsis by reducing stomatal density. *New Phytol.* 195, 124–135. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2012.04136.x>
- Xu., C., Natarajan, S., Sullian., JH. 2008. Impact of solar ultraviolet-B radiation on the antioxidant defense system in soybean lines differing in flavonoid contents. *Environ. Exp. Bot.* 63, 39–48. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2007.10.029>
- Zdunek-Zastocka, E., Grabowska, A., Michniewska, B., Orzechowski, S. 2021. Proline concentration and its metabolism are regulated in a leaf age dependent manner but not by abscisic acid in pea plants exposed to cadmium stress. *Cells* 10, 946. <https://doi.org/10.3390/cells10040946>
- Zhao, X., Carey, E., Young, J., Wang, W., Iwamoto, T., 2007. Influences of organic fertilization, high tunnel environment, and postharvest storage on phenolic compounds in lettuce. *HortScience* 42, 71–76. <http://hortsci.ashspublications.org/content/42/1/71.full>

Zlatev, Z., Lidon, F., Kaimakanova, M. 2012. Plant physiological responses to UV-B radiation. *Emir. J. Food Agric.* 24: 481-501. doi: 10.9755/ejfa.v24i6.14669

Zlotek, U., Swieca, M., Jakubczyk, A., 2014. Effect of abiotic elicitation on main health-promoting compounds, antioxidant activity and commercial quality of butter lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Food Chem.* 148, 253–260. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.10.031>

5.3.- Efecto de la aplicación de diferentes dosis de radiación UV-B sobre el rendimiento y concentración de compuestos fenólicos de lechugas Lollo Bionda cv. 'Levistro' y Lollo Rosso cv. 'Carmolí' y su identificación por cromatografía líquida

5.3.1.- Introducción

Algunas investigaciones han revelado que la radiación UV-B no solo actúa como un factor de estrés limitante, sino que desempeña un papel importante como regulador y factor de aclimatación en las plantas (Parihar *et al.*, 2015). La radiación UV-B actúa como una señal ambiental clave que desencadena respuestas bioquímicas y fisiológicas en las plantas, lo que resulta en un incremento de la síntesis de metabolitos secundarios (Jansen *et al.*, 2008).

Una de las respuestas más destacadas a la exposición a la radiación UV-B es la inducción de la biosíntesis de metabolitos secundarios, en particular flavonoides, ácidos fenólicos y otros antioxidantes (Frohn Meyer y Staiger, 2003; Jansen *et al.*, 2008; Eichholz *et al.*, 2012; Du *et al.*, 2014). En particular los flavonoides desempeñan un papel crucial en la defensa de las plantas contra el estrés oxidativo causado por los rayos UV (Ebisawa *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2008). Además, su acumulación en las células epidérmicas permite la absorción y filtración eficaz de la radiación UV-B, reduciendo la penetración a tejidos más sensibles como el mesófilo (Frohn Meyer y Staiger, 2003; Krizek *et al.*, 2004; Bandurska *et al.*, 2013; Du *et al.*, 2014).

La síntesis de flavonoides está regulada por vías de señalización específicas que se activan en respuesta a la radiación UV-B (Brown *et al.*, 2005; Ebisawa *et al.*, 2008). El fotorreceptor UVR8 percibe la radiación UV-B y activan factores de transcripción que regulan la expresión de genes involucrados en la biosíntesis de flavonoides como la chalcona sintasa (CHS), chalcona isomerasa (CHI); flavanona 3-hidroxilasa (F3H) y flavonol sintasa 1 (FLS1) entre otros (Brown *et al.*, 2005). Esta regulación precisa y coordinada asegura la producción de compuestos que ayudan a las plantas a adaptarse y protegerse contra el estrés causado por la radiación UV-B (Xu *et al.*, 2008; Morales *et al.*, 2013; Coffey *et al.*, 2017).

Así, la radiación UV-B no solo representa un factor de estrés para las plantas, sino que también desempeña un papel crucial como factor regulador y de aclimatación (Parihar, *et al.*, 2015). Al estimular la síntesis de flavonoides, la radiación UV-B permite que las plantas se defiendan del estrés oxidativo inducido por los rayos UV y mantengan su funcionamiento fisiológico en estas condiciones ambientales (Brown *et al.*, 2005; Coffey *et al.*, 2017; Nocchi *et al.*, 2020). Por tanto, el objetivo de este ensayo fue identificar y cuantificar los compuestos fenólicos acumulados en lechugas Lollo Bionda cv. 'Levistro' y Lollo Rosso cv. 'Carmolí' cultivadas bajo diferentes dosis de radiación UV-B, mediante cromatografía de alto rendimiento.

5.3.2.- Metodología

5.3.2.1- Material vegetal y condiciones de cultivo

El material vegetal utilizado en este ensayo correspondió a lechugas de tipo Lollo Bionda cultivar 'Levistro' (hojas verdes) y de tipo Lollo Rosso cultivar 'Carmolí' (hojas rojas) de la empresa Rijk Zwaan, las cuales fueron cultivadas como se describe en la sección 4.1 durante la temporada de primavera. Las características del invernadero donde se llevó a cabo el cultivo correspondieron a las descritas en la sección 5.2.2.1.

Las condiciones ambientales de cultivo: temperaturas mínimas y máximas del aire; la temperatura, conductividad eléctrica, oxígeno disuelto y pH de la solución nutritiva; y la media diaria de radiación solar total, fueron registradas durante todo el periodo de cultivo y se presentan en la Figura 5.14.

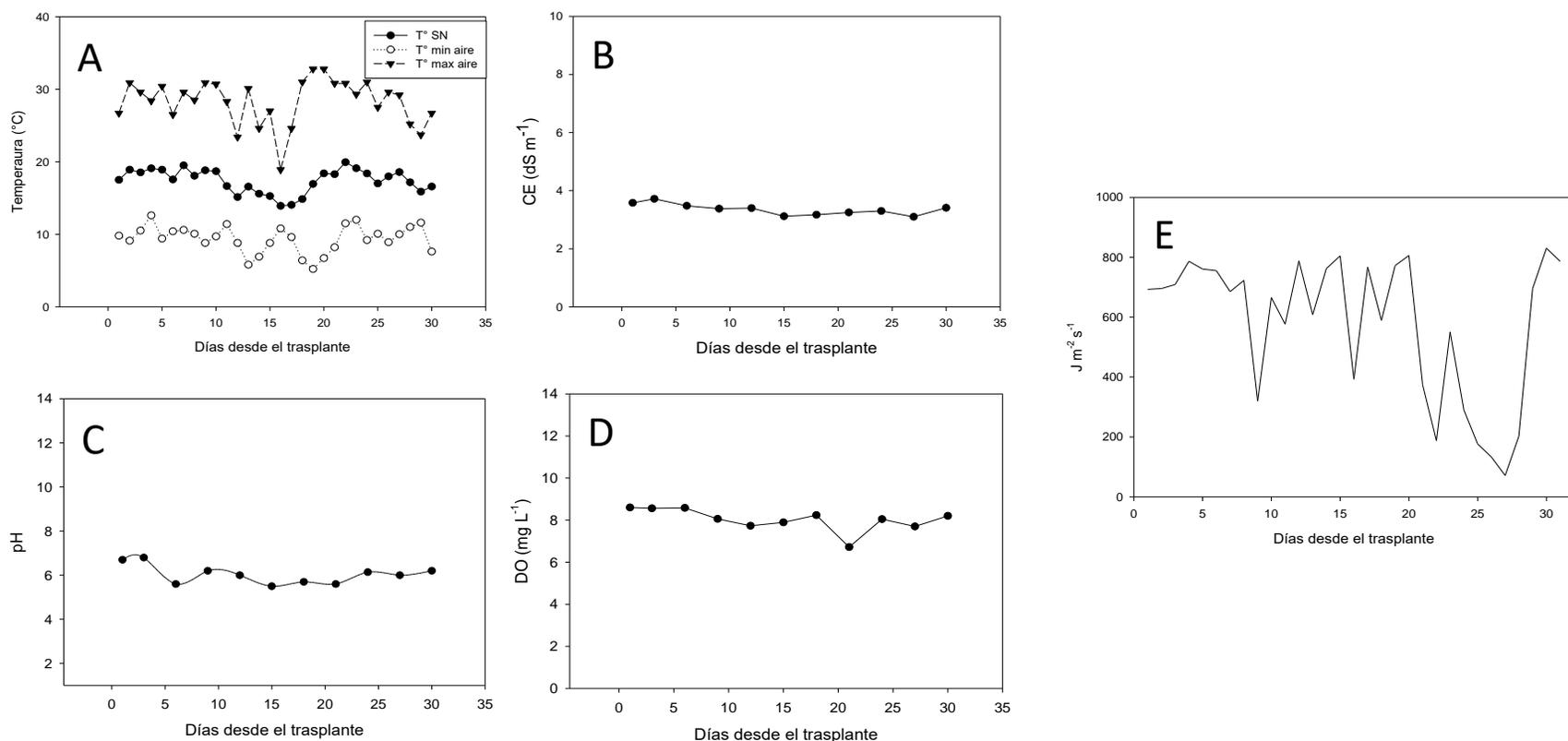


Figura 5.14. Temperaturas medias mínimas y máximas del aire en el invernadero y temperaturas de la solución nutritiva, conductividad eléctrica, pH y oxígeno disuelto en la solución nutritiva y radiación total global registradas durante el cultivo.

En la figura se presentan los parámetros ambientales registrados durante el cultivo de lechugas Lollo Bionda cv. 'Levistro' y Lollo Rosso cv. 'Carmolí' con aplicación de diferentes dosis acumuladas de radiación UV-B: 0; 10,5 y 21 kJ m^{-2} . A: Temperaturas máximas y mínimas del aire dentro del invernadero y temperaturas de la solución nutritiva (SN) en $^{\circ}\text{C}$. B: Conductividad eléctrica (CE) de la SN expresada en dS m^{-1} , C: pH de la SN. D: oxígeno disuelto expresado en mg L^{-1} presente en la SN. E: Promedio diario de la radiación total global expresada en $\text{J m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Puntos representan medias \pm EE del registro diario, a las 10 am, de tres mediciones por repetición ($n=9$).

5.3.2.2.- Montaje del ensayo y diseño experimental

Para evaluar el efecto la radiación UV-B sobre el rendimiento y la concentración e identificación de compuestos fenólicos en lechugas, se estudiaron dos cultivares de lechuga, 'Levistro' y 'Carmolí'. El experimento fue dispuesto en tres bloques con un arreglo de parcelas divididas. La parcela principal correspondió a la dosis acumulada de radiación UV-B (0; 10,5; 21,0 kJ m⁻²) y la subparcela al cultivar. Cada bloque representó una repetición por lo que hubo tres sistemas hidropónicos de raíz flotante independientes para cada dosis de radiación UV-B aplicada.

Los tratamientos de radiación UV-B fueron aplicados utilizando 2 lámparas de UV-B de banda ancha TL (Philips, Países Bajos) como se describe en la sección 5.2.2.2. Las tres dosis de radiación UV-B fueron obtenidas por la acumulación de la radiación aplicada durante el cultivo. Para esto, el cultivo de 30 días se separó en 3 periodos de 10 días cada uno. Durante el primer periodo de 10 días, se aplicó el tratamiento de radiación UV-B una vez por día, considerando la intensidad de la luz y ajustando el tiempo de encendido de las lámparas en 0, 30 y 60 min. A este periodo le siguió un segundo periodo de 10 días sin aplicación de radiación UV-B. Finalmente durante los últimos 10 días de cultivo, se volvió a aplicar el tratamiento de radiación UV-B de la misma manera logrando así una dosis de radiación acumulada final de 0 kJ m⁻², utilizado como tratamiento control; 10,5 kJ m⁻² y 21,0 kJ m⁻².

5.3.2.3.- Parámetros de crecimiento de las plantas (MF, MS, % MS)

Los parámetros de crecimiento de masa fresca (MF), masa seca (MS) y porcentaje de masa seca (% MS) fueron obtenidos de acuerdo con la metodología descrita en la sección 4.3.

5.3.2.4.- Parámetros de color (L, C*, hue)

Los parámetros de color fueron evaluados como una característica de calidad de las hojas y se evaluaron siguiendo la metodología descrita en la sección 5.2.2.4. Los datos fueron analizados utilizando el espacio de color CIE L*a*b* y el software SpectraMagic NX, obteniéndose los valores de luminosidad (L), saturación de color o croma (C*) y el ángulo del tono o matiz (hue) (McGuire, 1992).

5.3.2.5.-Determinación de compuestos funcionales

5.3.2.5.1- Extracción de las fracciones fenólicas

Las extracciones de los compuestos fenólicos solubles se llevaron a cabo siguiendo las recomendaciones de Galieni *et al.* 2015, como se describe en detalle en la sección 4.4.1.

5.3.2.5.2.- Determinación de la concentración de fenoles totales

La concentración de fenoles totales (FT) se midió utilizando el método propuesto por Ainsworth y Gillespie (2007), como se describe en la sección 4.4.2. Los resultados fueron expresados como miligramos equivalentes de ácido gálico por cada 100 gramos masa fresca (mg EAG 100 g⁻¹ MF).

5.3.2.5.3.- Determinación de la concentración de flavonoides totales

La concentración de flavonoides totales se midió siguiendo el método propuesto por Tharasena y Lawan (2014) como se detalla en la sección 5.2.2.5.3. Los resultados de esta

determinación fueron expresados como miligramos equivalentes de rutina (eq Rut) en 100 gramos de masa fresca (mg eq Rut 100 g⁻¹ MF).

5.3.2.5.4.- Determinación de la concentración de antocianinas totales

La concentración de antocianinas totales se determinó utilizando el método de pH diferencial siguiendo las recomendaciones de Du *et al.* (2014) y detallado en la sección 5.2.2.5.4. El contenido total de antocianinas se expresó como miligramos equivalentes de cianidina-3-glucósido (eq Cian3gluc) en 100 gramos de masa fresca (mg eq Cian3gluc 100 g⁻¹ MF).

5.3.2.5.5.- Determinación de la capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante (CA) se llevó a cabo mediante dos métodos, descritos en la sección 4.4.3.

5.3.2.5.5.1.- Método de FRAP

El método de FRAP (Ferric reducing antioxidant power) fue realizado de acuerdo con la metodología propuesta por Benzie y Strain (1996) y detallado en la sección 4.4.3.1. Los resultados fueron expresados como miligramos equivalentes de Trolox (eq Trolox) por cada 100 gramos de materia fresca (mg eq Trolox 100 g⁻¹ MF).

5.3.2.5.5.2.- Método de DPPH

El método de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) fue realizado según la metodología propuesta por Gupta y Prakash (2009) y detallada en la sección 4.4.3.2. Los resultados fueron expresados como miligramos equivalentes de Trolox (eq Trolox) por cada 100 gramos de materia fresca (mg eq Trolox 100 g⁻¹ MF).

5.3.2.6.- Cuantificación e identificación de compuestos fenólicos por UPLC

La cuantificación e identificación de los compuestos fenólicos de tipo ácidos fenólicos y flavonoides se llevó a cabo mediante un análisis de cromatografía líquida de ultra alto rendimiento (UPLC) con un equipo marca Waters Acquity (Milford, EE. UU). Equipado con un detector de arreglo de diodos (PDA) UV/Vis con rango de detección entre 190 y 500 nm, una precisión de ± 1 nm y una resolución óptica de 1,2 nm.

La preparación de las muestras para la inyección fue realizada como se describe en la sección 4.4.1 y luego filtradas con un filtro de jeringa estéril, con membrana de PVDF y 0,22 µm de tamaño de poro (Merck S.A., Chile). El extracto de MeOH: H₂O se almacenó a -20 °C en viales de borosilicato de 2 mL con tapa rosca y septum de silicona/PTFE pre perforado (Waters S.A., Chile), hasta la inyección.

La separación de los componentes de la muestra se realizó mediante el uso de una columna C18 de 2,1*50 mL de tamaño y con un diámetro de partícula de 1,7 µm (Waters S.A., Chile). Como fases móviles se utilizaron acetonitrilo (A) y agua (B), ambos acidificados con ácido fórmico al 0,1 % (Merck S.A., Chile).

Las condiciones cromatográficas fueron seteadas utilizando el sistema de datos de cromatografía Empower (Waters, Milford, EE. UU). La temperatura de la columna se ajustó en 40°C, y la temperatura de mantención de las muestras en 10°C. El flujo de las fases móviles fue de 0,6 mL min⁻¹, el volumen de inyección en 10 µL y el rango de longitud de onda para la adquisición de datos del PDA entre 190 y 500 nm.

Para la separación de los compuestos se utilizó un gradiente que comenzó con 5 % de fase A la cual se mantuvo durante 0,5 min. Luego se incrementó de manera lineal hasta llegar a un 10 % de fase A al minuto 1. La fase A se siguió aumentando de manera lineal hasta llegar a un 15 % en el minuto 2,0, luego hasta alcanzar un 18 % de fase A a los 2,5 min para finalmente llegar a una proporción del 20 % de fase A al minuto 3,0. El gradiente continuó con una baja en el porcentaje de fase A hasta el 18 % al minuto 3,5; 15 % de A al min 4,0; 10 % de A al minuto 4,5 y luego se volvió a las condiciones iniciales de 5 % de A al minuto 5. Los cromatogramas fueron extraídos a 350 nm siguiendo las recomendaciones de Romani *et al.* (2002).

Una vez obtenidos los cromatogramas y utilizando el sistema de datos de cromatografía Empower, se seleccionaron los peaks de manera manual obteniéndose el área y espectro de absorción de cada uno de ellos. El espectro de absorción de cada peak fue utilizado para identificar la familia de compuestos a la cual pertenecía y la concentración de los diferentes ácidos fenólicos se determinó utilizando una curva de calibración de ácido clorogénico y expresados como miligramos equivalentes de ácido clorogénico por cada 100 gramos de masa fresca (mg eq ácido clorogénico 100g⁻¹ MF). Por su parte, para la determinación de la concentración de los flavonoides se utilizó una curva de rutina, los resultados fueron expresados como miligramos equivalentes de rutina por cada 100 g de masa fresca (mg eq rutina 100g⁻¹ MF). Para los cálculos finales se consideraron los resultados nueve inyecciones, correspondientes a extracciones de tres muestras por repetición.

5.3.2.7.- Cuantificación e identificación de antocianinas en lechugas 'Carmolí'

La cuantificación e identificación de antocianinas se llevó a cabo mediante cromatografía líquida de ultra alto rendimiento (UPLC) con un equipo marca Waters Acquity (Milford, EE. UU.) el cual contó con un detector de arreglo de diodos (PDA) UV/Vis con un rango de detección entre 190 y 500 nm, una precisión de ±1 nm y una resolución óptica de 1,2 nm.

La preparación de las muestras para la inyección fue realizada como se describe en la sección 4.4.1 y luego filtradas con un filtro de jeringa estéril, con membrana de PVDF y 0,22 µm de tamaño de poro (Merck S.A., Chile). El extracto de MeOH: H₂O se almacenó a -20 °C en viales de borosilicato de 2 mL con tapa rosca y septum de silicona/PTFE pre perforado (Waters S.A., Chile), hasta la inyección.

La separación de las antocianinas de la muestra se realizó mediante el uso de una columna C18 de 2,1*50 mL de tamaño y con un diámetro de partícula de 1,7 µm (Waters S.A., Chile). Como fases móviles se utilizaron acetonitrilo (A) y agua acidificada con ácido fórmico 5 % (B) (Merck S.A., Chile).

Las condiciones cromatográficas fueron seteadas utilizando el sistema de datos de cromatografía Empower (Waters, Milford, EE. UU) siguiendo las recomendaciones descritas por Blackhall *et al.* (2018). La temperatura de la columna se ajustó en 35°C, y la temperatura de mantención de las muestras en 10°C. El flujo de las fases móviles fue de 0,35 mL min⁻¹, el volumen de inyección de la muestra de 10 µL y el rango de longitud de onda para la adquisición de datos del PDA entre 190 y 500 nm.

Para la separación de las antocianinas se utilizó un gradiente que comenzó con 5 % de fase A, durante 2 min. Luego se incrementó la proporción de fase A, de manera lineal, hasta alcanzar un 17,5 % al minuto 7. Finalmente se incorporó un periodo de re-equilibración de 3 min para volver a las condiciones iniciales. Los cromatogramas fueron obtenidos a 497 nm siguiendo el método descrito por Blackhall *et al.* (2018).

Con los cromatogramas y utilizando el sistema de datos de cromatografía Empower, se seleccionó cada peak de manera manual para obtener el área. Con esta información y basándose

en una curva de calibración para cianidina se cuantificó la concentración de cada una de las antocianinas. La concentración de las diferentes antocianinas se expresó como miligramos equivalentes de cianidina 3 glicósido por cada 100 gramos de masa fresca (mg eq cian3gluc 100 g⁻¹ MF) y fueron resultado de medias aritméticas de nueve inyecciones, correspondientes a tres muestras por repetición.

5.3.2.8.- Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando el software InfoStat versión 2017 (Di Rienzo *et al.*, 2017) como se describe en la sección 4.4.4.

5.3.3.- Resultados y discusión

5.3.3.1.- Rendimiento de lechugas tipo Lollo Bionda y Lollo Rosso cultivadas con diferentes dosis de radiación UV-B

En la Figura 5.15 se puede apreciar el tamaño relativo de lechugas tipo Lollo Bionda cv. 'Levistro' y Lollo Rosso cultivar 'Carmolí' de 30 días de cultivo luego de la aplicación de suplementación de radiación UV-B.

Luego de la cosecha, se observó que el tratamiento de 10,5 y 21 kJ m⁻² aplicado sobre el cultivar 'Levistro', no presentó un efecto significativo en la masa fresca de las lechugas, alcanzando una masa promedio de 85,3 y 81,1 g por lechuga, respectivamente, mientras que el control registró una masa promedio de 80,28 g (Figura 5.16 A). Por otro lado, las lechugas tipo Lollo Rosso, cv. 'Carmolí', presentaron una reducción significativa en la masa fresca debido a la radiación UV-B del 20 %. Esta variedad de lechuga presentó una masa fresca promedio de 32,5 g para el tratamiento control (0 kJ m⁻²) mientras que para los tratamientos de 10,5 y 21 kJ m⁻² presentó valores de masas frescas promedios de 25,4 y 26,1 g, respectivamente (Figura 5.16 B). La reducción en la masa fresca para el cultivar de hojas rojas respalda los resultados obtenidos por Tsormpatsidis *et al.* (2008) para lechugas tipo Lollo Rosso, quienes reportaron que este tipo de lechuga mostró una reducción en su crecimiento vegetativo, expresado como número de hojas, cuando estas crecieron en presencia de radiación UV. Esta reducción en la masa fresca podría explicarse debido a que la radiación UV-B tiene un impacto negativo en la fotosíntesis de las plantas al inhibir la expresión de genes fotosintéticos resultando en una disminución de la concentración de clorofila y captación de CO₂ y en la inhibición de la división celular (Aksakal, *et al.*, 2016).

Luego de la aplicación de los tratamientos con radiación UV-B no se observó diferencias significativas en el porcentaje de materia seca para ninguno de los dos cultivares de lechuga estudiados (Figura 5.17).

Sin embargo, cabe destacar que las lechugas 'Carmolí' presentaron un mayor porcentaje de materia seca, entre 5,3 y 5,6 % que las 'Levistro' que presentaron valores entre 4,1 y 4,2 %.

5.3.3.2.- Color de lechugas tipo Lollo Bionda y Lollo Rosso cultivadas con diferentes dosis de radiación UV-B

El color en las hortalizas puede presentar cambios dependiendo de las condiciones ambientales a las que se ven expuestas durante su crecimiento y desarrollo (Hawrylak-Nowak *et al.*, 2021; Zhao *et al.*, 2007). Algunos factores, como una mayor intensidad lumínica o la radiación UV-B pueden estimular la producción de pigmentos capaces de absorber el exceso de energía y acumularlos en las capas superficiales para proteger las estructuras más internas (Frohnmeier y Staiger, 2003; Morales *et al.* 2013; Huché-Thélier *et al.*, 2016; Coffey *et al.*, 2017). Entre estos compuestos destacan los carotenoides, que confieren tonalidades amarillas y naranjas a las

hortalizas como también las antocianinas, responsables de los colores rojos, morados y azules (Kumari *et al*, 2017). Por tanto, comprender cómo las condiciones ambientales impactan en el cambio de color de las hortalizas es fundamental para optimizar su cultivo y garantizar una alta calidad visual y funcional.

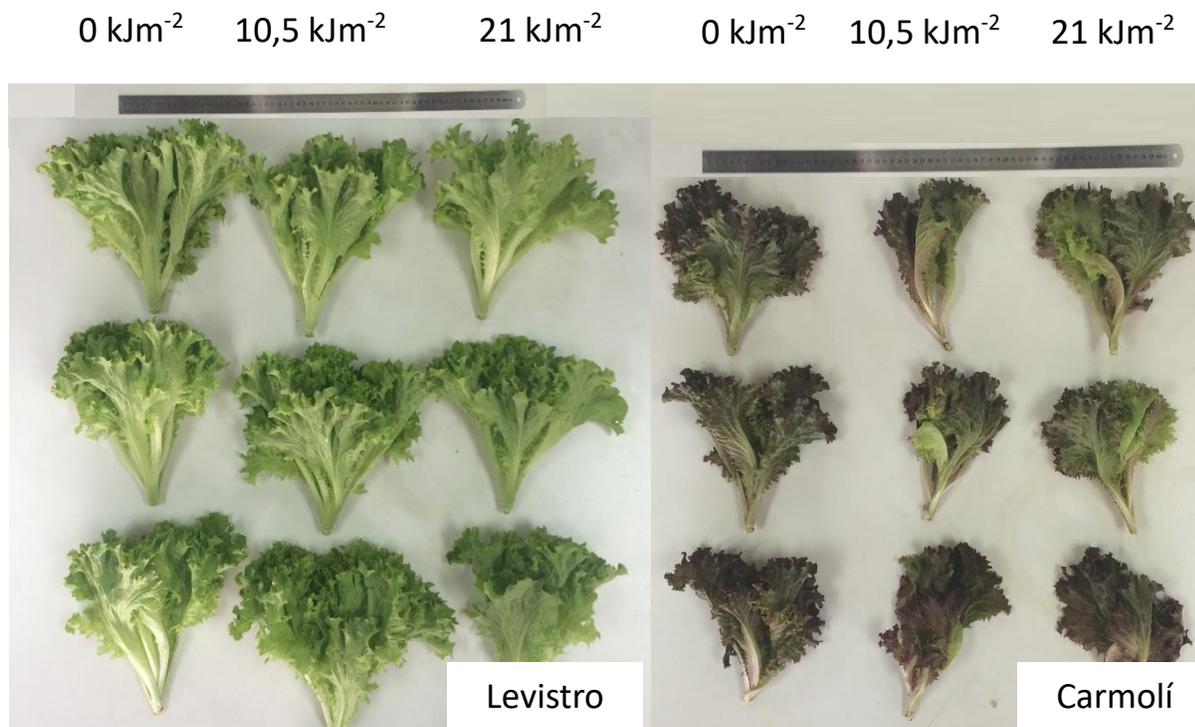


Figura 5.15. Imagen del tamaño comparativo de lechugas Lollo Bionda cv. ‘Levistro’ y Lollo Rosso cv. ‘Carmolí’ cultivadas con diferentes dosis de radiación UV-B.

La imagen muestra el efecto de la suplementación de radiación UV-B sobre el tamaño relativo de lechugas ‘Levistro’ (izquierda) y ‘Carmolí’ (derecha) luego de 30 días de cultivo.

Para el cultivar 'Levistro' ninguno de los parámetros de color fue influenciado por la suplementación de radiación UV-B durante el cultivo (Tabla 5.6). En cambio, el cultivar 'Carmolí' presentó un efecto significativo de la suplementación por radiación UV-B en la luminosidad y en el ángulo hue, presentando los menores valores cuando las plantas fueron suplementadas con dosis de 10,5 kJ m⁻². Para la luminosidad, este valor correspondió a 19,35 lo cual representa una reducción del 30 % respecto del valor medio registrado en las lechugas control de 27,88. Esta reducción indicaría una coloración más oscura en las lechugas tratadas con 10,5 kJ m⁻². Por otro lado, el menor valor del ángulo hue fue de 59,15° registrado también para el tratamiento de 10,5 kJ m⁻². Con respecto al control, que registró un valor de 79,18°, las diferencias en el ángulo hue significó una reducción del 25 % e indicó coloraciones más cercanas al rojo (McGuire, 1992) (Tabla 5.6). Finalmente, y a diferencia del ensayo anterior desarrollado en otoño, en primavera no se observaron las manchas bronceadas o marrones en la superficie de las hojas verdes ni las manchas cloróticas color verde para el cultivar de hojas rojas, provocadas por un exceso de radiación UV-B descritas por Kakani *et al.*, (2003).

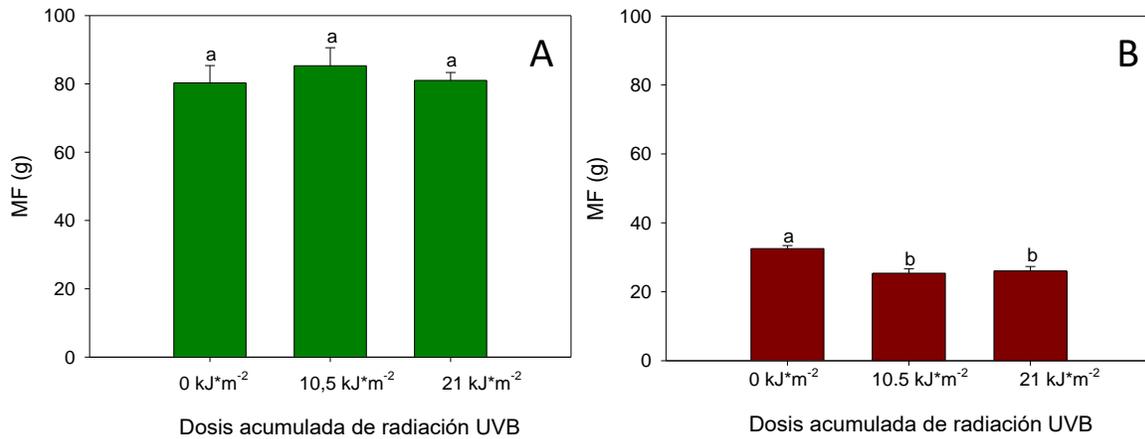


Figura 5.16. Masa fresca (MF) de lechugas Lollo Bionda cv. 'Levistro' y Lollo Rosso cv. 'Carmolí' cultivadas con diferentes dosis de radiación UV-B.

Las gráficas muestran la masa fresca (MF) de lechugas Lollo Bionda cv. 'Levistro' (A) y Lollo Rosso cv. 'Carmolí' (B) cultivadas con diferentes dosis acumuladas de radiación UV-B durante 30 días. Las barras representan medias (\pm EE) de 5 réplicas biológicas por repetición ($n=15$). ^{a,b} Letras diferentes corresponden a diferencias significativas determinadas por la prueba de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher con un nivel de significancia de $p < 0,05$.

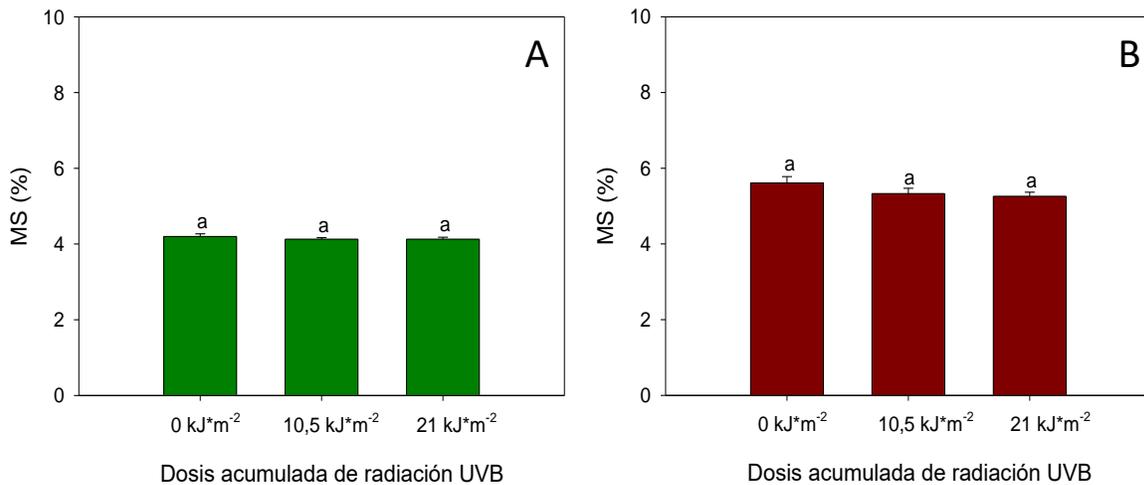


Figura 5.17. Porcentaje de masa seca (%MS) de lechugas Lollo Bionda cv. 'Levistro' y Lollo Rosso cv. 'Carmolí' cultivadas con diferentes dosis de radiación UV-B.

Las gráficas muestran el porcentaje de masa seca (%MS) de lechugas Lollo Bionda cv. 'Levistro' (A) y Lollo Rosso cv. 'Carmolí' (B) cultivadas con diferentes dosis acumuladas de radiación UV-B durante 30 días. Las barras representan medias (\pm EE) de 5 réplicas biológicas por repetición ($n=15$). ^a Letras diferentes corresponden a diferencias significativas determinadas por la prueba de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher con un nivel de significancia de $p < 0,05$.

Tabla 5.6. Luminosidad, saturación o croma y ángulo hue de lechugas Lollo Bionda cv. ‘Levistro’ y Lollo Rosso cv. ‘Carmoli’ cultivadas con diferentes dosis acumuladas de radiación UV-B.

| Tratamiento UV-B (kJ m ⁻²) | Luminosidad | | | | Saturación o croma | | | | Ángulo hue | | | |
|--|-------------|-----|-------------------|-----|--------------------|-----|-----------|-----|------------|-----|-------------------|-----|
| | ‘Levistro’ | | ‘Carmoli’ | | ‘Levistro’ | | ‘Carmoli’ | | ‘Levistro’ | | ‘Carmoli’ | |
| | Media | EE | Media | EE | Media | EE | Media | EE | Media | EE | Media | EE |
| 0 | 52,4 | 0,9 | 27,9 ^a | 1,8 | 47,2 | 0,9 | 27,5 | 1,2 | 105,7 | 0,1 | 79,2 ^a | 3,2 |
| 10,5 | 52,5 | 0,6 | 19,3 ^b | 1,8 | 47,8 | 0,6 | 25,6 | 0,6 | 105,7 | 0,1 | 59,2 ^b | 4,2 |
| 21 | 51,8 | 0,5 | 24,5 ^a | 1,3 | 47,2 | 0,8 | 26,8 | 0,9 | 105,7 | 0,1 | 71,4 ^a | 3,8 |
| valor <i>p</i> | ns | | ** | | ns | | ns | | ns | | *** | |

En la tabla se presentan los diferentes parámetros que definen el color: Luminosidad, saturación o croma y ángulo hue en lechugas tipo Lollo Bionda cv. ‘Levistro’ y Lollo Rosso cv. ‘Carmoli’ cultivadas con diferentes dosis acumuladas de radiación UV-B. Los valores representan medias y error estándar (EE) de 30 datos. ^{a,b} Letras diferentes corresponden a diferencias significativas determinadas por la prueba de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher con un nivel de significancia de $p < 0,05$. ns: no significativo; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$.

5.3.3.3.- Concentración de fenoles, flavonoides, antocianinas totales y capacidad antioxidante en lechugas tipo Lollo Bionda y Lollo Rosso cultivadas con diferentes dosis de radiación UV-B

Tanto la concentración de fenoles como de flavonoides totales respondió de manera significativa a la radiación UV-B en ambos cultivares (Frohnmeier y Staiger, 2003; Jansen *et al.*, 2008; Morales *et al.*, 2013). Para el cultivar ‘Levistro’ se observó un aumento significativo en la concentración de fenoles totales a dosis de 10,5 kJ m⁻² de radiación UV-B, alcanzando valores de 411,20 mg EAG 100 g⁻¹ MF. Este aumento correspondió al 19,6 % con respecto al control (0 kJ m⁻²) donde se registró un valor medio de 343,77 mg EAG 100 g⁻¹ MF (Tabla 5.7). Los valores de fenoles totales encontrados para este cultivar fueron mayores a los máximos encontrados por Llorach *et al.* (2008) para lechugas verdes tipo Romana y Continental cultivadas a campo abierto, las cuales presentaron valores de 63,5 y 125,5 mg EAG 100 g⁻¹ MF, respectivamente. También fueron mayores a los reportados por Zlotek *et al.* (2014) quienes registraron entre 40 y 140 mg EAG 100 g⁻¹ MF para lechugas verdes var. Capitata cultivadas bajo condiciones indoor (25/18 °C, fotoperiodo 14/10 h día/noche, y una intensidad de luz a nivel de planta de 500–700 μmol m⁻² s⁻¹ y una humedad relativa del 70%.

Por su parte el cultivar ‘Carmoli’ presentó diferencias entre las dosis de 10,5 y 21 kJ m⁻² de radiación UV-B, obteniéndose la mayor concentración de fenoles totales de 2.598 mg EAG 100 g⁻¹ MF, cuando se utilizó una dosis de 10,5 kJ m⁻² y la menor concentración (2310 mg EAG 100 g⁻¹ MF) cuando se utilizó una dosis de 21 kJ m⁻² (Tabla 5.7). Si bien la concentración de fenoles totales en estas lechugas fue muy superior a la reportada por Llorach *et al.* (2008) quien registró concentraciones de 571,2 mg EAG 100 g⁻¹ MF. Según la revisión de Dannehl y Josuttis (2014), se ha observado que existen importantes diferencias en la concentración de compuestos funcionales de una misma especie. Según esta publicación el contenido de fenoles totales puede variar incluso de hasta 14 veces entre diferentes cultivares de tomate; la concentración total de antocianinas en rábano puede presentar diferencias de hasta 149 veces; la concentración de ácido elágico en frutilla podría presentar diferencias de más de cinco veces mientras que la concentración de fenoles totales puede registrar diferencias de 1,6 veces. Estas variaciones podrían explicar las importantes diferencias entre los valores registrados en este estudio y los reportados por otros autores.

La concentración de flavonoides para el cultivar ‘Levistro’ también presentó diferencias de concentración cuando ambas dosis de radiación fueron evaluadas. La mayor concentración de

flavonoides fue registrada en las plantas tratadas con $10,5 \text{ kJ m}^{-2}$ ($362 \text{ mg eq rut } 100 \text{ g}^{-1} \text{ MF}$) mientras que la menor concentración se registró a 21 kJ m^{-2} ($\text{mg eq rut } 100 \text{ g}^{-1} \text{ MF}$) (Tabla 5.7). Para este tipo de compuestos, el cultivar 'Carmolí' presentó una reducción significativa en la concentración con respecto al control de $143,34 \text{ mg eq rut } 100 \text{ g}^{-1} \text{ MF}$, lo cual representa una reducción del 12,6 % (Tabla 5.7). Si bien, autores como Huché-Thélier *et al.* (2016), describen una acumulación significativa de antocianinas promovida por la suplementación con longitudes de onda UV-A, UV-B o azul, la concentración de antocianinas en el cultivar 'Carmolí' solo presentó una tendencia al aumento a dosis medias de radiación y una reducción a mayores dosis de radiación UV-B, sin ser significativa. Finalmente, a dosis de $10,5 \text{ kJ m}^{-2}$ de radiación, la capacidad antioxidante para el cultivar 'Levistro' medido por el método de FRAP mostró un aumento del 14,8 % con respecto al control mientras que el cultivar 'Carmolí' a dosis de 21 kJ m^{-2} presentó una reducción de $70,4 \text{ mg eq Trolox } 100 \text{ g}^{-1} \text{ MF}$ (14 %) con respecto al control (Tabla 5.7). La capacidad antioxidante medida por DPPH no presentó diferencias significativas para el tratamiento en ninguno de los cultivares evaluados.

5.3.3.4.- Concentración de ácidos fenólicos y flavonoides determinada por UPLC en lechugas tipo Lollo Bionda y Lollo Rosso cultivadas con diferentes dosis de radiación UV-B

A partir de los extractos hidro-metanólicos se lograron separar 12 peaks diferentes para el cultivar 'Levistro' y 13 para el cultivar 'Carmolí'. Cabe destacar que la mayoría de los compuestos separados por este método se encuentran presente en ambos cultivares, y que el cultivar 'Carmolí' (rojo) presentó mayores concentraciones para cada uno de los compuestos (Figura 5.18). De los 12 peaks, 4 correspondieron a compuestos de tipo ácidos fenólicos, 7 a flavonoides, y uno quedó sin clasificar. El peak adicional, obtenido para las muestras del cultivar 'Carmolí', correspondió a una mezcla de 3 antocianinas (Figura 5.19).

Para este ensayo, se observó que para el cultivar 'Levistro' de los 4 ácidos fenólicos cuantificados sólo el peak N° 6 (Figura 5.18), identificado como ácido chicórico (Ribas-Agustí *et al.*, 2010; Santos *et al.*, 2014; Marin *et al.*, 2015), respondió de manera significativa al tratamiento con radiación UV-B, obteniéndose valores de $482 \text{ mg eq ácido clorogénico } 100 \text{ g}^{-1} \text{ MF}$ a una dosis de 21 kJ m^{-2} , una concentración 9,3 % menor con respecto a la del control sin radiación (0 kJ m^{-2}) (Tabla 5.8). Por otro lado, para el mismo cultivar, el peak N° 1 (Figura 5.18) fue identificado como ácido 5-cafeoilquinico (Marin *et al.*, 2015) y presentó concentraciones entre 399 y $433 \text{ mg eq ácido clorogénico } 100 \text{ g}^{-1} \text{ MF}$ (Tabla 5.8). Por su parte los peaks N° 5 y 12 (Figura 5.18) fueron identificados como derivados de ácido clorogénico y alcanzaron concentraciones entre 34,65 y 40,99 y entre 50,11 y 57,60 $\text{mg eq ácido clorogénico } 100 \text{ g}^{-1} \text{ MF}$, respectivamente (Tabla 5.8).

Tabla 5.7. Concentración de fenoles, flavonoides, antocianinas totales y capacidad antioxidante para lechugas Lollo Bionda cv. ‘Levistro’ y Lollo Rosso cv. ‘Carmolí’ cultivadas con diferentes dosis acumuladas de radiación UV-B.

| Tratamiento UV-B (kJ m ⁻²) | Fenoles totales | | | | Flavonoides totales | | | | Antocianinas | | Capacidad antioxidante | | | | | | | |
|--|--------------------|------|----------------------|-------|---------------------|------|---------------------|------|--------------|-----|------------------------|-----|--------------------|------|-------|-----|-------|------|
| | ‘Levistro’ | | ‘Carmolí’ | | ‘Levistro’ | | ‘Carmolí’ | | ‘Carmolí’ | | FRAP | | | | DPPH | | | |
| | Media | EE | Media | EE | Media | EE | Media | EE | Media | EE | Media | EE | Media | EE | Media | EE | Media | EE |
| 0 | 343,8 ^b | 1,1 | 2496,8 ^{ab} | 42,1 | 329,4 ^{ab} | 9,1 | 1135,4 ^a | 29,5 | 3,2 | 0,2 | 105,3 ^b | 4,3 | 505,1 ^a | 13,5 | 109,7 | 3,6 | 541,8 | 47,6 |
| 10,5 | 411,2 ^a | 30,2 | 2598,4 ^a | 141,8 | 362,3 ^a | 12,6 | 1078,1 ^a | 36,1 | 3,5 | 0,2 | 120,9 ^a | 3,5 | 510,6 ^a | 16,7 | 122,7 | 5,6 | 524,7 | 52,2 |
| 21 | 336,4 ^b | 19,5 | 2309,0 ^b | 119,3 | 318,2 ^b | 16,1 | 992,0 ^b | 35,7 | 2,9 | 0,2 | 101,8 ^b | 8,2 | 434,7 ^b | 24,7 | 109,2 | 7,1 | 544,6 | 57,8 |
| valor <i>p</i> | * | | * | | * | | ** | | ns | | * | | * | | ns | | ns | |

En la tabla se muestra la concentración de fenoles totales (mg EAG 100 g⁻¹ MF), flavonoides (mg eq rut 100 g⁻¹ MF), antocianinas (mg eq cian3gluc 100 g⁻¹ MF) y capacidad antioxidante medida por los métodos de FRAP (mg eq Trolox 100 g⁻¹ MF) y DPPH (mg eq Trolox 100 g⁻¹ MF) para lechugas Lollo Bionda cv. ‘Levistro’ y Lollo Rosso cv. ‘Carmolí’ cultivadas con diferentes dosis acumuladas de radiación UV-B (kJ m⁻²). Valores medios y error estándar (EE) de 9 datos para cada dosis acumulada de radiación UV-B. EAG: equivalentes de ácido gálico; eq rut: equivalentes de rutina; eq cian3gluc equivalentes de cianidina 3-glicósido; eq Trolox: equivalentes de Trolox; MF: Masa fresca. ^{a,b} Letras diferentes corresponden a diferencias significativas determinadas por la prueba de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher con un nivel de significancia de $p < 0,05$. ns: no significante; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$.

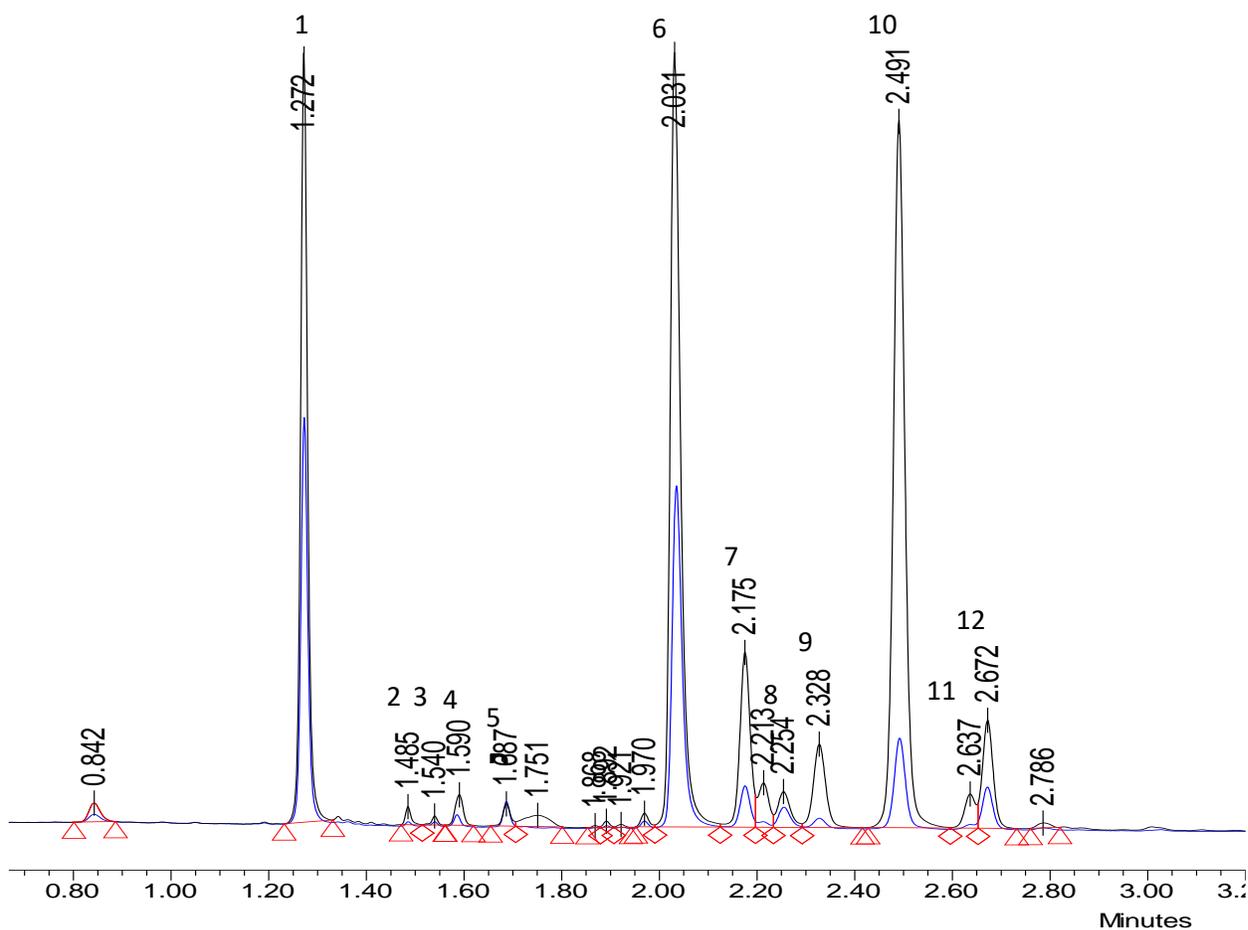


Figura 5.18. Cromatograma comparativo para lechugas Lollo Bionda cv. 'Levistro' y Lollo Rosso cv. 'Carmolí'.

Cromatograma visto a 350nm. El cromatograma muestra los peak correspondientes a los compuestos fenólicos presente en extractos de lechugas Lollo Bionda cv. 'Levistro' (azul) y Lollo Rosso cv. 'Carmolí' (negro). Los números sobre cada peak indican el orden de salida de los compuestos presente en lechuga. Números en posición vertical muestran los tiempos de retención de cada peak. Peak N° 1: Ácido 5-cafeoilquinico; N° 2, 3, 7, 8, 11: Derivados de quercetina; N° 4: No identificado; N° 5, 12: Derivado de ácido clorogénico; N° 6: Ácido chicórico; N° 9; Luteolina-3-O-glucuronido; N° 10: Quercetina 3-O-(6''-O-malonil)-glucósido; N° 13: Antocianinas. Este peak se indica con un asterisco (*) ya que es un peak que sólo aparece en las lechugas tipo Lollo Rosso cv. 'Carmolí'.

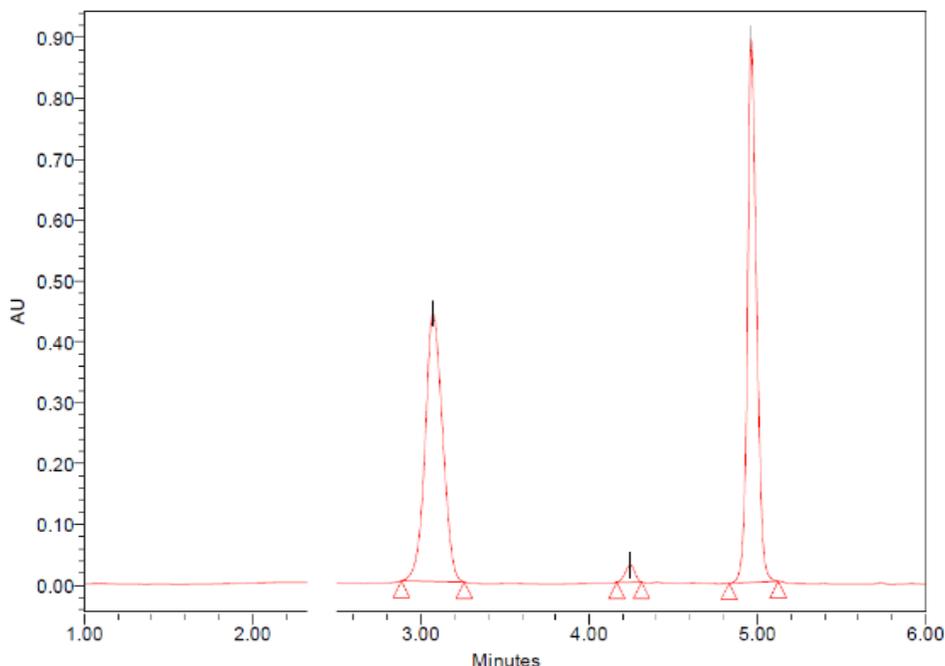


Figura 5.19. Cromatograma de antocianinas presente en lechugas Lollo Rosso 'Carmolí'.

Cromatograma visto a 499 nm. El cromatograma muestra los peak correspondientes a las antocianinas presente en extractos de lechuga tipo Lollo Rosso cv. 'Carmolí'. Los números sobre cada peak indican el orden de salida de los compuestos presentes en este cultivar de lechuga. En el eje 'x' se muestran los tiempos de retención y en el eje 'y' la abundancia relativa de cada una de las antocianinas encontradas. Peak N° 1: cianidina 3-O-glicosido; Peak N° 2: Cianidina 3-O-(3''-O-malonil) glicósido o cianidina-3-O-(6''-O-acetil) glicósido; Peak N° 3: Cianidina 3-O-(6''-O malonil)-glicósido.

Para el cultivar 'Levistro' se cuantificaron tres compuestos de tipo flavonoide, los peaks números 7, 9 y 10 (Figura 5.18). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en la concentración de estos compuestos en respuesta a la aplicación de radiación UV-B (Tabla 5.9). El peak N° 10 (Figura 5.18) identificado como quercetina 3-O-(6''-O-malonil)-glucósido (Santos *et al.*, 2014; Marin *et al.*, 2015) fue el flavonoide que registró las mayores concentraciones, presentando entre 39,68 y 50,38 mg eq rutina 100g⁻¹ MF (Tabla 5.9). Por su parte, el peak N° 7, identificado como un derivado de quercetina alcanzó concentraciones entre 21,41 y 23,56 mg eq rutina 100g⁻¹ MF, siendo el segundo flavonoide más abundante en este cultivar de lechugas. Finalmente, el peak N° 9 (Figura 5.18) fue identificado como luteolina-3-O-glucuronido (Barbosa *et al.*, 2013; Marin *et al.*, 2015) y registró dosis entre 0,97 y 1,35 mg eq rutina 100g⁻¹ MF. Si bien no hubo diferencias significativas las mayores concentraciones de Quercetina 3-O-(6''-O-malonil)-glucósido fueron alcanzadas a dosis de radiación UV-B de 10,5 kJ m⁻². Lo anterior sugiere que la síntesis de ácidos fenólicos y flavonoides se vio incrementada a una dosis de 10,5 kJ m⁻² de radiación UV-B y que a dosis más elevadas como 21 kJ m⁻² podrían llevar a la degradación de estos compuestos, ya sea como una respuesta para mitigar el estrés causado por la alta exposición a la radiación UV-B (Jenkins, 2009), o debido a una reducción en su síntesis como consecuencia de posibles daños a nivel celular (Coffey *et al.*, 2017).

Tabla 5.8. Concentración de ácidos fenólicos, obtenida por UPLC, para lechuga Lollo Bionda cv. 'Levistro' cultivada con diferentes dosis acumuladas de radiación UV-B.

| Tratamiento UV-B (kJ m ⁻²) | Peak N° 7 | | Peak N° 9 | | Peak N° 10 | |
|--|---|-----|---------------------------|-----|---|-----|
| | Derivado de quercetina | | Luteolina-3-O-glucuronido | | Quercetina 3-O-(6"-O-malonil)-glucósido | |
| | -----mg eq rutina 100 g ⁻¹ MF----- | | | | | |
| | Media | EE | Media | EE | Media | EE |
| 0 | 21,4 | 1,7 | 1,0 | 0,9 | 39,7 | 5,5 |
| 10,5 | 23,6 | 3,8 | 1,0 | 0,8 | 50,4 | 4,9 |
| 21 | 22,4 | 2,0 | 1,4 | 0,9 | 42,4 | 5,3 |
| valor p | ns | | ns | | ns | |

En la tabla se presenta la concentración, determinada por UPLC, de 4 ácidos fenólicos presentes en lechuga Lollo Bionda cv. 'Levistro' cultivada con diferentes dosis acumuladas de radiación UV-B (kJ m⁻²). Los ácidos fenólicos fueron identificados por tiempo de retención, espectro de absorción y abundancia relativa en lechuga. Los valores representan medias y error estándar (EE) de 9 datos expresados en mg eq ácido clorogénico 100 g⁻¹ MF. ^{a,b} Letras diferentes corresponden a diferencias significativas determinadas por la prueba de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher con un nivel de significancia de $p < 0,05$. ns: no significativo; **: $p < 0,01$.

La concentración de ácidos fenólicos presentes en el cultivar 'Carmolí' no presentó diferencias significativas producto de la aplicación de radiación UV-B (Tabla 5.10). Sin embargo, presentó los mismos ácidos fenólicos que el cultivar 'Levistro'. Para el caso del ácido chicórico el cultivar 'Carmolí' presentó concentraciones entre 1.492,61 y 1.550,17 mg eq ácido clorogénico 100 g⁻¹ MF (Tabla 5.10). El ácido 5-cafeoilquinico registró concentraciones entre 809,29 y 984,51 mg eq ácido clorogénico 100 g⁻¹ MF y los peaks 12 y 5, derivados de ácido clorogénico, presentaron entre 116,57 y 179,99 y entre 23,78 y 28,48 mg eq ácido clorogénico 100 g⁻¹ MF, respectivamente (Tabla 5.10).

Tabla 5.9. Concentración de flavonoides, obtenida por UPLC, para lechuga Lollo Bionda cv. 'Levistro' cultivada con diferentes dosis acumuladas de radiación UV-B.

| Tratamiento UV-B (kJ m ⁻²) | Peak N° 1 | | Peak N° 5 | | Peak N° 6 | | Peak N° 12 | |
|--|--|------|-------------------------------|-----|--------------------|------|-------------------------------|-----|
| | Ácido 5-cafeoilquinico | | Derivado de ácido clorogénico | | Ácido chicórico | | Derivado de ácido clorogénico | |
| | -----mg eq ácido clorogénico 100 g ⁻¹ MF----- | | | | | | | |
| | Media | EE | Media | EE | Media | EE | Media | EE |
| 0 | 399,4 | 21,2 | 34,6 | 3,5 | 532,3 ^a | 9,0 | 53,2 | 5,2 |
| 10,5 | 415,2 | 24,9 | 41,0 | 5,5 | 543,0 ^a | 14,0 | 57,6 | 2,5 |
| 21 | 433,3 | 26,1 | 38,6 | 3,7 | 482,9 ^b | 15,6 | 50,1 | 3,0 |
| valor p | ns | | ns | | ** | | ns | |

En la tabla se presenta la concentración, determinada por UPLC, de 3 compuestos tipo flavonoides presentes en lechuga Lollo Bionda cv. 'Levistro' cultivadas con diferentes dosis acumuladas de radiación UV-B (kJ m⁻²). Los flavonoides fueron identificados por tiempo de retención, espectro de absorción y abundancia relativa en lechuga. Valores representan medias y error estándar (EE) de 9 datos expresados en mg eq rutina 100 g⁻¹ MF. ns: no significativo.

Por otro lado, para los 5 flavonoides cuantificados para el cultivar 'Carmolí' no se observaron diferencias significativas producto del tratamiento por radiación UV-B. Los peaks N° 7, 8 y 11 (Figura 5.18), derivados de quercetina, presentaron valores en los rangos 124,03 y 138,24; 30,71 y 44,08; 11,66 y 13,04 mg eq rutina 100 g⁻¹ MF, respectivamente (Tabla 5.11). Por su parte, la luteolina 3-O-glucoronido presentó concentraciones entre 94,57 y 112,51 mg eq rutina 100 g⁻¹ MF, mientras que la quercetina 3-O-(6''-O-malonil)-glucósido registró las mayores concentraciones, presentando un rango entre 377 y 413 mg eq rutina 100 g⁻¹ MF (Tabla 5.11).

Tabla 5.10. Concentración de ácidos fenólicos, obtenida por UPLC, para lechuga Lollo Rosso cv. 'Carmolí' cultivada con diferentes dosis acumuladas de radiación UVB.

| Tratamiento UV-B (kJ m ⁻²) | Peak N° 1 | | Peak N° 5 | | Peak N° 6 | | Peak N° 12 | |
|--|--|------|-------------------------------|-----|-----------------|------|-------------------------------|------|
| | Ácido 5-cafeoilquinico | | Derivado de ácido clorogénico | | Ácido chicórico | | Derivado de ácido clorogénico | |
| | -----mg eq ácido clorogénico 100 g ⁻¹ MF----- | | | | | | | |
| | Media | EE | Media | EE | Media | EE | Media | EE |
| 0 | 984,5 | 72,4 | 23,8 | 1,5 | 1504,4 | 56,4 | 171,0 | 23,2 |
| 10,5 | 913,5 | 83,6 | 26,0 | 1,7 | 1550,2 | 71,5 | 133,8 | 23,2 |
| 21 | 809,3 | 75,2 | 28,5 | 1,4 | 1492,6 | 30,2 | 116,6 | 8,4 |
| valor p | ns | | ns | | ns | | ns | |

En la tabla se presenta la concentración, determinada por UPLC, de 4 ácidos fenólicos presentes en lechuga Lollo Rosso cv. 'Carmolí' cultivadas con diferentes dosis acumuladas de radiación UV-B (kJ m⁻²). Los ácidos fenólicos fueron identificados por tiempo de retención, espectro de absorción y abundancia relativa en lechuga. Valores representan medias y error estándar (EE) de 9 datos expresados en mg eq ácido clorogénico 100 g⁻¹ MF. ns: no significativo.

Tabla 5.11. Concentración de flavonoides obtenida por UPLC, para lechuga Lollo Rosso cv. 'Carmolí' cultivada con diferente dosis acumulada de radiación UV-B.

| Tratamiento UV-B (kJ m ⁻²) | Peak N° 7 | | Peak N° 8 | | Peak N° 9 | | Peak N° 10 | | Peak N° 11 | |
|--|--|-----|------------------------|-----|---------------------------|------|--|------|------------------------|-----|
| | Derivado de quercetina | | Derivado de quercetina | | Luteolina-3-O-glucuronido | | Quercetina 3-O-(6''-O-malonil)-glucósido | | Derivado de quercetina | |
| | -----mg eq rutina 100g ⁻¹ MF----- | | | | | | | | | |
| | Media | EE | Media | EE | Media | EE | Media | EE | Media | EE |
| 0 | 124,0 | 7,8 | 30,7 | 4,2 | 94,6 | 7,7 | 377,3 | 11,6 | 11,7 | 0,7 |
| 10,5 | 138,2 | 6,9 | 44,0 | 3,8 | 112,5 | 10,7 | 413,4 | 19,0 | 13,0 | 1,1 |
| 21 | 128,5 | 5,2 | 38,4 | 2,9 | 98,8 | 9,5 | 387,6 | 19,3 | 12,1 | 1,0 |
| valor p | ns | | ns | | ns | | ns | | ns | |

En la tabla se presenta el efecto de suplementación con radiación UV-B (kJ m⁻²) sobre la concentración, determinada por UPLC, de 5 compuestos tipo flavonoides presentes en lechuga Lollo Rosso cv. 'Carmolí'. Los flavonoides fueron identificados por tiempo de retención, espectro de absorción y abundancia relativa en lechuga. Valores representan medias y error estándar (EE) de 9 datos expresados en mg eq rutina 100g⁻¹ MF. ns: no significativo.

5.3.3.5.- Concentración de antocianinas en lechugas tipo Lollo Rosso cultivadas con diferentes dosis de radiación UV-B

Se logró la identificación de dos de las tres antocianinas presente en lechuga tipo Lollo Rosso cv 'Carmolí' (Figura 5.19). Sin embargo, estas no presentaron variaciones significativas en la concentración en respuesta a la aplicación de radiación UV-B.

El peak N° 1 de la figura 5.19 correspondió a cianidina 3-O-glicosido (Blackhall *et al.*, 2018) y registró una concentración entre 12,0 y 16,6 mg eq cian3gluc 100 g⁻¹ MF. Por su parte, el peak N° 3 de la figura 5.19 fue identificado como cianidina 3-O-(6''-O malonil)-glicósido, compuesto que según Viacava *et al.*, (2017), corresponde a la antocianina más abundante en lechugas de variedades rojas. Esta antocianina, registró concentraciones 14,1 y 17,1 mg eq cian3gluc 100 g⁻¹ MF (Tabla 5.12). Finalmente, el segundo peak podría corresponder a cianidina 3-O-(3''-O-malonil) glicósido o bien a cianidina-3-O-(6''-O-acetil) glicósido, antocianinas encontradas por Viacava *et al.* (2017) en lechugas hoja de roble de coloración roja.

Tabla 5.12. Concentración de antocianinas obtenida por UPLC, para lechuga Lollo Rosso cv. 'Carmolí' cultivadas con diferentes dosis acumuladas de radiación UV-B.

| Tratamiento UV-B (kJ m ⁻²) | Antocianina N° 1 | | Antocianina N° 3 | |
|--|--|-----|---|-----|
| | cianidina 3-O-glicosido | | cianidina 3-O-(6''-O malonil)-glicósido | |
| | -----mg eq cian3gluc 100 g ⁻¹ MF----- | | | |
| | Media | EE | Media | EE |
| 0 | 12,0 | 3,3 | 14,1 | 4,5 |
| 10,5 | 13,7 | 4,6 | 15,1 | 5,6 |
| 21 | 16,6 | 6,2 | 17,1 | 6,2 |
| valor p | ns | | ns | |

En la tabla se presenta la concentración, determinada por UPLC, de 2 antocianinas presentes en lechuga Lollo Rosso cv. 'Carmolí' cultivadas con diferentes dosis acumuladas de radiación UV-B (kJ m⁻²). Las antocianinas fueron identificadas por tiempo de retención, espectro de absorción y abundancia relativa en lechuga. Valores representan medias y error estándar (EE) de 9 datos expresados en mg eq cian3gluc 100 g⁻¹ MF. ns: no significativo.

5.3.4.- Conclusiones

Los resultados de este estudio revelaron diferencias significativas en el tamaño y la masa fresca entre las lechugas tipo Lollo Bionda cv. 'Levistro' y Lollo Rosso cv. 'Carmolí', sin embargo, la suplementación con radiación UV-B no tuvo un efecto significativo en el rendimiento de lechugas 'Levistro', mientras que las lechugas 'Carmolí' mostraron una ligera reducción en su tamaño producto de la radiación, pero independiente de la dosis.

La suplementación con radiación UV-B resultó en cambios significativos en la concentración de fenoles totales y flavonoides en los cultivares de lechuga 'Levistro' y 'Carmolí'. La dosis de 10,5 kJ m⁻² mostró la mayor concentración de fenoles totales y flavonoides en ambos cultivares. Sin embargo, a dosis más elevadas se observó una disminución en la concentración de compuestos fenólicos, lo que sugiere la posible degradación de estos compuestos como un mecanismo de defensa de la planta para contrarrestar el estrés causado por un exceso de radiación UV-B.

En cuanto a los ácidos fenólicos y flavonoides específicos, sólo el ácido chicórico presente en el cultivar 'Levistro' presentó una disminución significativa del 9,3 %, con respecto al control, a una dosis de 21 kJ m⁻². No se encontraron diferencias significativas en la concentración de otros ácidos fenólicos o en la concentración de flavonoides producto de la radiación UV-B ni para el cultivar 'Levistro' ni 'Carmolí'.

Lo anterior sugiere que la síntesis de compuestos fenólicos y flavonoides en ambos cultivares fue estimulada a dosis moderadas de radiación UV-B, pero se degradaron a dosis más altas, posiblemente como una respuesta defensiva al estrés inducido por la radiación UV-B. Las variaciones y diferencias entre cultivares resaltan la importancia de considerar las características específicas de cada cultivar al implementar prácticas de cultivo en entornos con exposición a radiación UV-B.

5.3.5.- Bibliografía

Ainsworth, E.A., and Gillespie, K. M., 2007. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent. *Nat. Protoc.* 2, 875– 877. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.102>

Aksakal, O., Tabay, D., Esringu, A., Icoğlu Aksakal, F., Esim, N. 2016. Effect of Proline on Biochemical and Molecular Mechanism in Lettuce (*Lactuca sativa* L.) Exposed to UV-B radiation. *Photochem. Photobiol. Sci.* 16, 246–254. <https://doi.org/10.1039/C6PP00412A>

Bandurska, H., Niedziela, J., Chadzinikolau., T., 2013. Separate and combined responses to water deficit and UV-B radiation. *Plant Sci.* 213, 98-105. <http://dx.doi.org/10.1016/j.plantsci.2013.09.003>

Barbosa da Silva, J., dos Santos Temponi, V., Miranda Gasparetto, C., Luiz Fabri, R., de Oliveira Aragão, D.M., de Castro Campos Pinto, N., Ribeiro, A., Scio, E., Del-Vechio-Vieira, G., Vieira de Sousa, O., Alves, M.S. 2013. *Vernonia condensata* Baker (Asteraceae): A Promising Source of Antioxidants. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2013. 698018. <https://doi.org/10.1155/2013/698018>

Blackhall, M., Berry, R., Davies, N., Walls, J. 2018. Optimized extraction of anthocyanins from Reid Fruits' *Prunus avium* 'Lapins' cherries. *Food chem.* 256, 280–285. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.02.137>

Benzie, I.F. and Strain, J.J., 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of 'antioxidant power': The FRAP assay. *Anal. Biochem.* 239, 70–76. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>

Blackhall, M., Berry, R., Davies, N., Walls, J. 2018. Optimized extraction of anthocyanins from Reid Fruits' *Prunus avium* 'Lapins' cherries. *Food chem.* 256, 280–285. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.02.137>

Brown, B.A., Cloix, C., Jiang, G.H., Kaiserli, E., Herzyk, P., Kliebenstein, D.J.; Jenkins, G.I. (2005). A UV-B-specific signaling component orchestrates plant UV protection. *PNAS* 102, 18225–18230. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0507187102

Coffey, A., Prinsen, E., Jansen, M.A.K., Conway, J. 2017. The UVB photoreceptor UVR8 mediates accumulation of UV absorbing pigments, but not changes in plant morphology, under outdoor conditions. *Plant Cell. Environ.* 40, 2250–2260. <https://doi.org/10.1111/pce.13025>

Di Rienzo, J.A., Casanoves, F., Balzarini, M.G., Gonzalez, L., Tablada, M., and Robledo, C.W. InfoStat versión., 2017. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. Available at <http://www.infostat.com.ar>

Dannehl, D., & Josuttis, M. 2014. Cultivar and production effects on bioactive polyphenols. In R.R. Watson (Ed.), *Polyphenols in Plants, Isolation, Purification and Extract Preparation* (1st ed., pp. 3-13). *Academic Press.* <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397934-6.00001-2>

Du, W.X., Avena-Bustillos, R., Breksa, A., McHugh, T., 2014. UV-B light as a factor affecting total soluble phenolic contents of various whole and fresh-cut specialty crops. *Postharvest Biol. Technol.* 93, 72-82. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2014.02.004>

Ebisawa M, Shoji K, Kato M, Shimomura K, Goto F, Yoshihara T, 2008. Supplementary ultraviolet radiation B together with blue light at night increased quercetin content and flavonol synthase gene expression in leaf lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Environ. Control Biol.* 46, 1-11. <https://doi.org/10.2525/ecb.46.1>

Eichholz, I., Rohn, S., Gamm, A., Beesk, N., Herppich, W.B., Kroh, L.W., 2012. UV-B-mediated flavonoid synthesis in white asparagus (*Asparagus officinalis* L.). *FoodRes. Int.* 48, 196–201. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.03.008>

Frohnmeier, H., Staiger, D. 2003. Ultraviolet-B Radiation-Mediated Responses in Plants. Balancing Damage and Protection. *Plant Physiol.* 133, 1420–1428. www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.103.030049

- Galieni, A., Di Mattia, C., De Gregorio, M., Specca, S., Mastrocola, D., Pisante, M., Stagnari, F., 2015. Effects of nutrient deficiency and abiotic environmental stresses on yield, phenolic compounds, and antiradical activity in lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Sci. Hort.* 187, 93-101. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.02.036>
- Gupta, S., Prakash, J., 2009. Studies on Indian Green Leafy Vegetables for Their Antioxidant Activity. *Plant Foods Hum. Nutr.* 64, 39-45. <https://doi.org/10.1007/s11130-008-0096-6>
- Hawrylak-Nowak, B., Dresler, S., Stasinska-Jakubas, M., Wójciak, M., Sowa, I., Matraszek Gawron, R. 2021. NaCl-Induced Elicitation Alters Physiology and Increases Accumulation of Phenolic Compounds in *Melissa officinalis* L. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 6844. <https://doi.org/10.3390/ijms22136844>.
- Huché-Théliér, L., Crespel, L., Le Gourrierc, J., Morel, P., Sakr, S., Leduc, N. 2016. Light signaling and plant responses to blue and UV radiations-perspectives for applications in horticulture. *Environ. Exper. Bot.* 121, 22-38. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envexpbot.2015.06.009>
- Jansen, M., Hectors, K., O'Brien, N., Guisez, Y., Potters, G. 2008. Plant stress and human health: Do human consumers benefit from UV-B acclimated crops? *Plant Sci.* 175, 449–458. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2008.04.010>
- Jenkins, G. 2009. Signal Transduction in Responses to UV-B Radiation. *Annu. Rev. Plant Biol.* 60, 407–31. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092953>
- Kakani, V.G., Reddy, K.R., Zhao, D., and Sailaja, K. 2003. Field crop responses to ultraviolet-B radiation: a review. *Agricult. Forest Meterol.* 120, 191–218 <https://doi.org/10.1016/j.agrformet.2003.08.015>
- Krizek, D. 2004. Influence of PAR and UV-A in Determining Plant Sensitivity and Photomorphogenic Responses to UV-B Radiation. *Photochem. Photobiol.* 79, 307-315. <https://doi.org/10.1562/2004-01-27-ir.1>
- Kumari, P., Panwar, S., Thaneshwari, T., Kaushal, P. 2017. Pigment Profiling of Flower Crops: A Review. *Eco. Env. & Cons.* 23, 1000-1008. https://www.researchgate.net/publication/337151834_Pigment_Profiling_of_Flower_Crops_A_Review
- Marin, A., Ferres, F., Barberá, G.G., Gil, M.I. 2015. Weather Variability Influences Color and Phenolic Content of Pigmented Baby Leaf Lettuces throughout the Season. *J. Agric. Food Chem.* 63, 1673–1681. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b00120>
- McGuire, R. 1992. Reporting of objective color measurements. *HortScience* 27, 1254-1255. <https://doi.org/10.21273/hortsci.27.12.1254>
- Morales, L., Brosché, M., Vainonen, J., Jenkins, G., Wargent, J., Sipari, N., Strid, A., Lindfors, A., Tegelberg, R., Aphalo, P. 2013. Multiple Roles for UV RESISTANCE LOCUS8 in Regulating Gene Expression and Metabolite Accumulation in Arabidopsis under Solar Ultraviolet Radiation. *Plant Physiol.* 161, 744–759 www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.112.211375
- Nocchi, N., Monteiro, H., Crespo, R., Ungaretti, T., Ribeiro, A. 2020. Effects of UV-B radiation on secondary metabolite production, antioxidant activity, photosynthesis, and herbivory interactions in *Nymphoides humboldtiana* (Menyanthaceae). *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 212, 112021. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2020.112021>
- Park, J.S.; Chung, M.G.; Kim, J.B.; Hahn, B.S.; Kim, J.B.; Bae, S.C.; Roh, K.H.; Kim, Y.H.; Cheon, C.I.; Sung, M.K. 2007. Genes up-regulated during red coloration in UV-B irradiated lettuce leaves. *Plant Cell Rep.*, 26, 507–516. <https://doi.org/10.1007/s00299-006-0255-x>
- Parihar, P., Singh, S., Singh, R., Singh, V. P., Prasad, S. M. 2015. Changing scenario in plant UV-B research: UV-B from a generic stressor to a specific regulator. *J. Photochem. Photobiol. B, Biol.* 153, 33-343. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2015.10.004>
- Ribas-Agustí, A., Gratacós-Cubarsí, M., Sárraga, C., García-Regueiro, J.A., Castellari, M. 2010. Analysis of eleven phenolic compounds including novel p-coumaroyl derivatives in lettuce (*Lactuca*

sativa L.) by ultra-high-performance Liquid chromatography with photodiode array and mass spectrometry detection. *Phytochem. Anal.* 22, 555–563. <https://doi.org/10.1002/pca.1318>

Romani, A., Pinelli, P., Galardi, C., Sani, G., Cimato, A., and Heimler, D. 2002. Polyphenols in greenhouse and open-air-grown lettuce. *Food Chem.* 79, 337-342. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00170-X](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00170-X)

Santos, J., Oliveira, M.B.P.P., Ibáñez, E., Herrero, M. 2014. Phenolic profile evolution of different ready-to-eat baby-leaf vegetables during storage. *J. Chromatogr. A.* 1327, 118– 131. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2013.12.085>

Tharasena, B., Lawan, S., 2014. Phenolics, flavonoids and antioxidant activity of vegetables as Thai side dish. *APCBEE Procedia* 8, 99–104. <https://doi.org/10.1016/j.apcbee.2014.03.008>

Tsormpatsidis, E., Henbest, RGC., Davis, NH., Hadley, P., Wagstaffe, A. 2008. UV irradiance as a major influence on growth, development, and secondary products of commercial importance in Lollo Rosso lettuce ‘Revolution’ grown under polyethylene films. *Environ. Exp. Bot.* 63; 232–239. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2007.12.002>

Xu., C., Natarajan, S., Sullian., JH. 2008. Impact of solar ultraviolet-B radiation on the antioxidant defense system in soybean lines differing in flavonoid contents. *Environ. Exp. Bot.* 63, 39–48. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2007.10.029>

Zhao, X., Carey, E., Young, J., Wang, W., Iwamoto, T., 2007. Influences of organic fertilization, high tunnel environment, and postharvest storage on phenolic compounds in lettuce. *HortScience* 42, 71–76. <http://hortsci.ashspublications.org/content/42/1/71.full>

5.4.- Efecto del uso de estrategias de postcosecha que involucran bajas temperaturas en combinación con una concentración de gases con bajo O₂ y moderado CO₂, en la concentración de compuestos fenólicos lechugas tipo Lollo Bionda cv. 'Levistro' y Lollo Rosso cv. 'Carmolí' las cuales fueron tratadas con radiación UV-B durante su cultivo

5.4.1.- Introducción

El uso de bajas temperaturas durante el almacenamiento postcosecha es la principal estrategia para extender la vida útil y preservar la calidad de los alimentos (Saini *et al.*, 2016; Meitha *et al.*, 2020). Las bajas temperaturas ayudan a retardar el metabolismo y la respiración de los productos agrícolas, reduciendo la velocidad de los procesos asociados a la senescencia y como consecuencia, prolongando su vida útil (Meitha *et al.*, 2020). Adicionalmente, las bajas temperaturas inhiben el crecimiento de microorganismos y reducen la actividad enzimática, minimizando la descomposición de la clorofila y el deterioro de las membranas (Jiang *et al.*, 2010; Guo *et al.*, 2019; Meitha *et al.*, 2020). Así, esta estrategia contribuye a mantener parámetros de calidad sensorial, como el color, textura y sabor, así como también los valores nutricionales y funcionales de los productos hortícolas (Jiang *et al.*, 2010; Saini *et al.*, 2016; Meitha *et al.*, 2020). Si bien esta tecnología es ampliamente usada en lechugas, la respuesta a la baja temperatura puede variar según la variedad (Lafarga *et al.*, 2020).

Por otro lado, la tecnología de envases con atmósfera modificada (EAM) es una herramienta postcosecha que busca extender la vida útil del producto hortofrutícola mediante su almacenamiento a concentraciones de O₂ y CO₂ diferentes a las del aire (20 % O₂ y 0,03 % CO₂) (De Corato, 2019). Estas modificaciones en las concentraciones de O₂ y CO₂, normalmente de 2 a 5 % CO₂ y de 2 a 5 % O₂ logran prolongar la vida postcosecha de las hortalizas frescas debido a que provoca una reducción en la tasa de respiración, biosíntesis de etileno, pérdida de agua, oxidación fenólica y recuento microbiano, ralentizando los procesos de madurez y senescencia (Ghidelli y Pérez-Gago, 2016; De Corato, 2019; Guo *et al.*, 2019).

Para la aplicación de la tecnología de atmósfera modificada el producto hortofrutícola debe ser puesto dentro de un envase plástico cerrado, normalmente de polietileno o polipropileno con una permeabilidad específica a los gases (O₂ y CO₂) que depende del tipo de plástico y su espesor (Bastarrachea *et al.*, 2011). En el interior del envase, como resultado del proceso de respiración del producto hortofrutícola, se produce una disminución en la concentración de oxígeno y un aumento en las de dióxido de carbono y cuyo estado estacionario de equilibrio se alcanza cuando la cantidad de O₂ consumido y de CO₂ producido por el producto dentro del envase es igual a la cantidad de O₂ y CO₂ que permite permear el plástico (Ghidelli y Pérez-Gago, 2016; De Corato, 2019).

Cabe destacar que las atmósferas modificadas se pueden conseguir de forma pasiva o activa. El proceso de obtención de una atmósfera modificada pasiva se basa en alcanzar el estado de equilibrio entre la respiración del producto y la permeabilidad del envase plástico partiendo de la concentración de gases presente en el aire (20 % O₂ y 0,03 % CO₂) como condición inicial. Por otro lado, la atmósfera modificada activa se consigue desplazando el aire dentro del envase con una mezcla de gases diferente a la del aire como condición inicial, y busca alcanzar la condición de equilibrio en un menor tiempo (Ghidelli y Pérez-Gago, 2016). A pesar de que la tecnología de EAM ha mostrado ser eficaz en retrasar el deterioro de las hortalizas de hoja como la lechuga, la respuesta postcosecha dependen de diversos factores entre ellos: la especie, cultivar y prácticas culturales (Escalona *et al.*, 2006; Martínez-Sánchez *et al.*, 2011; Ghidelli y Pérez-Gago, 2016; Guo *et al.* 2019).

Finalmente, como se comentó en ensayos anteriores, la radiación UV-B puede actuar como un factor de estrés y/o como factor regulador en las plantas (Parihar *et al.*, 2015), desencadenando respuestas bioquímicas y fisiológicas como el aumento de la síntesis de metabolitos secundarios

(Jansen *et al.*, 2008), donde destacan los compuestos fenólicos, específicamente los compuestos de tipo flavonoide (Jansen *et al.*, 2008; Eichholz *et al.*, 2012; Du *et al.*, 2014). La síntesis de estos compuestos está regulada por vías de señalización específicas, activadas por el fotorreceptor UVR8 en respuesta a la radiación UV-B (Brown *et al.*, 2005) y desempeñan un papel importante en la defensa contra el estrés oxidativo (Ebisawa *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2008), reducen la penetración de la radiación en tejidos sensibles (Frohn Meyer y Staiger, 2003; Krizek *et al.*, 2004; Bandurska *et al.*, 2013) y actúan como compuestos antioxidantes al ser incorporados en la dieta. Sin embargo, una gestión inadecuada de la postcosecha puede resultar en un aumento desmedido de las especies reactivas de oxígeno y por tanto en un gasto excesivo de los compuestos antioxidantes de interés presentes en el producto como respuesta a la defensa oxidativa (Meitha *et al.*, 2020).

Debido a lo anterior y con el objetivo de mantener la calidad y concentración de compuestos antioxidantes acumulados durante el cultivo de las lechugas Lollo Bionda cv. "Levistro" y Lollo Rosso cv. "Carmoli" tratadas con diferentes dosis de radiación UV-B y garantizar su llegada al consumidor, se evaluó el comportamiento de la concentración de compuestos fenólicos luego del almacenamiento con estrategias de postcosecha que involucran bajas temperaturas en combinación con una concentración de gases con bajo O₂ y moderado CO₂.

5.4.2- Metodología

5.4.2.1.- Material vegetal y condiciones de cultivo

Como material vegetal se utilizaron lechugas de tipo Lollo Bionda cultivar 'Levistro' (hojas verdes) y de tipo Lollo Rosso cultivar 'Carmoli' (hojas rojas) de la empresa Rijk Zwaan (Chile). La germinación de las semillas de lechuga de ambos cultivares, condiciones de cultivo de los almácigos y trasplante se realizaron como se describe en la sección 4.1. Las características del lugar y condiciones en las que se desarrolló el cultivo corresponden a las descritas en la sección 4.1 durante la temporada de otoño. Las características del invernadero donde se llevó a cabo el cultivo correspondieron a las descritas en la sección 5.2.2.1.

Los dos cultivares de lechuga, 'Levistro' y 'Carmoli' fueron dispuestos en tres bloques con un arreglo de parcelas divididas, donde la parcela principal correspondió a la dosis acumulada de radiación UV-B (0; 10,5; 21 kJ m⁻²), mientras que la subparcela correspondió al cultivar. Cada bloque representó una repetición, por lo que hubo tres sistemas hidropónicos de raíz flotante independientes para cada tratamiento evaluado.

Los tratamientos de radiación UV-B fueron aplicados utilizando 2 lámparas de UV-B de banda ancha TL (Philips, Países Bajos) como se describe en la sección 5.2.2.2. Las tres dosis acumuladas de radiación (0; 10,5 y 21,0 kJ m⁻²) se obtuvieron como se describe en la sección misma sección. Una vez que las lechugas del tratamiento control alcanzaron un tamaño adecuado para la cosecha, luego de 30 días, se cosecharon las plantas completas para su análisis. Con el fin de contar con suficiente material vegetal para el ensayo de postcosecha, las plantas provenientes de las tres repeticiones, correspondientes a un mismo cultivar y tratamiento UV-B, fueron mezcladas.

5.4.2.2.- Mínimo procesamiento en fresco

El material vegetal recién cosechado se llevó a una sala de proceso a 5°C donde las hojas de lechuga fueron recibidas y seleccionadas. Luego de la selección, las hojas fueron sumergidas durante 2 minutos en una solución de hipoclorito de sodio a 100 ppm (Clorox, California, EEUU) a un pH de 6,5 y 5 °C. La concentración del hipoclorito de sodio utilizada fue confirmada con un fotómetro portátil de cloro libre y total HI 96711 (Hanna instruments, Rhode Island, EEUU) según las instrucciones del fabricante y el pH fue ajustado con ácido clorhídrico 37 % (Merck, KGaA, Darmstadt, Alemania) utilizando para ello un medidor de pH multiparámetro Edge, HI2020 (Hanna

instruments, Rhode Island, EE. UU.). Una vez sanitizadas, las hojas de lechugas fueron enjuagadas, durante 1 min, con agua a 5°C para eliminar cualquier resto de hipoclorito de sodio. Luego, fueron centrifugadas durante 1 min con una centrifuga manual para eliminar el agua libre para finalmente envasar 20 g de hojas en bolsas de propileno de 10 x 10 cm cuyas características se detallan en la sección siguiente.

5.4.2.3.- Montaje y diseño experimental

El experimento consistió en un diseño factorial de 2 x 2 x 3 donde el primer factor correspondió a la temperatura de almacenamiento: 5 o 10 °C; el segundo factor a la concentración de gases utilizada para el almacenamiento: aire o barrido de nitrógeno (N₂) y el tercer factor correspondió al tratamiento de radiación UV-B aplicado durante el cultivo (0; 10,5; 21 kJ m⁻²). Cabe destacar que se realizaron mediciones al momento de la cosecha y luego de 3 días de almacenamiento, simulando el periodo que transcurre desde la cosecha hasta que el producto llega al consumidor.

Para el almacenamiento en aire se utilizaron bolsas perforadas de polietileno mientras que para el almacenamiento con atmósfera modificada activa se utilizó una poliolefina (Empack Link, Santiago, Chile) (LLDPE (75 %), PP (25 %); Espesor (μm) 18,9; a la cual se le realizó un barrido de nitrógeno (N₂) (Indura, Santiago, Chile). Una vez envasadas y selladas, las bolsas fueron almacenadas en oscuridad a 5 y 10 °C. Los resultados de este experimento fueron presentados separados por cultivar: 'Levistro' y 'Carmolí'.

5.4.2.4.- Monitoreo concentración de gases dentro de la bolsa

La composición gaseosa del espacio de cabeza (O₂ y CO₂) de las bolsas fue monitoreada durante 3 días utilizando un analizador tipo Dansensor CheckPoint con un sensor de detección electroquímica de celda de cerámica de óxido de circonio para el oxígeno (O₂) y un sensor infrarrojo no dispersivo con compensación de temperatura para la concentración de dióxido de carbono (CO₂) (Ametek Mocon, Minnesota, EE. UU.) según las instrucciones del fabricante. Las muestras de gases fueron obtenidas desde el espacio de cabeza de las bolsas. En cada día de muestreo, se midieron tres envases por cada repetición (n=9) y se tomaron dos mediciones de cada bolsa. La concentración de gases dentro de las bolsas almacenadas a 5°C se presenta en la Figura 5.20, mientras que la composición gaseosa en las bolsas almacenadas a 10 °C se presenta en la Figura 5.21.

5.4.2.5.-Determinación de compuestos funcionales

5.4.2.5.1- Extracción de las fracciones fenólicas

La extracción de los compuestos fenólicos se llevó a cabo siguiendo las recomendaciones de Galieni *et al.* (2015), como se describe en detalle en la sección 4.4.1. El extracto de MeOH: H₂O se almacenó a -20 °C en tubos ámbar hasta la realización de los análisis de compuestos fenólicos totales, flavonoides, antocianinas y actividad antioxidante.

5.4.2.5.2- Determinación de la concentración de fenoles totales

La concentración de fenoles totales (FT) se midió utilizando el método propuesto por Ainsworth y Gillespie (2007), como se describe en detalle en la sección 4.4.2. Los resultados fueron expresados como miligramos equivalentes de ácido gálico por cada 100 gramos masa fresca (mg EAG 100 g⁻¹ MF).

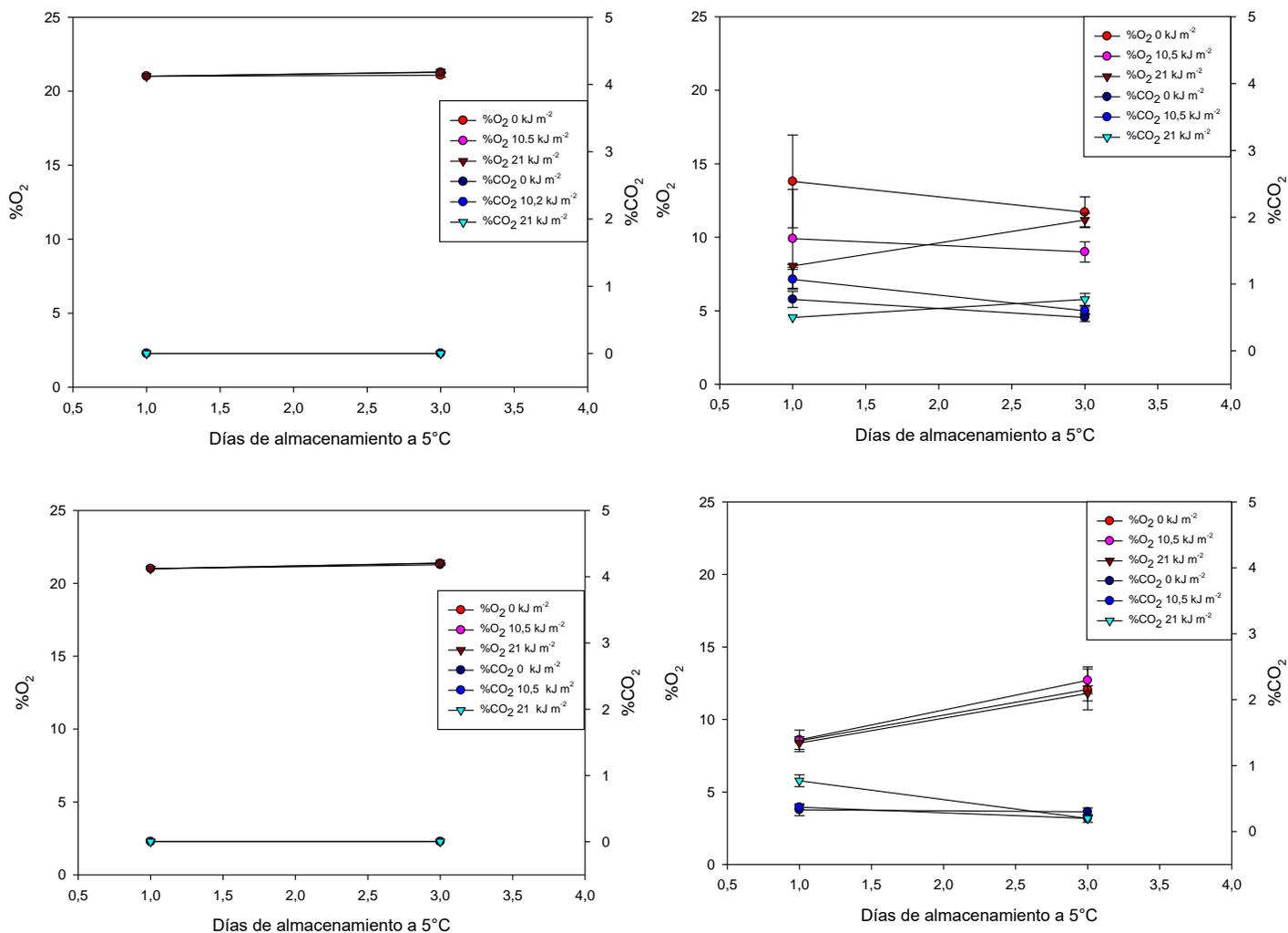


Figura 5.20. Concentración de gases a 5°C dentro de las bolsas de lechugas provenientes de diferentes tratamientos con radiación UV-B.

Las gráficas muestran la concentración de gases (O₂ y CO₂) en % para los tratamientos de aire (A y C) y atmósfera modificada activa, generada por barrido de N₂ (B, D), para lechugas tipo Lollo Bionda cv. 'Levistro' (A, B) y tipo Lollo Rosso cv. 'Carmoli' (C, D), cultivadas con diferentes dosis de radiación UV-B (0; 10,5 y 21,0 kJ m⁻²), durante 6 días de almacenamiento a 5 °C. Puntos representan valores medios ± EE de 3 réplicas biológicas por repetición (n=9).

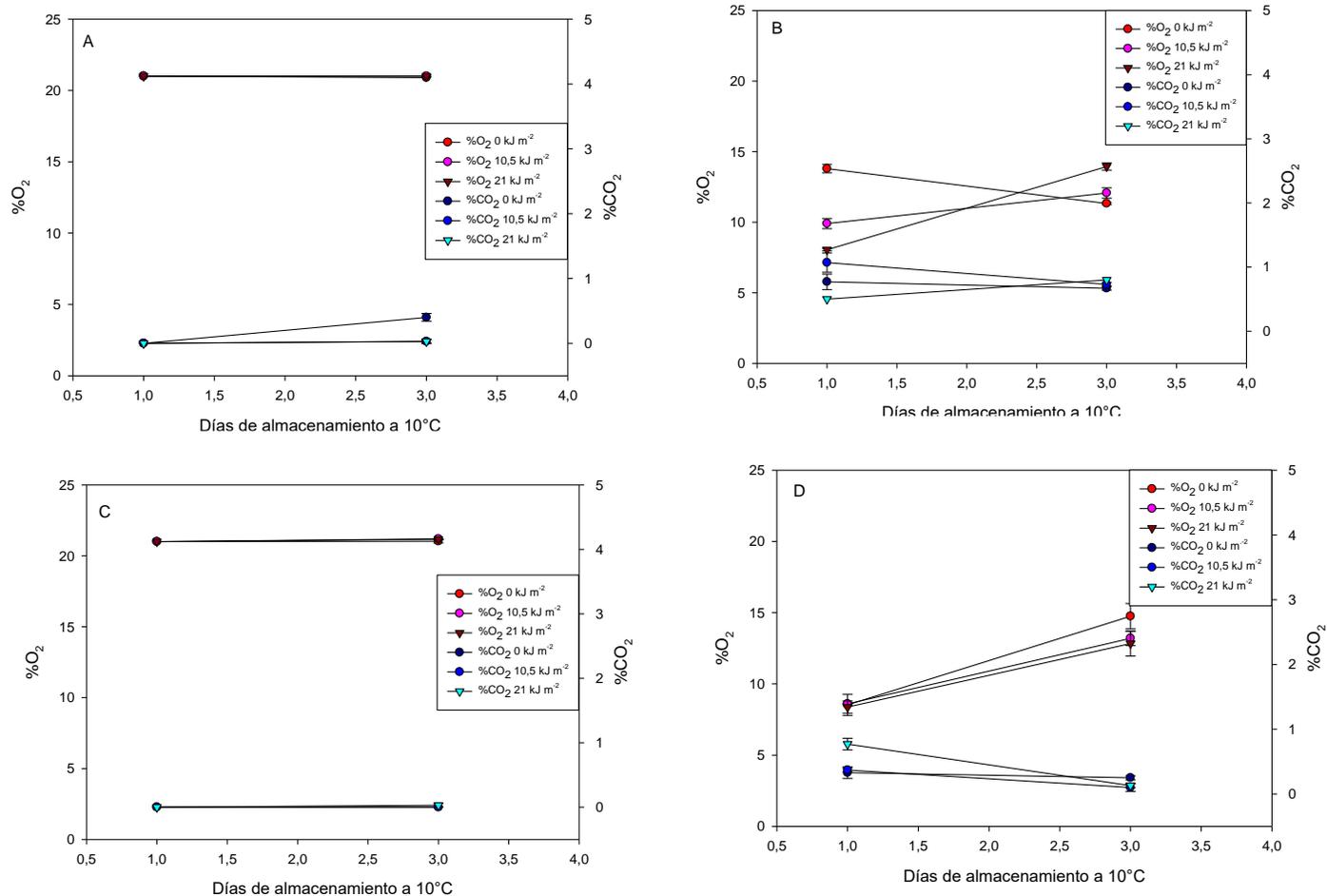


Figura 5.21. Concentración de gases a 10 °C dentro de las bolsas de lechugas provenientes de diferentes tratamientos con radiación UV-

B.

Concentración de gases O₂ y CO₂ en % para los tratamientos de aire (A y C) y atmósfera modificada activa, generada por barrido de N₂ (B, D), para lechugas tipo Lollo Bionda cv. 'Levistro' (A, B) y tipo Lollo Rosso cv. 'Carmolí' (C, D) cultivadas con diferentes dosis de radiación UV-B (0; 10,5 y 21,0 kJ m⁻²), durante 6 días de almacenamiento a 10 °C. Puntos representan valores medios ± EE de 3 réplicas biológicas por repetición (n=9).

5.4.2.5.3.- Determinación de la concentración de flavonoides totales

La concentración de flavonoides totales se midió de acuerdo al método propuesto por Tharasena y Lawan (2014) como se detalla en la sección 5.2.2.5.3. Los resultados fueron expresados como miligramos equivalentes de rutina (eq Rut) en 100 gramos de masa fresca (mg eq Rut 100 g⁻¹ MF).

5.4.2.5.4.- Determinación de la concentración de antocianinas totales

La concentración de antocianinas totales se determinó utilizando el método de pH diferencial siguiendo las recomendaciones de Du *et al.* (2014), como se detalla en la sección 5.2.2.5.4. Los resultados fueron expresados como miligramos equivalentes de cianidina-3-glucósido (eq Cian3gluc) en 100 gramos de masa fresca (mg eq Cian3gluc 100 g⁻¹ MF).

5.4.2.5.5.- Determinación de la capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante (CA) de las diferentes muestras se llevó a cabo mediante dos métodos, descritos en la sección 4.4.3.

5.4.2.5.5.1.- Método de FRAP

El método de FRAP (Ferric reducing antioxidant power) fue realizado de acuerdo con la metodología descrita por Benzie y Strain (1996), como se detalla en la sección 4.4.3.1. Los resultados fueron expresados en miligramos equivalentes de Trolox (eq Trolox) por cada 100 gramos de materia fresca (mg eq Trolox 100 g⁻¹ MF).

5.4.2.5.5.2.- Método de DPPH

El método de DPPH fue realizado según la metodología descrita en Gupta y Prakash (2009) como se detalla en la sección 4.4.3.2. Los resultados fueron expresados como miligramos equivalentes de Trolox (eq Trolox) por cada 100 gramos de materia fresca (mg eq Trolox 100 g⁻¹ MF).

5.4.2.6.- Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando el software InfoStat versión 2017 (Di Rienzo *et al.*, 2017) como se describe en la sección 4.4.4.

5.4.3- Resultados y discusión

5.4.3.1.- Concentración de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante de lechugas a cosecha y luego de tres días de almacenamiento postcosecha

El día de la cosecha, la concentración de fenoles y flavonoides totales en el cultivar 'Levistro' fue significativamente menor cuando las plantas fueron cultivadas con una dosis de radiación de UV-B de 21 kJ m⁻² (Tabla 5.13), presentando un valor de 780,8 mg EAG 100 g⁻¹ MF y 156,2 mg eq rutina 100 g⁻¹ MF respectivamente. Respecto del control (0 kJ m⁻²), los valores de fenoles y flavonoides totales registrados representaron una disminución del 13,7 y del 44,6% respectivamente. Por otro lado, al tercer día de almacenamiento los valores de fenoles para el control, en el mismo cultivar, aumentaron un 40 %, desde 905,0 a 1269,8 mg EAG 100 g⁻¹ MF. Para la dosis de 10,5 kJ m⁻² el aumento fue de casi un 70% incrementando desde 949,7 a 1610,4 mg EAG 100 g⁻¹ MF. Mientras que para el tratamiento de 21 kJ m⁻² el incremento fue de un 95%, desde 780,8

hasta 1522,1 mg EAG 100 g⁻¹ MF. Para el caso de los flavonoides totales, al tercer día de almacenamiento el tratamiento control (0 kJ m⁻²) alcanzó una concentración de 524,1 mg eq rutina 100 g⁻¹ MF, un 86% mayor que el mismo tratamiento a cosecha, donde registró un valor de 281,9 mg eq rutina 100 g⁻¹ MF (Tabla 5.13). Por su parte el tratamiento de 10,5 kJ m⁻² presentó un incremento de 194% con respecto al mismo tratamiento a cosecha alcanzando al tercer día de almacenamiento valores de 839,3 mg eq rutina 100 g⁻¹ MF (Tabla 5.14). Adicionalmente la dosis de 21 kJ m⁻² registró una concentración de 683,1 mg eq rutina 100 g⁻¹ MF (Tabla 5.14), lo que representa un incremento del 337% con respecto del mismo tratamiento a cosecha que registró 156,2 mg eq rutina 100 g⁻¹ MF (Tabla 5.13).

Por otro lado, el día de la cosecha el cultivar 'Carmolí' registró una concentración de fenoles y flavonoides totales de entre 1303,0 y 1799,5 mg EAG 100 g⁻¹ MF y entre 383,7 y 534,5 mg eq rutina 100 g⁻¹ MF respectivamente (Tabla 5.13). Para ambas determinaciones los valores más elevados fueron registrados para el control (0 kJ m⁻²) (Tabla 5.13) siendo un 27,5 y 21,1% mayor para fenoles y flavonoides respectivamente, en comparación a las concentraciones alcanzadas a dosis de 21 kJ m⁻². Al igual que para el cultivar 'Levistro', al tercer día de almacenamiento en el cultivar 'Carmolí' se observó un incremento en la concentración de fenoles y flavonoides totales.

Para el tratamiento control, la concentración de fenoles totales aumentó un 27,7% desde la cosecha (1799,5 mg EAG 100 g⁻¹ MF) al tercer día de almacenamiento (2298,7 mg EAG 100 g⁻¹ MF). Por su parte, para el tratamiento 10,5 kJ m⁻², el aumento en la concentración de fenoles desde la cosecha al tercer día de almacenamiento fue del 78,9% y para el tratamiento de 21 kJ m⁻² fue de un 117,8%, desde 1303 mg EAG 100 g⁻¹ MF registrados a cosecha (Tabla 5.13), hasta 2838,1 mg EAG 100 g⁻¹ MF, registrados al tercer día de almacenamiento (Tabla 5.14). Adicionalmente para 'Carmolí', el tratamiento control (0 kJ m⁻²) presentó un incremento del 11,6% en la concentración de flavonoides totales al tercer día de almacenamiento (596,5 mg eq rutina 100 g⁻¹ MF) con respecto al día de la cosecha (534,5 mg eq rutina 100 g⁻¹ MF). Por su parte, para el tratamiento 10,5 kJ m⁻², el incremento en la concentración de flavonoides totales correspondió a un 42,8%, desde un valor de 383,7 mg eq rutina 100 g⁻¹ MF registrado a cosecha, hasta un valor de 547,8 mg eq rutina 100 g⁻¹ MF, registrado al tercer día de almacenamiento. Finalmente, para el tratamiento de 21 kJ m⁻², la concentración de flavonoides varió desde la cosecha al tercer día de almacenamiento desde 422,3 hasta 661,7 mg eq rutina 100 g⁻¹ MF, respectivamente, lo cual representó un incremento del 56,8%

Los incrementos en las concentraciones de fenoles y flavonoides totales, registrados luego de tres días de almacenamiento, confirman lo reportado por Zhao *et al.* (2007) quienes registraron un incremento significativo de fenoles totales en lechuga romana cv. 'Kalura' y una lechuga de hoja suelta cv. 'Red Sails' luego de 16 días de almacenamiento a 4°C. De igual manera, Martínez-Sánchez *et al.* (2012) presentaron un aumento en el contenido de fenoles, flavonoides y antocianinas totales en lechuga de hoja verde, hoja roja y Lollo Rosso luego de un almacenamiento de 3 días a 4°C seguido de un almacenamiento de 7-8 días a 7°C. Si bien los incrementos en las concentraciones de fenoles y flavonoides totales registrados en este estudio concuerdan con el comportamiento reportado por otros autores, no logran alcanzar las magnitudes del incremento reportado por Luna *et al.* (2012), para lechuga iceberg quienes, al segundo día de almacenamiento a 7°C, registran un incremento de entre dos y cuatro veces en la concentración de fenoles totales registradas a cosecha. Además, para el cultivar 'Carmolí' el día de la cosecha se registraron valores de antocianinas totales de 18,8; 19,3 y 13,6 mg eq cian3gluc 100 g⁻¹ MF para los tratamientos de 0, 10,5 y 21 kJ m⁻², respectivamente (Tabla 5.13). Al tercer día de almacenamiento estos valores aumentaron un 55,3; 85,5 y un 166,9% hasta registrar 29,2; 35,8 y 36,3 mg eq cian3gluc 100 g⁻¹ MF, respectivamente (Tabla 5.14).

Tabla 5.13. Concentración a cosecha de fenoles, flavonoides, antocianinas totales y capacidad antioxidante (FRAP y DPPH) de lechuga Lollo Bionda ‘Levistro’ y Lollo Rosso ‘Carmolí’ cultivadas con diferentes dosis acumuladas de radiación UV-B.

| Tratamiento UV-B (kJ m ⁻²) | Fenoles totales | | | | Flavonoides totales | | | | Antocianinas totales | | Capacidad antioxidante | | | | | | | |
|--|--------------------|------|---------------------|-------|---------------------|------|--------------------|------|----------------------|-----|------------------------|------|--------------------|------|--------------------|------|--------------------|------|
| | ‘Levistro’ | | ‘Carmolí’ | | ‘Levistro’ | | ‘Carmolí’ | | ‘Carmolí’ | | FRAP | | | | DPPH | | | |
| | Media | EE | Media | EE | Media | EE | Media | EE | Media | EE | Media | EE | Media | EE | Media | EE | Media | EE |
| 0 | 905,0 ^a | 17,1 | 1799,5 ^a | 60,7 | 281,9 ^a | 22,8 | 534,5 ^a | 33,3 | 18,8 ^a | 0,4 | 283,6 | 7,5 | 670,4 ^a | 18,2 | 885,5 ^a | 9,4 | 933,6 ^a | 31,8 |
| 10,5 | 949,7 ^a | 34,6 | 1461,8 ^b | 104,6 | 285,7 ^a | 24,9 | 383,7 ^c | 49,2 | 19,3 ^a | 0,6 | 292,9 | 6,9 | 610,8 ^a | 19,6 | 826,1 ^a | 6,5 | 814,1 ^a | 23,5 |
| 21 | 780,8 ^b | 26,0 | 1303,0 ^b | 89,0 | 156,2 ^b | 23,0 | 422,3 ^b | 46,7 | 13,6 ^b | 0,7 | 211,5 | 10,0 | 452,6 ^b | 21,6 | 656,7 ^b | 10,8 | 667,5 ^b | 38,8 |
| valor p | ** | | * | | * | | * | | * | | ns | | * | | * | | * | |

En la tabla se muestra el efecto de la dosis acumulada de radiación UV-B (kJ m⁻²) sobre la concentración de fenoles totales (mg EAG 100 g⁻¹ MF), flavonoides (mg eq rut 100 g⁻¹ MF), antocianinas (mg eq cian3gluc 100 g⁻¹ MF) y capacidad antioxidante medida por los métodos de FRAP (mg eq Trolox 100 g⁻¹ MF) y DPPH (mg eq Trolox 100 g⁻¹ MF) para lechugas Lollo Bionda cv. ‘Levistro’ y Lollo Rosso cv. ‘Carmolí’ a cosecha. Valores representan medias y error estándar (EE) de 9 datos para cada concentración de NaCl. EAG: equivalentes de ácido gálico; eq rut: equivalentes de rutina; eq cian3gluc equivalentes de cianidina 3-glicósido; eq Trolox: equivalentes de Trolox; MF: Masa fresca. ^{a,b,c} Letras diferentes corresponden a diferencias significativas determinadas por la prueba de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher con un nivel de significancia de $p < 0,05$. ns: no significativo; *: $< 0,05$; **: $< 0,01$.

Adicionalmente, para el día de la cosecha, la capacidad antioxidante medida por FRAP para 'Levistro' registró valores comprendidos entre 211,5 y 292,9 mg eq trolox 100 g⁻¹ MF (Tabla 5.13) y entre 653,0 y 773,8 mg eq trolox 100 g⁻¹ MF para el tercer día de almacenamiento (Tabla 5.14). Los valores alcanzados al tercer día de almacenamiento representan un incremento de 130,2; 164,2 y 218,3% con respecto a la cosecha, para los tratamientos 0; 10,5 y 21 kJm⁻², respectivamente. Por otro lado, el cultivar 'Carmolí' el día de la cosecha registró valores entre 452,6 y 670,4 mg eq trolox 100 g⁻¹ MF (Tabla 5.13) y entre 931,2 y 1131,1 mg eq trolox 100 g⁻¹ MF al tercer día de almacenamiento (Tabla 5.14). Representando un incremento respecto los valores registrados a cosecha del 53,7; 52,5 y 150% para los tratamientos 0; 10,5 y 21 kJm⁻², respectivamente.

Para el cultivar 'Levistro', se registraron valores de CA medida por DPPH entre 656,7 y 885,5 mg eq trolox 100 g⁻¹ MF al día de la cosecha (Tabla 5.13) mientras que al tercer día de almacenamiento los valores registrados oscilaron entre 932,9 y 1086,2 mg eq trolox 100 g⁻¹ MF (Tabla 5.14). El incremento en la capacidad antioxidante registrado al tercer día de almacenamiento, con respecto a los valores obtenidos a cosecha, para los tratamientos 0; 10,5 y 21 kJm⁻², fue de un 22,7; 15,2 y 42,1%, respectivamente. Por otro lado, los valores registrados para el cultivar 'Carmolí' oscilaron entre 667,5 y 933,6 mg eq trolox 100 g⁻¹ MF el día de la cosecha (Tabla 5.13) y entre 1.464,1 y 1.752,6 mg eq trolox 100 g⁻¹ MF al tercer día de almacenamiento (Tabla 5.14), lo que indica un incremento del 61,7% para el tratamiento control (0 kJ m⁻²), un incremento de 115,3% para el tratamiento de 10,5 kJ m⁻² y un incremento del 119,3% para 21 kJm⁻². Este incremento en la CA confirma los resultados reportados por Lafarga *et al.* (2020), quien registró que el procesamiento mínimo seguido de un período de almacenamiento de siete días resultó en un aumento en los valores de FRAP y DPPH en diez variedades diferentes de lechuga entre ellas dos rojas y una verde de tipo hoja de roble, dos verdes de tipo mantecosa, una verde y dos rojas de tipo costina y dos rojas de tipo Batavia.

5.4.3.2.- Efecto de la temperatura y atmosfera de almacenamiento en la concentración de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante de lechugas luego de tres días de almacenamiento postcosecha

Por otro lado, el uso bajas temperaturas durante el almacenamiento muestra un efecto significativo en la conservación de la concentración de flavonoides totales para ambos cultivares de lechuga y para la CA medida tanto por FRAP como por DPPH sólo para el cultivar 'Levistro'.

El cultivar 'Levistro' registró una disminución de 210,5 mg eq rutina 100 g⁻¹ MF cuando las lechugas fueron almacenadas a 5°C, lo cual representa una disminución en la concentración de flavonoides del 26,7% respecto al valor registrado a 10 °C de 787,4 mg eq rutina 100 g⁻¹ MF (Tabla 5.14). Por su parte, el cultivar 'Carmolí' presentó el comportamiento opuesto, registrando un aumento significativo de 135,8 mg eq rutina 100 g⁻¹ MF cuando las lechugas fueron almacenadas a 5°C, lo cual representa un aumento del 25,4% con respecto al valor registrado a 10 °C (Tabla 5.14).

Cuando los valores de CA, medidos por FRAP y DPPH, registrados a 5 °C fueron comparados con los registrados a 10 °C, en el cultivar 'Levistro' se registró una disminución significativa de 240,2 mg eq trolox 100 g⁻¹ MF y un aumento también significativo de 56,5 mg eq trolox 100 g⁻¹ MF para los métodos de FRAP y DPPH, respectivamente.

El uso de atmósfera modificada sólo presentó un efecto significativo en la concentración de flavonoides totales y para la CA determinada por FRAP para el cultivar 'Levistro'. En este sentido se logró una mayor concentración de flavonoides totales cuando se utilizó el almacenamiento de atmosfera modificada con barrido de nitrógeno (N₂), registrando un incremento de 213,6 mg eq rutina 100 g⁻¹ MF, lo cual representa un incremento del 37 % en comparación con el almacenamiento tradicional en aire (Tabla 5.14). Adicionalmente, la CA determinada por FRAP presentó un

incremento de la misma magnitud (211,4 mg eq trolox 100 g⁻¹ MF), lo cual representa un incremento de 35,6 % en comparación con el almacenamiento en aire.

Aunque el empleo de estas herramientas postcosecha está ampliamente difundido, Lafarga *et al.*, 2020 revelaron que efecto del almacenamiento a bajas temperaturas es específico para cada variedad de lechuga estudiada y que los beneficios de los EAM dependen de una serie de factores entre ellos la variedad y condición de cultivo (Luna *et al.*, 2012; Ghidelli y Pérez-Gago, 2017; Lafarga *et al.*, 2020) confirmando los resultados aquí presentados para ambos cultivares de lechuga.

5.4.4.- Conclusiones

Al momento de la cosecha, las concentraciones de fenoles y flavonoides totales alcanzaron las menores dosis cuando las lechugas fueron cultivadas bajo una dosis de radiación UV-B de 21,0 kJ m⁻². Sin embargo, se observó un incremento significativo en los valores de fenoles y flavonoides totales durante el almacenamiento. Este incremento, entre la cosecha y el tercer día de almacenamiento, fue de mayor magnitud cuando las plantas fueron tratadas con 21,0 kJ m⁻² de radiación UV-B. En este sentido, los valores más altos en la concentración de fenoles totales fueron registradas al tercer día de almacenamiento en las plantas tratadas con cualquiera de las dosis de radiación UV-B utilizadas.

El uso de bajas temperaturas como estrategia postcosecha (5 °C) tuvo un efecto significativo en la conservación de los flavonoides totales y en la capacidad antioxidante medida por FRAP en el cultivar 'Carmolí', mientras que el cultivar 'Levistro' mostró un comportamiento opuesto, obteniendo menores valores de compuestos a bajas temperaturas. Asimismo, el uso de atmósfera modificada mostró un efecto significativo en la concentración de flavonoides totales y la capacidad antioxidante medida por FRAP para el cultivar 'Levistro'. Estos resultados respaldan la evidencia previa que sugiere que los efectos de las bajas temperaturas y las estrategias de atmósfera modificada son dependientes de la variedad de lechuga estudiada.

Tabla 5.14. Concentración de fenoles, flavonoides, antocianinas totales y capacidad antioxidante (FRAP y DPPH) de lechuga Lollo Bionda ‘Levistro’ y Lollo Rosso ‘Carmolí’ cultivadas con diferentes dosis acumuladas de radiación UV-B luego de 3 días de almacenamiento utilizando diferentes temperaturas y atmósferas.

| Factor | Nivel | Fenoles totales | | | | Flavonoides totales | | | | Antocianinas totales | | Capacidad antioxidante | | | | | | | | | |
|-----------------|-------------------------|---|------|---------------------|-------|--|-------|--------------------|------|--|-----|--|-------|----------------------|------|---|------|--------|-------|-------|----|
| | | ‘Levistro’ | | ‘Carmolí’ | | ‘Levistro’ | | ‘Carmolí’ | | ‘Carmolí’ | | FRAP | | | | DPPH | | | | | |
| | | -----mg EAG* 100g ⁻¹ MF----- | | | | --mg eq rutina* 100 g ⁻¹ MF-- | | | | mg eq cian3gluc * 100 g ⁻¹ MF | | ---mg eq Trolox* 100 g ⁻¹ MF--- | | | | ---mg eq Trolox*100 g ⁻¹ MF--- | | | | | |
| | | Media | EE | Media | EE | Media | EE | Media | EE | Media | EE | Media | EE | Media | EE | Media | EE | Media | EE | Media | EE |
| T° (1) | 5 | 1472,4 | 59,6 | 2565,4 | 89,7 | 576,9 ^b | 43,2 | 669,9 ^a | 53,8 | 34,2 | 1,5 | 579,9 ^b | 25,9 | 1077,2 | 49,3 | 1018,7 ^a | 26,4 | L | 119,0 | | |
| | 10 | 1462,4 | 42,1 | 2604,8 | 98,0 | 787,4 ^a | 104,6 | 534,1 ^b | 32,2 | 33,4 | 1,8 | 820,1 ^a | 104,1 | 984,8 | 40,6 | 962,2 ^b | 23,1 | 1466,9 | 39,7 | | |
| Atm (2) | Aire | 1475,6 | 45,5 | 2686,3 | 91,4 | 575,4 ^b | 4,7 | 640,3 | 56,9 | 35,7 | 1,5 | 594,3 ^b | 26,8 | 1082,7 | 54,1 | 974,8 | 25,4 | 1658,4 | 123,7 | | |
| | AM | 1459,2 | 57,0 | 2484,0 | 90,2 | 789,0 ^a | 103,8 | 564,6 | 32,6 | 31,9 | 1,7 | 805,7 ^a | 105,7 | 979,3 | 33,0 | 1006,0 | 25,5 | 1492,5 | 31,9 | | |
| Tratamiento (3) | 0 kJ m ⁻² | 1269,8 ^b | 40,1 | 2298,7 ^b | 56,6 | 524,1 ^b | 95,4 | 596,5 | 62,2 | 29,2 ^b | 1,4 | 653,0 | 104,3 | 1030,7 ^{ab} | 71,6 | 1086,2 ^a | 20,4 | 1509,6 | 29,9 | | |
| | 10,5 kJ m ⁻² | 1610,4 ^a | 47,6 | 2618,6 ^a | 143,4 | 839,3 ^a | 109,6 | 547,8 | 70,2 | 35,8 ^a | 2,5 | 773,8 | 110,9 | 931,2 ^b | 47,2 | 952,1 ^b | 26,2 | 1752,6 | 172,0 | | |
| | 21,0 kJ m ⁻² | 1522,1 ^a | 52,9 | 2838,1 ^a | 62,2 | 683,1 ^{ab} | 84,2 | 661,7 | 31,3 | 36,3 ^a | 1,2 | 673,2 | 81,5 | 1131,1 ^a | 29,3 | 932,9 ^b | 26,4 | 1464,1 | 69,9 | | |
| | 1 | ns | ns | * | * | ns | * | ns | * | ns | * | ns | * | ns | * | ns | * | ns | | | |
| | 2 | ns | ns | * | ns | ns | ns | ns | ns | ns | * | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | | | |
| | 3 | *** | *** | * | ns | * | ns | * | ns | * | ns | * | ns | * | *** | ns | *** | ns | | | |
| | 1*2 | ns | ns | *** | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ** | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | | | |
| | 1*3 | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | | | |

En la tabla se muestra el efecto de diferentes condiciones de almacenamiento: temperatura (5 y 10 °C); atmósfera (Aire, Atmósfera modificada (AM)) al tercer día de almacenamiento, sobre la concentración de fenoles totales (mg EAG 100 g⁻¹ MF), flavonoides (mg eq rut 100 g⁻¹ MF), antocianinas (mg eq cian3gluc 100 g⁻¹ MF) y capacidad antioxidante medida por los métodos de FRAP (mg eq Trolox 100 g⁻¹ MF) y DPPH (mg eq Trolox 100 g⁻¹ MF) para lechugas Lollo Bionda cv. ‘Levistro’ y Lollo Rosso cv. ‘Carmolí’ cultivadas con diferentes dosis acumuladas de radiación UV-B (kJ m⁻²). Evaluación realizada al tercer día de almacenamiento (Periodo de comercialización). Valores representan medias y error estándar (EE) de 3 datos para la interacción (1*2*3). EAG: equivalentes de ácido gálico; eq rut: equivalentes de rutina; eq cian3gluc equivalentes de cianidina 3-glicósido; eq Trolox: equivalentes de Trolox; MF: Masa fresca. ^{a,b} Letras diferentes corresponden a diferencias significativas determinadas por la prueba de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher con un nivel de significancia de $p < 0,05$. ns: no significativo; *: $< 0,05$; **: $< 0,01$; *** $< 0,001$. No existe interacción 2x3 ni interacción triple (1x2x3) para ninguno de los factores estudiados.

5.4.5.- Bibliografía

- Ainsworth, E.A., and Gillespie, K. M., 2007. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent. *Nat. Protoc.* 2, 875- 877. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.102>
- Bandurska, H., Niedziela, J., Chadzinikolau., T., 2013. Separate and combined responses to water deficit and UV-B radiation. *Plant Sci.* 213, 98-105. <http://dx.doi.org/10.1016/j.plantsci.2013.09.003>
- Bastarrachea, L., Dhawan, S., Sablani, S. S. 2011. Engineering Properties of Polymeric-Based Antimicrobial Films for Food Packaging. *Food Eng. Rev.* 3, 79–93. <https://doi.org/10.1007/s12393-011-9034-8>
- Benzie, I.F. and Strain, J.J., 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of ‘antioxidant power’: The FRAP assay. *Anal. Biochem.* 239, 70–76. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>
- Brown, B.A., Cloix, C., Jiang, G.H., Kaiserli, E., Herzyk, P., Kliebenstein, D.J.; Jenkins, G.I. (2005). A UV-B-specific signaling component orchestrates plant UV protection. *PNAS* 102, 18225–18230. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0507187102
- De Corato, U. 2019. Improving the shelf-life and quality of fresh and minimally-processed fruits and vegetables for a modern food industry: A comprehensive critical review from the traditional technologies into the most promising advancements. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 60, 940-975. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1553025>
- Di Rienzo, J.A., Casanoves, F., Balzarini, M.G., Gonzalez, L., Tablada, M., and Robledo, C.W. InfoStat versión., 2017. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. Available at <http://www.infostat.com.ar>
- Du, W.X., Avena-Bustillos, R., Breksa, A., McHugh, T., 2014. UV-B light as a factor affecting total soluble phenolic contents of various whole and fresh-cut specialty crops. *Postharvest Biol. Technol.* 93, 72-82. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2014.02.004>
- Ebisawa, M., Shoji, K., Kato, M., Shimomura, K., Goto, F., Yoshihara, T. 2008. Supplementary ultraviolet radiation B together with blue light at night increased quercetin content and flavonol synthase gene expression in leaf lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Environ. Control Biol.* 46, 1-11. <https://doi.org/10.2525/ecb.46.1>
- Eichholz, I., Rohn, S., Gamm, A., Beesk, N., Herppich, W.B., Kroh, L.W., 2012. UV-B-mediated flavonoid synthesis in white asparagus (*Asparagus officinalis* L.). *FoodRes. Int.* 48, 196–201. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.03.008>
- Frohnemeyer, H., Staiger, D. 2003. Ultraviolet-B Radiation-Mediated Responses in Plants. Balancing Damage and Protection. *Plant Physiol.* 133, 1420–1428. www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.103.030049
- Galieni, A., Di Mattia, C., De Gregorio, M., Specca, S., Mastrocola, D., Pisante, M., Stagnari, F. 2015. Effects of nutrient deficiency and abiotic environmental stresses on yield, phenolic compounds, and antiradical activity in lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Sci. Hort.* 187, 93-101. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.02.036>
- Ghidelli, C., Pérez-Gago, M.B. 2016. Recent advances in modified atmosphere packaging and edible coatings to maintain quality of freshcut fruits and vegetables. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 58: 662-679. <http://dx.doi.org/10.1080/10408398.2016.1211087>
- Guo, Z., Liu, H., Chen, X., Huang, L., Fan, J., Zhou, J., Chang, X., Du, B., Chang, X. 2019. Modified-atmosphere packaging maintains the quality of postharvest whole lettuce (*Lactuca sativa* L. Grand Rapid) by mediating the dynamic equilibrium of the electron transport chain and protecting mitochondrial structure and function. *Postharvest Biol. Technol.* 147, 206–13. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2018.09.001>

- Gupta, S., Prakash, J., 2009. Studies on Indian Green Leafy Vegetables for Their Antioxidant Activity. *Plant Foods Hum. Nutr.* 64, 39-45. <https://doi.org/10.1007/s11130-008-0096-6>
- Jansen, M., Hectors, K., O'Brien, N., Guisez, Y., Potters, G. 2008. Plant stress and human health: Do human consumers benefit from UV-B acclimated crops? *Plant Sci.* 175, 449-458. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2008.04.010>
- Jiang, L., Hou, T., Yuan, X., Jiang, J., Yu, Z., 2010. Effect of storage temperature and packaging method on the decay and physiology of fresh leaves of *Gynura bicolor* D.C. *J. Food Process. Preserv.* 34, 858-871. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4549.2009.00402.x>
- Krizek, D. 2004. Influence of PAR and UV-A in Determining Plant Sensitivity and Photomorphogenic Responses to UV-B Radiation. *Photochem. Photobiol.* 79, 307-315. <https://doi.org/10.1562/2004-01-27-ir.1>
- Lafarga, T., Villaró, S., Rivera, A., Bobo, G., Aguiló-Aguayo, I. 2020. Bioaccessibility of polyphenols and antioxidant capacity of fresh or minimally processed modern or traditional lettuce (*Lactuca sativa* L.) varieties. *J. Food Sci. Technol.* 57, 754-763. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-04108-7>
- Luna, M.C., Tudela, J.A., Martínez-Sánchez, A., Allende, A., Marín, A., Gil, M.I. 2012. Long-term deficit and excess of irrigation influences quality and browning related enzymes and phenolic metabolism of fresh-cut iceberg lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Postharvest Biol Technol* 73: 37-45. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2012.05.011>
- Martínez-Sánchez, A., Luna, M.C., Selma, M.V., Tudela, J.A., Abad, J., Gil, M.I. 2012. Baby-leaf and multi-leaf of green and red lettuces are suitable raw materials for the fresh-cut industry. *Postharvest Biol Technol* 63: 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2011.07.010>
- Meitha, K., Pramesti, Y., Suhandono, S. 2020. Reactive Oxygen Species and Antioxidants in Postharvest Vegetables and Fruits. *Int. J. Food Sci.* 2020, 8817778. <https://doi.org/10.1155/2020/8817778>
- Parihar, P., Singh, S., Singh, R., Singh, V. P., Prasad, S. M. 2015. Changing scenario in plant UV-B research: UV-B from a generic stressor to a specific regulator. *J. Photochem. Photobiol. B, Biol.* 153, 33-343. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2015.10.004>
- Romani, A., Pinelli, P., Galardi, C., Sani, G., Cimato, A., and Heimler, D. 2002. Polyphenols in greenhouse and open-air-grown lettuce. *Food Chem.* 79, 337-342. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00170-X](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00170-X)
- Saini, R.K., Shang, X.M., Ko, E. Y., Choi, J.H., Keum, Y.S. 2016. Stability of carotenoids and tocopherols in ready-to-eat baby-leaf lettuce and salad rocket during low-temperature storage. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 67, 489-495. <http://dx.doi.org/10.3109/09637486.2016.1172059>
- Tharasena, B., Lawan, S., 2014. Phenolics, flavonoids and antioxidant activity of vegetables as Thai side dish. *APCBEEProcedia* 8, 99-104. <https://doi.org/10.1016/j.apcbee.2014.03.008>
- Xu., C., Natarajan, S., Sullian., JH. 2008. Impact of solar ultraviolet-B radiation on the antioxidant defense system in soybean lines differing in flavonoid contents. *Environ. Exp. Bot.* 63, 39-48. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2007.10.029>
- Zhao, X., Carey, E., Young, J., Wang, W., Iwamoto, T., 2007. Influences of organic fertilization, high tunnel environment, and postharvest storage on phenolic compounds in lettuce. *HortScience* 42,71-76. <http://hortsci.ashspublications.org/content/42/1/71.full>

6.- Capítulo 2: Corte y salinidad por cloruro de sodio (NaCl) como factores estresores

6.1.- Determinación de las concentraciones de cloruro de sodio (NaCl) a utilizar en los experimentos

6.1.1.- Introducción

La lechuga (*Lactuca sativa* L.) es un cultivo ampliamente cultivado y consumido en todo el mundo (Mulabagal *et al.*, 2010; Pérez-López *et al.*, 2014). Sin embargo, su productividad puede verse afectada por la salinidad del suelo y del agua de riego, lo que limita su óptimo crecimiento y desarrollo (Shabala *et al.*, 2015).

Diversos estudios han investigado la tolerancia de la lechuga a la salinidad. Sin embargo, los resultados presentados parecen contradictorios ya que la tolerancia a la salinidad depende del tipo de lechuga y cultivar. Algunos estudios consideran que la lechuga es relativamente sensible a la salinidad, con un umbral de tolerancia de 1,0 a 1,4 dS m⁻¹, lo que significa que, a partir de este valor, se observaría una reducción significativa en la producción. Estos estudios han reportado una disminución del 13 % en la producción por cada incremento de 1 dS m⁻¹ en la conductividad eléctrica (CE) del suelo o del agua de riego (Tanji y Kielen, 2002). Otros estudios clasifican a la lechuga como moderadamente tolerante. Así, Carranza *et al.* (2009) demostraron que la lechuga tipo Batavia presenta tolerancia a una CE de 2,16 dS m⁻¹, soportando niveles más altos de salinidad que las reportadas por Tanji y Kielen (2002) sin sufrir una reducción significativa en su rendimiento. Por otro lado, se ha observado que la variedad Iceberg puede tolerar una CE de hasta 4,4 dS m⁻¹ sin afectar su rendimiento o calidad, mientras que las lechugas tipo Romana pueden soportar incluso hasta 10,5 dS m⁻¹ sin presentar una reducción significativa en su rendimiento (Pasternak *et al.*, 1986). Xu y Mou (2015) por su parte, demostraron que los genotipos de lechuga difieren en su sensibilidad a la sal observando variedades que mostraron una menor reducción de la producción bajo condiciones salinas, manteniendo un porcentaje de reducción en el peso fresco por debajo del 15 % a una CE de 8,4 dS m⁻¹. Estos resultados resaltan la importancia de seleccionar cultivares tolerantes a la salinidad y de gestionar adecuadamente el agua de riego en entornos salinos para mejorar tanto el rendimiento como la calidad de los cultivos de lechuga.

A pesar de los avances en la comprensión de la respuesta de la lechuga al estrés salino, aún falta información, especialmente en lo que respecta a los tipos de lechuga Lollo Rosso y Lollo Bionda y su tolerancia a la salinidad. Estos tipos de lechuga se caracterizan por sus atractivas hojas crespas de intenso color rojo y verde respectivamente. En este sentido, y con el fin de comprender la respuesta antioxidante al estrés salino, el presente estudio se enfocó en investigar la respuesta antioxidante y la tolerancia a la salinidad de dos tipos de lechuga con una concentración de antioxidantes naturalmente diferentes. Las lechugas utilizadas fueron: Lollo Rosso cv. 'Carmolí', con hojas de color rojo y una mayor concentración de antioxidantes, y Lollo Bionda cv. 'Levistro', con hojas de color verde y una menor concentración de estos compuestos (Nicolle *et al.*, 2004; Llorach *et al.*, 2008; Pérez-López *et al.*, 2014). El objetivo principal de este estudio consistió en evaluar diferentes concentraciones de NaCl en la solución nutritiva en ambos cultivares de lechuga y determinar la posible manifestación de estrés a la salinidad y su tolerancia. Para ello, se llevó a cabo un experimento utilizando un sistema hidropónico de raíz flotante y una solución nutritiva estándar con diferentes concentraciones de NaCl (0; 0,025; 0,05; 0,075; 0,1 mol L⁻¹).

Durante el estudio, se analizaron parámetros representativos del rendimiento de las plantas, como la masa fresca y el porcentaje de masa seca. Además, se determinó la concentración

de fenoles totales presentes en las hojas y se evaluó la capacidad antioxidante mediante los métodos de FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) y DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo).

6.1.2.- Metodología

6.1.2.1.- Material vegetal y condiciones de cultivo

El material vegetal correspondió a lechugas tipo Lollo Bionda cultivar 'Levistro' (hojas verdes) de la empresa Rijk Zwaan (Chile). La germinación de las semillas, las condiciones de cultivo durante el desarrollo de los almácigos y trasplante se realizaron como se describe en la sección 4.1 durante la temporada de otoño. Una vez que las plantas alcanzaron el estadio de cuatro hojas verdaderas fueron trasplantadas a un sistema hidropónico cerrado de raíz flotante, formado por un reservorio de agua de 0,5*1,5*0,12 m que contuvo la solución nutritiva, una plancha flotante de poliestireno expandido 0,5*1,5*0,025 m y 25 kg m⁻³ de densidad y una bomba de acuario (HJ-542, super aquatics, China) para airear la solución. Las planchas fueron perforadas con un arreglo de 3 bolillos con una densidad de 50 plantas m⁻². Cada planta fue sujeta en un orificio con una esponja de baja densidad. Luego de dos días desde el trasplante se añadió la solución nutritiva completa siguiendo las recomendaciones de Sonneveld y Straver (1994) para hortalizas de hoja cuya composición se detalla en la sección 4.1. El pH de la solución durante el cultivo de las plantas se mantuvo entre 5,5 y 5,8 y fue ajustado con una solución de ácido nítrico. Las características del invernadero donde se llevó a cabo el cultivo correspondieron a las descritas en la sección 5.2.2.1.

6.1.2.2.- Montaje y diseño experimental

El experimento fue realizado para los dos cultivares de lechuga donde se probaron cinco concentraciones de NaCl aplicadas a la solución nutritiva cuando las plantas fueron trasplantadas, en un estadio de 3-4 hojas verdaderas. Las concentraciones de NaCl fueron 0; 0,025; 0,050; 0,075 y 0,1 mol L⁻¹. Los valores de CE registrados durante el cultivo, debido a la adición de NaCl en la solución nutritiva se muestran en la Tabla 6.1. Una vez que las lechugas del tratamiento control (0 mol L⁻¹ de NaCl) alcanzaron un tamaño adecuado para la cosecha, luego de 30 días, se cosecharon las plantas completas de todos los tratamientos para su análisis.

Tabla 6.1. Concentración de NaCl en la solución nutritiva (mol L⁻¹) y sus respectivas conductividades eléctricas (CE: dS m⁻¹) para los diferentes tratamientos utilizados.

| [NaCl] (mol L ⁻¹) | Conductividad eléctrica | | | |
|----------------------------------|-------------------------------|-------------------|--------|--------|
| | Media | Error estándar | Mínima | Máxima |
| | -----dS m ⁻¹ ----- | | | |
| 0,000 | 3,68 | 0,044 | 3,00 | 4,01 |
| 0,025 | 6,58 | 0,038 | 6,19 | 6,88 |
| 0,050 | 9,11 | 0,063 | 8,66 | 9,66 |
| 0,075 | 10,08 | 0,070 | 9,32 | 10,83 |
| 0,100 | 12,22 | 0,073 | 11,45 | 12,86 |

En la tabla se presentan los valores de concentración de NaCl en mol L⁻¹ y sus respectivas conductividades eléctricas (CE), medias, mínima y máxima como deciSiemens por metro (dS m⁻¹) registradas durante el periodo cultivo. Valores medios ± error estándar calculados como resultado de 3 mediciones diarias durante los 30 días de cultivo.

6.1.2.3.- Parámetros de crecimiento de las plantas (MF, MS, %MS)

Para estudiar el comportamiento de crecimiento de las lechugas tipo Lollo Bionda y Lollo Rosso sometidos a diferentes concentraciones de NaCl se cosecharon 5 plantas de cada tipo por tratamiento, a las cuales se les midió la masa fresca (MF) y el porcentaje de masa seca (% MS) como parámetros indicadores de la productividad y crecimiento en condiciones salinas como se describió en la sección 4.3. Sólo se consideró la parte aérea de planta para la medición descrita. MF y MS fueron expresados en gramos (g) y el % MS fue estimado mediante la relación de MS:MF y expresado en porcentaje.

6.1.2.4.- Determinación de compuestos funcionales

6.1.2.4.1.- Extracción de las fracciones fenólicas

La extracción de los compuestos fenólicos se llevó a cabo siguiendo las recomendaciones de Galieni *et al.* (2015), como se describe en detalle en la sección 4.4.1.

6.1.2.4.2.- Determinación de la concentración de fenoles totales

La concentración de fenoles totales (FT) se midió utilizando el método propuesto por Ainsworth y Gillespie (2007), como se describe en detalle en la sección 4.4.2. Los resultados fueron expresados como miligramos equivalentes de ácido gálico por cada 100 gramos masa fresca (mg EAG 100 g⁻¹ MF).

6.1.2.4.3.- Determinación de la capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante (CA) de las diferentes muestras se llevó a cabo mediante los métodos de FRAP y DPPH.

6.1.2.4.3.1.- Método de FRAP

El poder antioxidante reductor del hierro (FRAP) fue determinado utilizando la metodología descrita por Benzie y Strain (1996) con algunas modificaciones. La metodología utilizada se describe en detalle en la sección 4.4.3.1. Los resultados fueron expresados en miligramos equivalentes de Trolox (eq Trolox) por cada 100 gramos de materia fresca (mg eq Trolox 100 g⁻¹ MF).

6.1.2.4.3.2.- Método de DPPH

Para la determinación de la de eliminación de radicales libres, se utilizó el reactivo radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) según la metodología descrita en Gupta y Prakash (2009), como se detalla en la sección 4.4.3.2. Los resultados fueron expresados en miligramos equivalentes de Trolox (eq Trolox) por cada 100 gramos de materia fresca (mg eq Trolox 100 g⁻¹ MF).

6.1.2.5.- Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando el software InfoStat versión 2017 (Di Rienzo *et al.*, 2017) como se describe en la sección 4.4.4.

6.1.3.- Resultados y discusión

6.1.3.1.- Masa fresca y seca de las plantas (MF, % MS)

Al utilizar la ecuación de rendimiento propuesta por Torres y Acevedo (2008) (a) para los diferentes tratamientos, se obtuvieron estimaciones de pérdida de rendimiento.

$$a) \text{ Rendimiento lechuga en \%: } 102,96 - (11,894 * \text{C.E.}) \quad R= 0,959$$

Según la ecuación (a), un rendimiento del 100 % se alcanzaría con una conductividad de 0,25 dS m⁻¹, conductividad diferente de las utilizadas en este ensayo. Según las estimaciones obtenidas con esta ecuación (Tabla 6.2) el tratamiento control presentaría un rendimiento del 59,2 % y a partir del tratamiento con 0,050 mol L⁻¹ de NaCl (CE: 9,11 dS m⁻¹) las lechugas ya no podrían desarrollarse ya que, según esta ecuación, presentarían un rendimiento negativo. Esto indica que la ecuación propuesta por Torres y Acevedo (2008) es aplicable sólo a la variedad utilizada en su estudio. En este experimento, al usar una concentración de NaCl de 0,025 mol L⁻¹ las lechugas cultivar ‘Levistro’ presentaron un rendimiento del 82,2% con respecto al control que presentó un valor promedio de 64,2 ± 2,8 g MF. Por otro lado, las lechugas de cultivar ‘Carmolí’ presentaron un rendimiento del 98,3 % al ser cultivadas con de 0,025 mol L⁻¹ de NaCl con respecto al control que registró 36,2 g MF (Tabla 6.2). Este rendimiento fue reduciéndose a medida que se incrementó la concentración de NaCl en la solución nutritiva hasta alcanzar un rendimiento del 62,6% en el cultivar ‘Levistro’ respecto del control y uno del 59,7% para el cultivar ‘Carmolí’ cuando fueron cultivadas con una concentración de 0,1 mol L⁻¹ de NaCl (Tabla 6.2). Considerando la conductividad eléctrica (CE) de la solución nutritiva y los rendimientos obtenidos para cada cultivar estudiado, se obtuvieron las siguientes ecuaciones predictivas del rendimiento:

$$\text{Rendimiento (\%)} = -3,4828 (\text{CE}) + 112,9 \text{ con un } R^2 = 0,6639 \text{ para el cultivar 'Levistro'}$$

$$\text{Rendimiento (\%)} = -4,5072(\text{CE}) + 121,62 \text{ con un } R^2 = 0,788 \text{ para el cultivar 'Carmolí'}$$

Tabla 6.2. Rendimiento empírico de lechugas cvs. ‘Levistro’ y ‘Carmolí’ según la conductividad eléctrica.

| [NaCl] (mol L ⁻¹) | Conductividad eléctrica | | Rendimiento estimado en % de acuerdo a Torres y Acevedo (2008) | Rendimiento empírico respecto del control (%) | |
|----------------------------------|-------------------------------|-------|--|---|-----------|
| | Media | EE | | ‘Levistro’ | ‘Carmolí’ |
| | -----dS m ⁻¹ ----- | | | | |
| 0,000 | 3,68 | 0,044 | 59,21 | 100 | 100 |
| 0,025 | 6,58 | 0,038 | 24,72 | 82,2 | 98,3 |
| 0,050 | 9,11 | 0,063 | -5,42 | 92,6 | 75,8 |
| 0,075 | 10,08 | 0,070 | -16,98 | 81,9 | 86,3 |
| 0,100 | 12,22 | 0,073 | -42,41 | 62,6 | 59,7 |

En la tabla se presentan los valores medios y error estándar de la conductividad eléctrica, el rendimiento (%) estimado para lechuga según la ecuación propuesta por Torres y Acevedo (2008), ecuación que relaciona el rendimiento con la conductividad eléctrica (CE) de la solución nutritiva y el rendimiento obtenido durante el desarrollo del experimento en porcentaje. Los valores registrados corresponden a medias de 3 mediciones diarias registradas diariamente durante los 30 días de cultivo.

En la Figura 6.1 se muestra el tamaño comparativo de las lechugas sometidas a los diferentes tratamientos de NaCl (0; 0,025; 0,05; 0,075 y 0,1 mol L⁻¹) al momento de la cosecha. Si bien se observaron diferencias en el tamaño de las lechugas entre tratamientos (Figura 6.1) al comparar la masa fresca (g) no se observaron diferencias significativas producto de la adición de NaCl en la solución nutritiva (Figura 6.2). Sin embargo, la tendencia de los resultados fue opuesta a la reportada por otros autores como Bartha *et al.* (2015), que encontraron que concentraciones de como 0,05 y 0,1 mol L⁻¹ de NaCl en la solución nutritiva redujeron significativamente la tasa de crecimiento, medida como masa fresca, en cinco variedades de lechuga; ‘Valdor’ y ‘Parella Green’ de tipo Mantecosa, ‘Paris Island’ de tipo Romana, ‘Salad Bowl Red’ de hoja suelta y ‘Asparragina’ de tipo

Steam lettuce o Latifolias. De acuerdo con el reporte estos autores, la reducción más pronunciada, relacionada con el control, se observó en el cultivar ‘Asparagina’, observándose una disminución del 31 % en presencia de $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ de NaCl y reducción del 51 % con $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de NaCl. Por otro lado, la reducción más leve en el crecimiento se registró para el cultivar ‘Paris Island’ la cual presentó una reducción del 24 % $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ de NaCl y del 41 % a $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de NaCl. Por otro lado, el cultivar de hojas rojas (Figura 6.2 abajo) presentó valores de masa fresca entre 36,2 y 21,6 g MF, valores significativamente menores a los registrados para el cultivar de hojas verdes de entre 64,3 y 40,2 g MF (Figura 6.2 arriba), lo cual correspondería a una respuesta esperada para variedades verdes y rojas.



Figura 6.1. Imágenes del tamaño comparativo de lechugas tipo Lollo Bionda cv. ‘Levistro’ (arriba) y lechugas tipo Lollo Rosso cv. ‘Carmoli’ (abajo) cultivadas con diferentes concentraciones de NaCl.

Respecto al porcentaje de materia seca, ambos cultivares mostraron un aumento significativo a medida que se incrementó la concentración de NaCl en la solución nutritiva (Figura 6.3). El cultivar ‘Levistro’ presentó un incremento desde 4,7% de masa seca registrado en tratamiento control (0 mol L^{-1} de NaCl) hasta llegar a 5,6% para el tratamiento con $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de NaCl. Por su parte el cultivar ‘Carmoli’ registró un incremento de masa seca desde 5,1% en el control (0 mol L^{-1} de NaCl) hasta alcanzar 6,0% al utilizar $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de NaCl. Esto coincide con los resultados encontrados por Bartha *et al.* (2015) quienes mostraron que el porcentaje de masa seca foliar fue mayor en plantas expuestas a $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de NaCl que en plantas cultivadas en presencia de $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ de cloruro de sodio y ambas mayores que el control sin NaCl. Para la lechuga ‘Asparagina’, los autores anteriores, registraron valores que van desde 5% para el control, hasta valores de 8,5 % MS para el tratamiento con $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de NaCl y para la lechuga ‘Paris Island’ valores que van desde 3,5 % hasta 6% para los mismos tratamientos. Finalmente, al comparar ambos cultivares entre sí, se observó que el cv. ‘Carmoli’ (Figura 6.3 B) presentó un porcentaje de masa seca significativamente mayor que el cv. ‘Levistro’ registrando, para el tratamiento control, valores de 5,1 y 4,7 % respectivamente y de 6,0 y 5,6 % para el tratamiento con $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de NaCl (Figura 6.3 A).

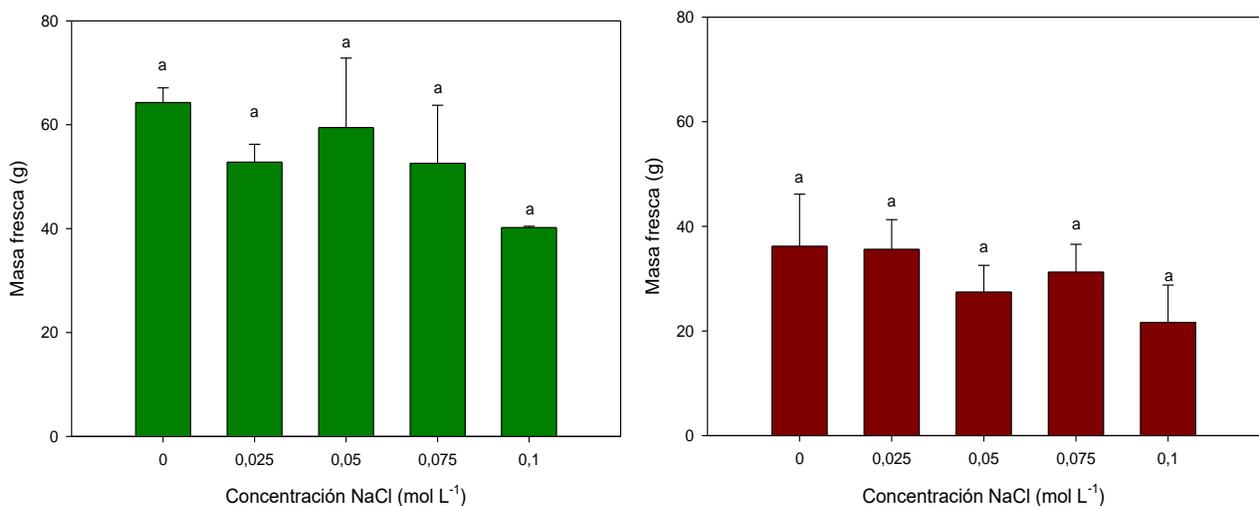


Figura 6.2. Masa fresca de lechugas tipo Lollo Bionda cv. 'Levistro' y tipo Lollo Rosso cv. 'Carmoli' cultivadas con diferentes concentraciones de NaCl.

Gráfica de la determinación de masa fresca expresada en gramos (g) de lechugas tipo Lollo Bionda cv. 'Levistro' (arriba) y tipo Lollo Rosso cv. 'Carmoli' (abajo) cultivadas con diferentes concentraciones de NaCl expresada en mol L⁻¹. Barras representan valores promedio de 5 réplicas biológicas. a Letras diferentes corresponden a diferencias significativas determinadas por la prueba de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher con un nivel de significancia de $p < 0,05$.

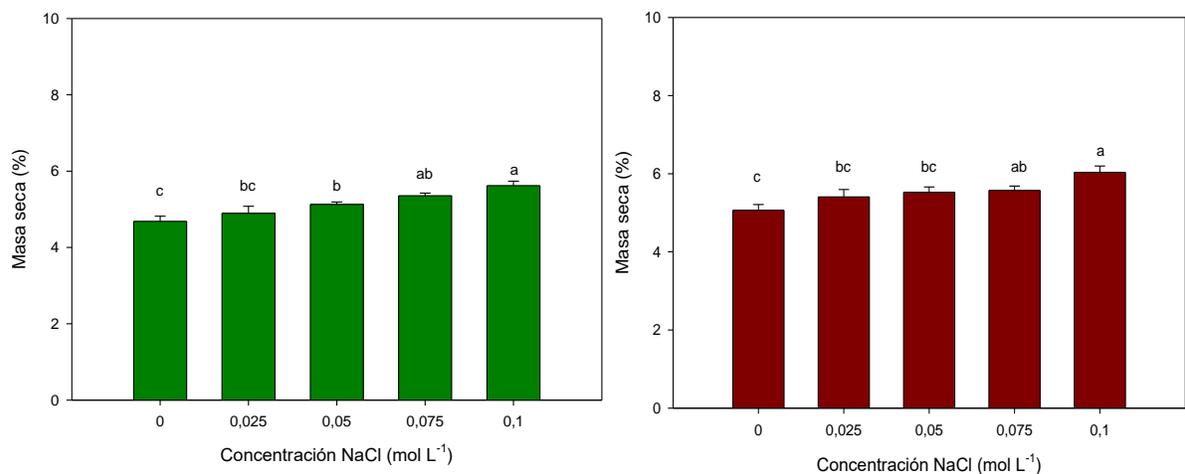


Figura 6.3. Masa seca de lechugas tipo Lollo Bionda cv. 'Levistro' y tipo Lollo Rosso cv. 'Carmoli' cultivadas con diferentes concentraciones de NaCl.

Gráfica de la determinación de masa seca, expresada en porcentaje, de lechugas tipo Lollo Bionda cv. 'Levistro' (arriba) y Lollo Rosso cv. 'Carmoli' (abajo) cultivadas con diferentes concentraciones de NaCl (mol L⁻¹). Barras representan valores promedio de 5 réplicas biológicas. ^{a,b,c} Letras diferentes corresponden a diferencias significativas determinadas por la prueba de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher con un nivel de significancia de $p < 0,05$.

6.1.3.2.- Determinación de compuestos funcionales

Al analizar la concentración de compuestos fenólicos totales se observó que ésta depende tanto del cultivar como de la concentración de NaCl de la solución nutritiva. Para el caso de las lechugas Lollo Bionda se observó un incremento conforme aumentó la concentración de NaCl de la solución nutritiva desde 0 hasta 0,1 mol L⁻¹ (Figura 6.4 arriba). Por su parte en las lechugas tipo Lollo Rosso, hubo un incremento significativo en la concentración de compuestos fenólicos totales cuando se aplicaron concentraciones de NaCl 0,1 mol L⁻¹ (Figura 6.4 abajo). La concentración de fenoles totales obtenidas para las lechugas tipo Lollo Bionda en la solución nutritiva control fue de 43,5 a 66,6 mg EAG 100 g⁻¹ MF y coincide con los valores reportados por Ninfali *et al.* (2005) de 54,7; 44,2; 55,6 y 66,2 mg EAG 100 g⁻¹ MF para lechugas tipo Romana, Cappuccio estiva 'Kagnran', Catalogna y Cocarde obtenidas de un mercado local en Italia. Por su parte, los valores obtenidos para las lechugas tipo Lollo Bionda cultivadas en los tratamientos con NaCl varió entre 65,1 y 140,5 mg EAG 100 g⁻¹ MF (Figura 6.4 arriba), valores coincidentes con los encontrados por Llorach *et al.* (2008) de 18,2; 63,5 y 125,5 mg EAG 100 g⁻¹ MF en lechugas tipo Iceberg, Romana y Continental cosechadas en Murcia, España.

Por otro lado, Liu *et al.* (2007) reportaron una concentración de fenoles totales entre 210 y 857 mg EAG 100 g⁻¹ MF para diferentes lechugas de hojas rojas ('New Red Fire', 'Rave', 'Vulcan', 'Black Jack' y 'Galactic'), mientras que Llorach *et al.* (2008) determinaron que la concentración total de fenoles para lechugas tipo Lollo Rosso, fue de 571 mg EAG 100 g⁻¹ MF, valores mayores a los encontrados en este estudio que variaron entre 288,2 y 468,8 mg EAG 100 g⁻¹ MF (Figura 6.4 abajo). Las diferencias encontradas con los resultados publicados por estos autores pueden deberse a que la concentración de compuestos fenólicos es afectada por la época de cultivo, la genética del cultivar estudiado y los métodos de extracción utilizados (Liu *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2016; Yang *et al.*, 2021).

Además, al comparar los cultivares, el cultivar 'Levistro' de hojas verdes presentó concentraciones significativamente menores de fenoles totales que 'Carmolí' de hojas rojas (Figura 6.4), lo cual concuerda con los resultados presentados por Kim *et al.* (2018) donde los cultivares de lechuga roja tuvieron mayores concentraciones de fenoles totales, con un valor promedio de 524 mg EAG 100 g⁻¹ MF, seguido por los cultivares rojos/verdes con un promedio de 227 mg EAG 100 g⁻¹ MF. En contraste, los cultivares de hoja verde tuvieron el promedio más bajo de 133 mg EAG 100 g⁻¹ MF. Otros autores como Llorach *et al.* (2008), Kim *et al.* (2016), Yang *et al.* (2021) y los publicados en la página del portal antioxidantes del INTA (INTA, 2021) también muestran una mayor concentración de fenoles totales en las lechugas rojas por sobre las verdes.

Al comparar la capacidad antioxidante (CA) de los extractos metanólicos se observó que la capacidad antioxidante determinada por FRAP (Figura 6.5) presentó un incremento significativo sólo en las lechugas verdes ('Levistro') a concentraciones de NaCl de 0,075 y 0,1 mol L⁻¹ de NaCl y alcanzando valores superiores a los 200 mg eq Trolox 100 g⁻¹ MF. Estos valores coinciden con los reportados por Llorach *et al.* (2008) de 98, 114 y 320 mg eq Trolox 100 g⁻¹ MF para lechugas verdes de tipo Iceberg, Romana y Continental, respectivamente. Para el cultivar 'Carmolí', no se observaron diferencias significativas entre tratamientos de NaCl, registrando una capacidad antioxidante entre 550 y 800 mg eq Trolox 100 g⁻¹ (Figura 6.5), valores similares a los 810 mg eq Trolox 100 g⁻¹ encontrados por Llorach *et al.* (2008) para lechugas tipo Lollo Rosso. Respecto de la capacidad antioxidante, 'Levistro' registró valores significativamente menores que 'Carmolí', resultado esperado entre lechugas verdes y rojas (Llorach *et al.*, 2008; INTA, 2021).

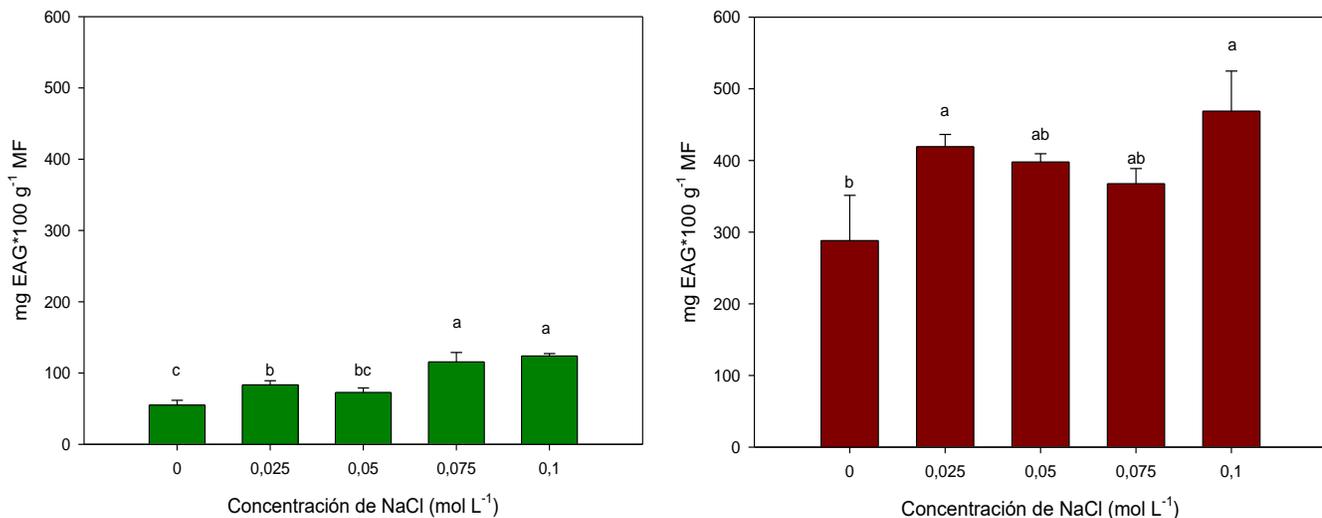


Figura 6.4. Concentración de fenoles totales en lechugas tipo Lollo Bionda cv. 'Levistro' y Lollo Rosso cv. 'Carmolí' (abajo) cultivadas con diferentes concentraciones de NaCl.

Gráfica de la concentración de fenoles totales expresado como miligramos equivalentes de ácido gálico (mg EAG 100 g⁻¹ MF) en lechugas tipo Lollo Bionda cv. 'Levistro' (arriba) y Lollo Rosso cv. 'Carmolí' (abajo) cultivadas con diferentes concentraciones de NaCl (mol L⁻¹). Barras representan medias de 5 réplicas biológicas para cada tratamiento. ^{a,b,c} Letras diferentes corresponden a diferencias significativas determinadas por la prueba de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher con un nivel de significancia de $p < 0,05$.

La capacidad antioxidante medida por DPPH (Figura 6.6) respondió tanto a la concentración de NaCl de la solución nutritiva como al cultivar. Al igual que la CA medida por FRAP, la determinación por DPPH presentó un compartimento similar la concentración de fenoles. Específicamente el cultivar 'Levistro' presentó valores entre 169 y 340 mg eq Trolox 100 g⁻¹ MF (Figura 6.6), similares a los reportados por Llorach *et al.* (2008) de 68,6; 99,7 y 244 mg eq Trolox 100 g⁻¹ MF para lechugas verdes tipo Iceberg, Romana y Continental. Por otro lado, el cultivar 'Carmolí' presentó valores entre 549 y 750 mg eq Trolox 100 g⁻¹ MF (Figura 6.6), ligeramente menores a los 770 mg eq Trolox 100 g⁻¹ MF reportados previamente para lechuga Lollo Rosso por Llorach *et al.* 2008. Las diferencias encontradas en la capacidad antioxidante entre ambos métodos de determinación, FRAP y DPPH, se deberían a que miden diferentes propiedades de los antioxidantes presentes en los extractos. El método de FRAP mide la capacidad de los compuestos para reducir el hierro desde la forma férrica a la ferrosa a pH bajo (Benzie y Strain, 1996), mientras que el método de DPPH mide la capacidad de los compuestos antioxidantes de atrapar radicales libres (Gupta y Prakash, 2009).

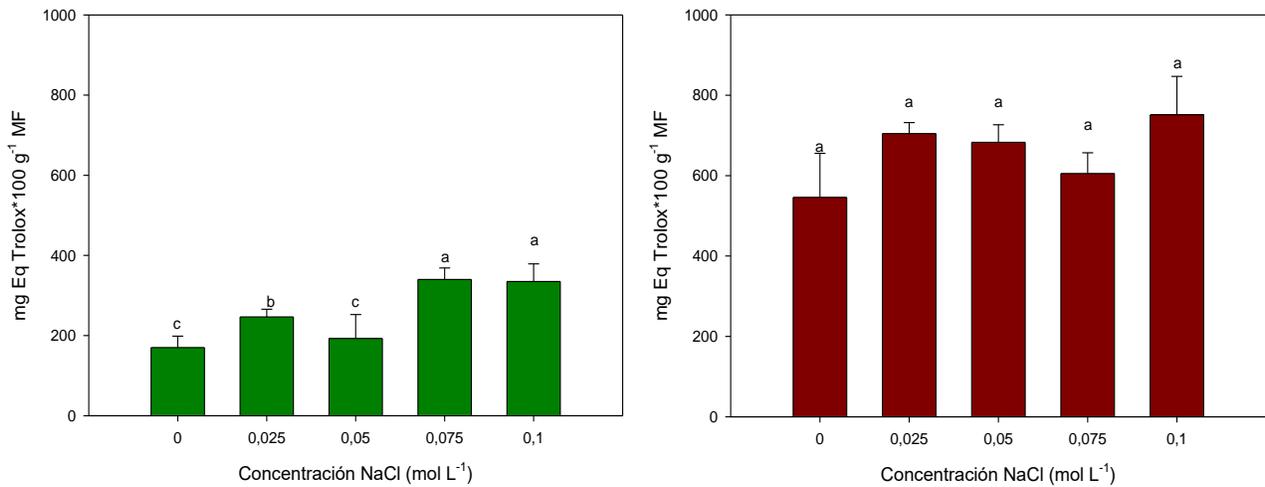


Figura 6.5. Capacidad antioxidante determinada por el método de FRAP para lechugas tipo Lollo Bionda cv. 'Levistro' y Lollo Rosso cv. 'Carmoli' cultivadas con diferentes concentraciones de NaCl.

Gráfica de la determinación capacidad antioxidante mediante el método de FRAP, expresado en miligramos equivalentes de Trolox por cada 100 gramos de masa fresca (mg eq Trolox 100g⁻¹ MF) en lechugas tipo Lollo Bionda cv. 'Levistro' (arriba) y Lollo Rosso cv. 'Carmoli' (abajo) cultivadas con diferentes concentraciones de NaCl (mol L⁻¹). Barras representan medias de 5 réplicas biológicas para cada tratamiento. ^{a,b} Letras diferentes corresponden a diferencias significativas determinadas por la prueba de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher con un nivel de significancia de $p < 0,05$.

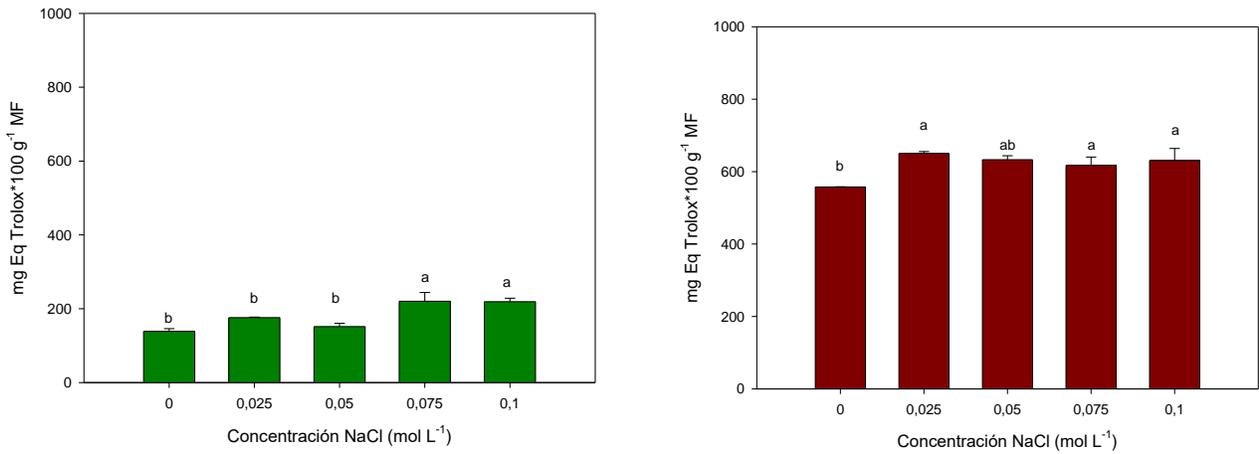


Figura 6.6. Capacidad antioxidante determinada por el método de DPPH para lechugas tipo Lollo Bionda cv. 'Levistro' y Lollo Rosso cv. 'Carmoli' cultivadas con diferentes concentraciones de NaCl.

Gráfica de la determinación capacidad antioxidante mediante el método de DPPH, expresado en miligramos equivalentes de Trolox por cada 100 gramos de masa fresca (mg eq Trolox 100g⁻¹ MF) en lechugas tipo Lollo Bionda cv. 'Levistro' (arriba) y Lollo Rosso cv. 'Carmoli' (abajo) cultivadas con diferentes concentraciones de NaCl (mol L⁻¹). Barras representan medias de 3 réplicas biológicas para cada tratamiento). ^{a,b} Letras diferentes corresponden a diferencias significativas determinadas por la prueba de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher con un nivel de significancia de $p < 0,05$.

6.1.4.- Conclusiones

Los resultados sugieren que para los cultivares 'Levistro' y 'Carmolí', una solución nutritiva suplementada 0,1 mol L⁻¹ de NaCl no reduciría de manera significativa el rendimiento, pudiendo crecer en conductividades eléctricas de hasta 12,86 dS m⁻¹ siendo cultivares tolerantes al NaCl. Por otro lado, se encontraron diferencias de masa fresca y seca entre cultivares, presentando el cultivar de hojas rojas valores menores respecto al verde.

La concentración de compuestos fenólicos totales en lechugas estaría influenciada tanto por el cultivar como por la concentración de NaCl en la solución nutritiva. En el caso de las lechugas tipo Lollo Bionda, se observó un aumento en la concentración de compuestos fenólicos totales a medida que aumentó la concentración de NaCl. Por otro lado, en las lechugas tipo Lollo Rosso, se encontró un incremento significativo en la concentración de compuestos fenólicos totales al aplicar el tratamiento con NaCl. Finalmente, se encontraron diferencias significativas en la capacidad antioxidante (CA) de los extractos metanólicos en función del cultivar y la concentración de NaCl. La CA medida por el método FRAP mostró una correlación positiva con la concentración de compuestos fenólicos totales. En las lechugas verdes, se observó un aumento significativo de la CA a concentraciones altas de salinidad, mientras que en las lechugas rojas no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos salinos destacando un comportamiento diferencial solo entre cultivares.

6.1.5.- Bibliografía

- Ainsworth, E.A., and Gillespie, K. M., 2007. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent. *Nat. Protoc.* 2, 875- 877. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.102>
- Al-Maskri, A., Al-Kharusi, L., Al-Miqbali., H., Khan, M.M. 2010. Effects of salinity stress on growth of lettuce (*Lactuca sativa*) under closed-recycle nutrient film technique. *Int. J. Agric. Biol.* 12, 377–380. http://www.fsublishers.org/published_papers/90819..pdf
- Bartha, C., Fodorpataki, L., Martinez-Ballesta, M., Popescu, O., and Carvajal, M. 2015. Sodium accumulation contributes to salt stress tolerance in lettuce cultivars. *J. Appl. Bot. Food Qual.* 88, 42-48. <https://doi.org/10.5073/JABFQ.2015.088.008>
- Benzie, I.F. and Strain, J.J., 1996. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of 'Antioxidant Power': The FRAP Assay. *Anal. Biochem.* 239, 70–76. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>
- Carranza, C., Lancho, O., Miranda, D., Chaves, B. 2009. Análisis del crecimiento de lechuga (*Lactuca sativa* L.) "Batavia" cultivada en un suelo salino de la Sabana de Bogotá. *Agron. Colomb.* 27, 1. <https://revistas.unal.edu.co/index.php/agrocol/article/view/11330>
- Galièni, A., Di Mattia, C., De Gregorio, M., Specca, S., Mastrocola, D., Pisante, M., Stagnari, F. 2015. Effects of nutrient deficiency and abiotic environmental stresses on yield, phenolic compounds, and antiradical activity in lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Sci. Hort.* 187, 93-101. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.02.036>
- Gupta, S. and Prakash, J. 2009. Studies on Indian Green Leafy Vegetables for Their Antioxidant Activity. *Plant Foods Hum. Nutr.* 64, 39-45.
- INTA, Portal Antioxidantes, Base de Datos de Hortalizas (2021). Consultado el 30 de marzo de 2023. Disponible en <http://www.portalantioxidantes.com/base-de-datos-de-actividad-antioxidante-orac-y-de-contenido-de-polifenoles-totales-pft-en-hortalizas-2/>.
- ISTA. Chapter 5: The Germination Test. In rules proposal for the international rules for seed testing; International Rules Seed Testing: Bassersdorf, Switzerland, 2017: 1–62. <https://doi.org/10.15258/istarules.2017.05>
- Kim, M., Moon, Y., Tou, J., Mou, B., and Waterland, N. 2016. Nutritional value, bioactive compounds, and health benefits of lettuce (*Lactuca sativa* L.). *J. Food Compos. Anal.* 49, 19-34. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2016.03.004>
- Kim, D. E., Shang, X., Assefa, A. D., Keum, Y. S., & Saini, R. K. 2018. Metabolite profiling of green, green/red, and red lettuce cultivars: Variation in health beneficial compounds and antioxidant potential. *Food Res. Int.* 105, 361–370. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.11.028>
- Liu, X., Ardo, S., Bunning, M., Parry, J., Zhou, K., Stushnoff, C., Stoniker, F., Yu, L., Kendall, P. 2007. Total phenolic content and DPPH* radical scavenging activity of lettuce (*Lactuca sativa* L.) grown in Colorado. *LWT Food Sci. Technol.* 40, 552-557. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2005.09.007>
- Llorach, R., Martínez-Sánchez, A., Tomás-Barberán, F., Gil, M., Ferreres, F. 2008. Characterization of polyphenols and antioxidant properties of five lettuce varieties and escarole. *Food Chem.* 108, 1028-1038. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.11.032>
- Ninfali, P., Mea, G., Giorgini, S., Rocchi, M., Bacchiocca, M. 2005. Antioxidant capacity of vegetables, spices and dressings relevant to nutrition. *Br. J. Nutr.* 93, 257-266 <https://doi.org/10.1079/BJN20041327>
- Mulabagal, V., Ngouajio, M., Nair, A., Zhang, Y., and Gottumukkala, A. 2010. In vitro evaluation of red and green lettuce (*Lactuca sativa*) for functional food properties. *Food Chem.* 118, 300-306. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.04.119>

Pasternak, D., De Malach, Y., Borovic, I., Shram, M., Aviram, C. 1986. Irrigation with Brackish water under desert conditions IV. Salt Tolerance Studies with Lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Agric. Water Manag.* 11, 303-311.

Pérez-López, U., Pinzino, C., Quartacci, F., Ranieri, A., Sgherri, C. 2014. Phenolic composition and related antioxidant properties in differently colored lettuces: A Study by Electron Paramagnetic Resonance (EPR) Kinetics. *J. Agric. Food Chem.* 62, 12001–12007 <https://doi.org/10.1021/jf503260v>

Shabala, S., Wu, H., and Bose, J. 2015. Salt stress sensing and early signaling events in plant roots: Current knowledge and hypothesis. *Plant Sci.* 241, 109-119. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2015.10.003>

Sonneveld, C., and Straver, N. 1994. Nutrient solutions for vegetables and flowers grown in water or substrates. 10th ed. Series: Voedingsoplossingen Glastuinbouw N°8. PBG, Aalsmeer, Naaldwijk, The Netherlands.

Tanji, K. K. and Kielen, N.C. 2002. Agricultural drainage water management in arid and semi-arid areas. FAO Corporate Document Repository. FAO Irrigation and Drainage Paper 61. <https://www.fao.org/3/y4263e/y4263e00.htm>

Torres, A.; Acevedo, E. El problema de salinidad en los recursos suelo y agua que afectan el riego y cultivos en los valles de Illuta y azapa en el norte de Chile. 2008. *IDESIA.* 26, 31-44.

Xu, C., Mou, B. 2015. Evaluation of Lettuce Genotypes for Salinity Tolerance. *HortScience* 50, 1441–1446. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.50.10.1441>

Yang, X., Gil, M.I., Yang, Q., Tomás-Barberán, F. 2021. Bioactive compounds in lettuce: Highlighting the benefits to human health and impacts of preharvest and postharvest practices. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 21, 4–45. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12877>

6.2.- Efecto de la aplicación de diferentes concentraciones de cloruro de sodio (NaCl) y la realización de cosechas sucesivas sobre el rendimiento y concentración de compuestos fenólicos de lechugas Lollo Bionda cv. 'Levistro' y Lollo Rosso cv. 'Carmoli'

6.2.1.- Introducción

La lechuga es una de las hortalizas de hoja más populares del mundo (Mulabagal *et al.*, 2010; Pérez-López *et al.*, 2014). Sin embargo, su cultivo puede verse afectado negativamente por la salinidad del suelo y del agua de riego (Shabala *et al.*, 2015). Siendo el cloruro de sodio (NaCl) la sal más distribuida (Muuns y Tester, 2008). Algunos reportes han mostrado que la lechuga es una hortaliza relativamente sensible a la salinidad, presentando un umbral de tolerancia de 1,0 a 1,4 dS m⁻¹ (Tanji y Kielen, 2002), otros la han clasificado como moderadamente tolerante, pudiendo tolerar una CE de 2,16 dS m⁻¹ (Carranza *et al.*, 2009). Otros estudios como el de Pasternak *et al.* (1986) han demostrado que algunos cultivares de lechuga, como la variedad Iceberg y romana, puede tolerar CE más elevadas. Según el estudio de estos autores la variedad Iceberg puede tolerar una CE de hasta 4,4 dS m⁻¹ sin afectar su rendimiento y/o calidad, mientras que la lechuga tipo romana puede soportar incluso 10,5 dS m⁻¹ sin una reducción significativa en su rendimiento. Otras investigaciones como la de Xu y Mou, (2015), donde evaluaron la tolerancia a la salinidad por cloruro de sodio de 178 cultivares de lechuga (56 de tipo Mantequilla, 39 de tipo Iceberg, 35 de tipo Romana, 33 de hoja suelta y 15 de tipos silvestres) confirmaron que los diferentes genotipos difieren en su sensibilidad a la salinidad, resaltando la importancia de seleccionar cultivares tolerantes y de gestionar adecuadamente el agua de riego.

Puesto que la salinidad genera un desequilibrio osmótico, las diferencias en la tolerancia a la salinidad entre variedades y cultivares, podrían estar relacionadas con la capacidad de sintetizar y acumular compuestos de tipo osmoreguladores, como la prolina, capaces de combatir el estrés osmótico y la deshidratación de las células (Butcher *et al.*, 2016). Este compuesto osmoregulador participa además en la protección, estabilización y mantención de la integridad de las membranas y estructuras subcelulares, como también en la estabilización de enzimas y proteínas, permitiendo que puedan seguir cumpliendo sus funciones y como consecuencia la supervivencia de la planta (Ashraf y Foolad, 2007; Munns y Tester, 2008; Lucini y Bernardo, 2015). Por otro lado, tanto el estrés osmótico con el estrés iónico generado por el cloruro de sodio, provocan una sobre producción de especies reactivas de oxígeno, las cuales deben ser eliminadas para asegurar la supervivencia de la planta (Sharma *et al.*, 2012). En este sentido, los compuestos antioxidantes como los fenoles juegan un rol fundamental en la tolerancia a este tipo de estrés ya que protegen los tejidos y las diferentes estructuras celulares del daño oxidativo (Miller *et al.*, 2010; Sharma *et al.*, 2012). Así, las plantas tolerantes a la sal, muestran una mayor capacidad para sintetizar y acumular este tipo de compuestos (Miller *et al.*, 2010; Sharma *et al.*, 2012).

Adicionalmente, junto con la síntesis de compuestos osmoreguladores, y de compuestos fenólicos, otro factor capaz de interferir en la tolerancia diferencial a la salinidad de los diferentes cultivares es la capacidad de generar cambios en la pared celular. En este sentido, Zörb *et al.* (2015) observaron que, en híbridos de maíz sensibles a la salinidad, las paredes celulares epidérmicas son más rígidas que las de las plantas menos sensibles.

Dado que la mayoría de las variedades de lechugas cultivadas comercialmente crecen en condiciones no salinas, existe una limitada información disponible sobre la respuesta al estrés salino de las diferentes variedades (Bartha *et al.*, 2015). Si bien existen algunos estudios sobre la respuesta del rendimiento en diferentes tipos de lechuga frente al estrés salino (Pasternak *et al.*, 1986; Tanji *et al.*, 2002; y Carranza *et al.*, 2009; Xu y Mou *et al.*, 2015), éstas se concentran en la respuesta del

rendimiento, y se ha reportado muy poco sobre la tolerancia a la salinidad en diferentes cultivares y su relación con la concentración de compuestos antioxidantes y las modificaciones en la anatomía celular foliar (Bartha *et al.*, 2015). Por otro lado, existe poca información sobre la respuesta generada por el estrés salino en la lechuga después de sucesivas cosechas. A pesar de los avances en la comprensión de la respuesta de la lechuga al estrés salino, aún existe una falta de información, especialmente en lo que respecta a los tipos de lechuga Lollo Rosso y Lollo Bionda. En este contexto, el objetivo del presente estudio fue determinar el efecto del corte generado al realizar cosechas sucesivas de hojas, en diferentes estados fenológico y la aplicación de diferentes concentraciones de NaCl (0; 0,05; 0,1 mol L⁻¹) aplicadas en la solución nutritiva sobre, la biosíntesis de compuestos y capacidad antioxidante, parámetros agronómicos y anatomía celular foliar de lechugas tipo Lollo Bionda cv. 'Levistro' y Lollo Rosso cv. 'Carmolí'. La biosíntesis de compuestos antioxidantes se determinó evaluando la concentración de fenoles, flavonoides y antocianinas totales y determinando la capacidad antioxidante por los métodos de FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) y DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo). Se analizaron también la masa fresca y seca de las lechugas como parámetros agronómicos, y para la evaluación de los cambios producidos en la anatomía celular foliar se realizó un recuento de la densidad celular y estomática y una cuantificación del espacio intercelular en el tejido foliar.

6.2.2.- Metodología

6.2.2.1- Material vegetal y condiciones de cultivo

Como se describe en la sección 4.1 el material vegetal utilizado en este experimento correspondió a lechugas de tipo Lollo Bionda cultivar 'Levistro' (hojas verdes) y de tipo Lollo Rosso cultivar 'Carmolí' (hojas rojas) de la empresa Rijk Zwaan (Chile), las cuales fueron cultivadas como se describe en la misma sección durante la temporada de otoño. Las características del invernadero donde se llevó a cabo el cultivo correspondieron a las descritas en la sección 5.2.2.1.

Las condiciones ambientales de cultivo: temperatura mínima y máxima del aire, temperatura promedio, conductividad eléctrica, oxígeno disuelto y pH de la solución nutritiva fueron registradas durante todo el periodo de cultivo se presentan en la Figura 6.7.

6.2.2.2.- Montaje del ensayo y diseño experimental

El experimento fue realizado para lechugas tipo Lollo Bionda cv. 'Levistro' y tipo Lollo Rosso cv. 'Carmolí' y fue dispuesto en tres bloques con un arreglo de parcelas divididas, donde se consideraron dos factores. El primer factor correspondió al tiempo de cosecha (1^a, 2^a, 3^a) y el segundo factor a la concentración de NaCl (0; 0,05; 0,1 mol L⁻¹) en la solución nutritiva (Sonneveld y Straver, 1994). Cada bloque representó una repetición, por lo que había tres sistemas hidropónicos de raíz flotante independientes para cada concentración de NaCl evaluada. Cada repetición consistió en una lámina de poliestireno expandido con una densidad de plantación de 50 plantas m⁻² de 0,5*1,5*0,025 m y 25 kg m⁻³ de densidad. Para la obtención de las diferentes concentraciones de cloruro de sodio (NaCl), una cantidad determinada de una solución concentrada de NaCl fue incorporada en cada uno de los reservorios hasta obtener las tres concentraciones de NaCl: 0 mol L⁻¹, utilizado como control; 0,05 mol L⁻¹ y 0,1 mol L⁻¹. Estas diferentes concentraciones de NaCl fueron seleccionadas a partir de los resultados obtenidos en la sección 6.1, donde concentraciones de 0; 0,05 y 0,1 mol L⁻¹ registraron conductividades eléctricas de 3, 9 y 13 dS m⁻¹ respectivamente.

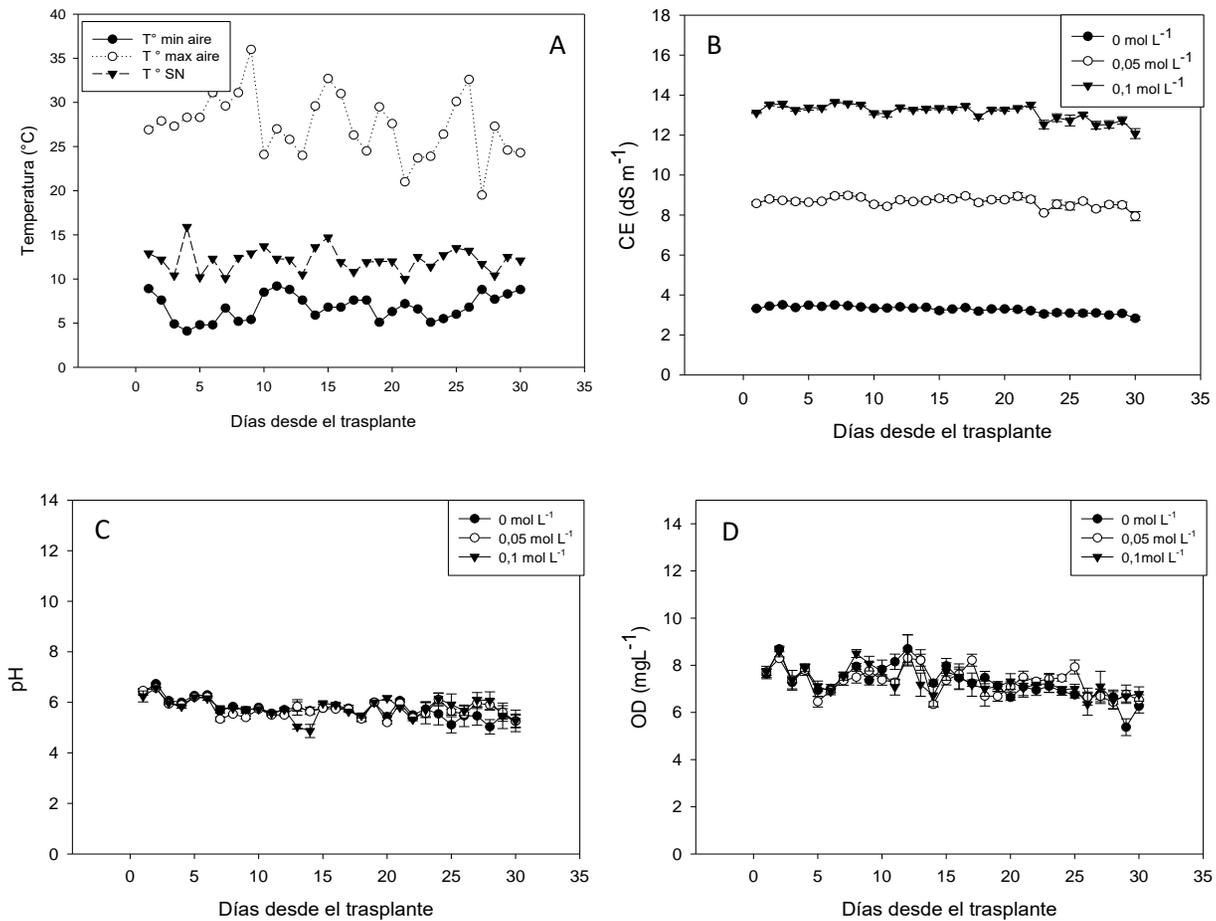


Figura 6.7. Temperaturas medias mínimas y máximas del aire en el invernadero y temperaturas de la solución nutritiva, conductividad eléctrica, pH y concentración de oxígeno disuelto de la solución nutritiva registradas durante el cultivo.

En la figura se presentan los parámetros ambientales registrados durante el cultivo de lechugas tipo Lollo Bionda cv. 'Levistro' y Lollo Rosso cv. 'Carmolí' con aplicación de diferentes concentraciones de cloruro de sodio (NaCl): 0; 0,05 y 0,1 mol L⁻¹ en la solución nutritiva. A: Temperaturas máximas y mínimas del aire dentro del invernadero y temperatura de la solución nutritiva (SN) en °C. B: Conductividad eléctrica (CE) de la SN expresada en dS m⁻¹, C: pH de la SN. D: oxígeno disuelto expresado en mg L⁻¹ presente en la SN. Puntos representan medias ± EE del registro diario, a las 10 am, de tres mediciones por repetición (n=9). Registro de temperaturas mínimas y máximas del aire realizadas con data logger.

6.2.2.3.- Parámetros de crecimiento de las plantas (MF, MS, % MS)

Luego de la aplicación de los tratamientos con NaCl, 10 días después del trasplante, se recolectaron las hojas verdaderas número 5 y 6, lo que correspondió a la primera (1ª) cosecha. La segunda (2ª) cosecha fue realizada 20 días tras el trasplante y se recolectaron las hojas verdaderas número 7 y 8. Finalmente, la tercera (3ª) y última cosecha, fue realizada luego de 30 días desde el trasplante sobre las hojas verdaderas número 9 y 10. El corte para cada cosecha fue realizado utilizando una tijera de acero inoxidable esterilizada con una solución de etanol al 70 % previo a cada corte.

Las mediciones de masa fresca (MF) y seca (MS), se realizaron como se describió en la sección 4.3. Brevemente, para cada cosecha, cinco réplicas biológicas por repetición ($n = 15$ por tratamiento) fueron seleccionados al azar y consideradas para cada determinación.

6.2.2.4.- Parámetros de color (L, C*, hue)

Los parámetros de color fueron evaluados como una característica de calidad de las hojas y determinados siguiendo la metodología descrita en la sección 5.2.2.4. Los datos fueron analizados utilizando el espacio de color CIE L*a*b* y el software SpectraMagic NX, obteniéndose los valores de luminosidad (L), saturación de color o croma (C*) y el ángulo del tono o matiz (hue) (McGuire, 1992).

6.2.2.5.-Determinación de compuestos funcionales

6.2.2.5.1- Extracción de las fracciones fenólicas

Para la extracción de compuestos fenólicos se seleccionaron tres muestras de cada repetición (9 muestras por tratamiento) siguiendo las recomendaciones de Galieni *et al.* (2015), como se describe en detalle en la sección 4.4.1. El extracto de MeOH: H₂O se almacenó a -20 °C en tubos ámbar hasta la realización de los análisis de compuestos fenólicos totales, flavonoides, antocianinas y actividad antioxidante.

6.2.2.5.2.- Determinación de la concentración de fenoles totales

La concentración de fenoles totales (FT) se midió utilizando el método propuesto por Ainsworth y Gillespie (2007), como se describe en detalle en la sección 4.4.2. Los resultados fueron expresados como miligramos equivalentes de ácido gálico por cada 100 gramos masa fresca (mg EAG 100 g⁻¹ MF).

6.2.2.5.3.- Determinación de la concentración de flavonoides totales

La concentración de flavonoides totales se midió siguiendo el método propuesto por Tharasena y Lawan (2014) como se detalla en la sección 5.2.2.5.3. Los resultados fueron expresados como miligramos equivalentes de rutina (eq Rut) en 100 gramos de masa fresca (mg eq Rut 100 g⁻¹ MF).

6.2.2.5.4.- Determinación de la concentración de antocianinas totales

La concentración de antocianinas totales se determinó utilizando el método de pH diferencial siguiendo las recomendaciones de Du *et al.* (2014) como se detalla en la sección 5.2.2.5.4. La concentración final de antocianinas se expresó como como miligramos equivalentes de cianidina-3-glucósido (eq Cian3gluc) en 100 gramos de masa fresca (mg eq Cian3gluc 100 g⁻¹ MF).

6.2.2.5.5.- Determinación de la capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante (CA) de las diferentes muestras se llevó a cabo mediante dos métodos, descritos en la sección 4.4.3.

6.2.2.5.5.1.- Método de FRAP

El método de FRAP (Ferric reducing antioxidant power) fue realizado de acuerdo con la metodología descrita por Benzie y Strain (1996) como se detalla en la sección 4.4.3.1. Los resultados fueron expresados como miligramos equivalentes de Trolox (eq Trolox) por cada 100 gramos de materia fresca (mg eq Trolox 100 g⁻¹ MF).

6.2.2.5.5.2.- Método de DPPH

Para la determinación de la de eliminación de radicales libres, se utilizó el reactivo radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) según la metodología descrita en Gupta y Prakash (2009) y detallada en la sección 4.4.3.2. Los resultados fueron expresados como miligramos equivalentes de Trolox (eq Trolox) por cada 100 gramos de materia fresca (mg eq Trolox 100 g⁻¹ MF).

6.2.2.6.- Determinación de la concentración de prolina

La concentración total de prolina se determinó según la metodología propuesta por Bates *et al.* (1973) como se detalla en la sección 5.2.2.6. Los resultados se expresaron como microgramos de prolina por cada 100 gramos de materia fresca (µg de prolina 100 g⁻¹ MF).

6.2.2.7.- Análisis de la anatomía celular foliar

La evaluación de la anatomía celular foliar fue desarrollada como se describió en detalle en la sección 5.2.2.7. Para cuantificar la densidad estomática y celular se utilizó un conjunto de 15 muestras de tejido fresco provenientes de 5 plantas por repetición. Otro conjunto de 15 muestras fue fijado en una solución de formaldehído, alcohol y ácido acético (FAA) y luego incorporado en resina.

6.2.2.7.1.- Determinación de la densidad estomática, densidad celular e índice estomático

Para determinar la densidad estomática se utilizaron 15 muestras por tratamiento, provenientes del tejido foliar de 5 plantas por repetición, siguiendo las recomendaciones de Xie *et al.* (2012) y detallado en la sección 5.2.2.7.1. Las imágenes obtenidas fueron analizadas con el programa ImageJ (Schneider *et al.*, 2012) como se detalla en la misma sección. La densidad estomática y celular fue expresada como N° de estomas mm⁻² y N° de células mm⁻², respectivamente y el índice estomático (IE) utilizando fórmula detallada en la sección (5.2.2.7.1).

6.2.2.7.2.- Análisis histológico para la determinación del espacio intercelular foliar

La determinación del espacio intercelular se realizó únicamente para las muestras provenientes de la 3ª cosecha siguiendo la metodología descrita en la sección 5.2.2.7.2. La preparación de las muestras fue realizada siguiendo las recomendaciones de Sivankalyani *et al.* (2016) y Sumner (2015) y detalladas en la misma sección. El posterior análisis histológico y determinación del espacio intercelular fue realizado utilizando el programa de procesamiento de imágenes ImageJ versión v1.51j8 (Schneider *et al.*, 2012) como se describe en la sección 5.2.2.7.2.

6.2.2.8.- Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando el software InfoStat versión 2017 (Di Rienzo *et al.*, 2017) como se describe en la sección 4.4.4.

6.2.3.- Resultados y discusión

6.2.3.1.- Efecto del cloruro de sodio y el tiempo de cosecha en lechugas tipo Lollo Bionda y Lollo Rosso

6.2.3.1.1.- Parámetros de crecimiento de las plantas

En términos generales, el cultivar 'Levistro' presentó una masa fresca (MF) significativamente mayor que el cultivar 'Carmolí' (Figura 6.8 A, B). Como resultado de las cosechas sucesivas, el cultivar 'Levistro', mostró un incremento significativo en la MF, sin embargo, presentó una disminución con la incorporación de NaCl en la solución nutritiva, independiente de la concentración. En la primera cosecha, la MF de las plantas de este cultivar, tratadas con 0,05 y 0,1 mol L⁻¹ NaCl, disminuyó significativamente entre un 32 % y 41 % con respecto al control (0 mol L⁻¹ NaCl), sin embargo, no hubo diferencias significativas entre ambos tratamientos. Con respecto a la segunda y tercera cosecha, se observó un comportamiento similar a la primera cosecha (Figura 6.8 A). En las lechugas del cultivar 'Carmolí' del tratamiento control (0 mol L⁻¹ NaCl), la segunda y tercera cosechas registraron valores de MF significativamente mayores que la primera cosecha. Incremento no observado en los tratamientos con 0,05 y 0,1 mol L⁻¹ NaCl (Figura 6.8 B). Por otro lado, se observó una disminución significativa de MF en las plantas tratadas con NaCl con respecto al control (Figura 6.8 B). La reducción de la MF en plantas de lechuga debido a la incorporación de NaCl en concentraciones de 0,05 y 0,1 mol L⁻¹ fue confirmada por Kim *et al.* (2008) en lechuga romana y Al-Maskri *et al.* (2010) en lechuga costina cv. 'Paris Islands'. Bartha *et al.* (2015) también reportó que una alta concentración de NaCl en la solución nutritiva como 0,05 y 0,1 mol L⁻¹ es capaz de reducir significativamente la tasa de crecimiento en masa fresca de los brotes en cinco cultivares de lechuga: 'Asparagina', 'Valdor', 'Salad B. Red', 'Paris Island' y 'Parella Green'.

Diversos estudios han proporcionado evidencia de que la salinidad reduce el crecimiento de las plantas debido a una inducción de estrés osmótico, que limita la absorción de agua y la alteración en la homeostasis iónica, el desequilibrio iónico y la toxicidad causada por los iones Na⁺ y Cl⁻ en altas concentraciones dentro de las células vegetales (Munns y Tester, 2008; Kim *et al.*, 2008). A medida que aumenta la concentración de sales en la solución nutritiva, en este caso de NaCl, el potencial osmótico se vuelve más negativo, lo que provoca una reducción en el contenido de agua de la hoja (Garrido *et al.*, 2013). Por otro lado, el cloruro de sodio aumenta la concentración de iones Na⁺ y Cl⁻ en la zona radicular provocando un desequilibrio nutricional (Lucini *et al.*, 2015). Estos efectos negativos del NaCl en el crecimiento de las plantas podrían generar una reducción en la conductancia estomática y, por lo tanto, en la transpiración y en la ganancia de CO₂ (Garrido *et al.*, 2013).

Por otro lado, tanto el tiempo de cosecha como la concentración de NaCl, afectaron el porcentaje de MS. Ambos cultivares presentaron un incremento en el % MS, con respecto al control cuando, se agregó de NaCl a la solución nutritiva. Sin embargo, no hubo diferencias significativas entre las diferentes concentraciones de NaCl evaluadas (0,05 y 0,1 mol L⁻¹) (Figura 6.8 C, D). El aumento en el % MS de las hojas de lechuga cultivadas con soluciones salinas de 0,05 y 0,1 mol L⁻¹, encontrado para el cv. 'Levistro' fue informado previamente por Al-Maskri *et al.* (2010) para 'Paris Islands' y por Bartha *et al.* (2015) para 'Asparagina', 'Valdor', 'Salad B. Red', 'Paris Island' y 'Parella

Green'. Sin embargo, para los cultivares evaluados por estos autores, el incremento en la masa seca fue dependiente de la concentración de NaCl utilizada mientras que para el cultivar 'Levistro' y 'Carmoli' no se encontraron diferencias en % MS entre 0,05 y 0,1 mol L⁻¹ NaCl. El aumento de MS registrado en las hojas de plantas cultivadas con NaCl podría deberse a la acumulación de iones y osmolitos compatibles como proteínas, aminoácidos (prolina) y azúcares, como resultado de la activación de mecanismos protectores frente al estrés salino (Parida y Das, 2005). Asimismo, se registró un % MS más bajo en la primera cosecha en comparación con las siguientes, mostrando diferencias entre los diferentes estados fenológicos de la planta y el estrés causado por el corte de las sucesivas cosechas. En este sentido, Sakalauskaitė *et al.* (2012) reportó que, un estrés como la radiación UV-B, aplicado en diferentes estados de desarrollo de plantas de albahaca genera respuestas diferenciales en los parámetros de crecimiento como área foliar y masa fresca y seca.

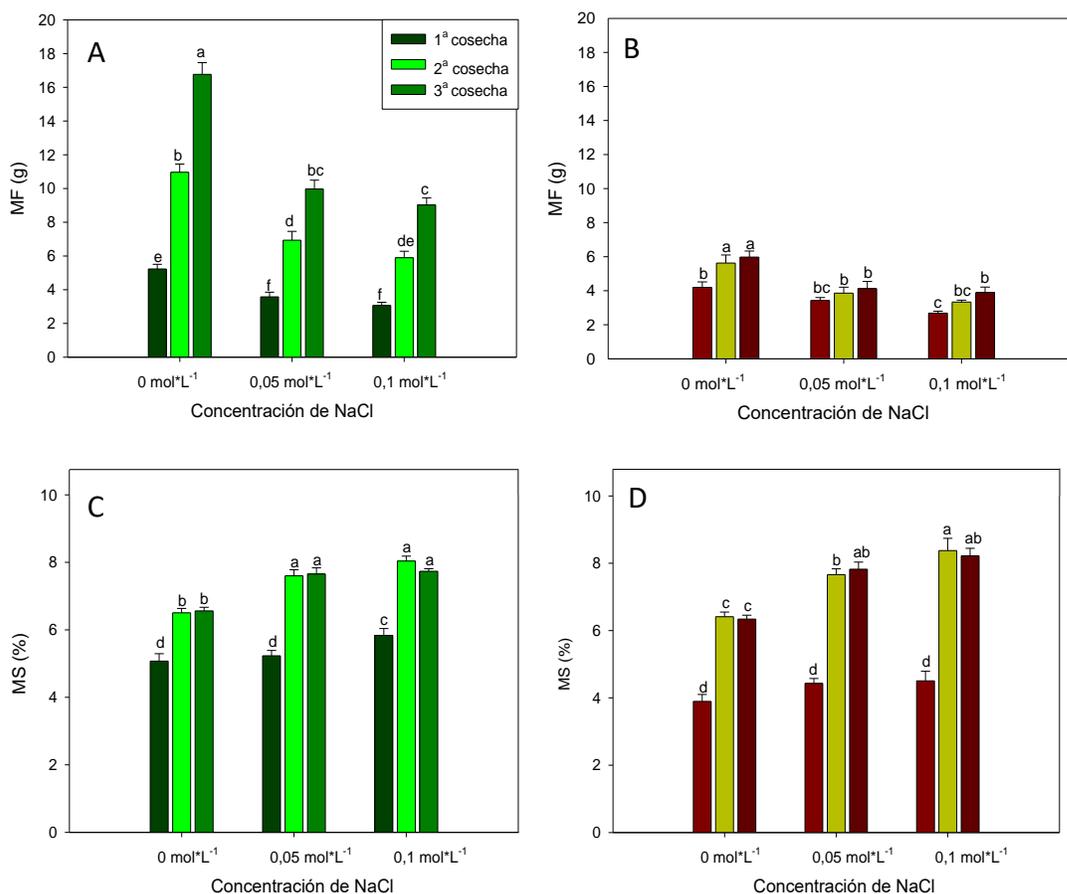


Figura 6.8. Masa fresca (MF) y porcentaje de masa seca (%MS) de lechugas Lollo Bionda 'Levistro' y Lollo Rosso 'Carmoli' durante tres tiempos de cosecha cultivadas con diferentes concentraciones de NaCl.

Las gráficas muestran la materia fresca (MF) (A, B) y porcentaje de masa seca (%MS) (C, D) de lechugas Lollo Bionda cv. 'Levistro' (A, C) y Lollo Rosso cv. 'Carmoli' (B, D) cultivadas con diferentes concentraciones de NaCl en la solución nutritiva durante varias cosechas sucesivas (1^a, 2^a, 3^a cosecha). Barras representan medias (\pm EE) de 5 réplicas biológicas por repetición ($n=15$). ^{a,b,c,d} Letras diferentes corresponden a diferencias significativas determinadas por la prueba de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher con un nivel de significancia de $p < 0,05$.

6.2.3.1.2.- Parámetros de color

Considerando la evaluación de los parámetros de color, el cultivar 'Levistro' presentó un mayor valor de luminosidad (L) en el control (0 mol L⁻¹ NaCl) en comparación con los tratamientos con NaCl, los cuales revelaron mayor oscurecimiento (Figura 6.9 A). Por otro lado, para el control, el mayor valor de luminosidad se registró en la tercera cosecha (Figura 6.9 A). A diferencia del cambio en luminosidad registrado para el cultivar 'Levistro', para 'Carmolí' no se encontraron diferencias significativas en este parámetro cuando se aplicaron los tratamientos con 0,05 o 0,1 mol L⁻¹ NaCl (Figura 6.9 D).

Para el parámetro de saturación del color o croma, el cultivar 'Levistro' tratado con 0,1 mol L⁻¹ de NaCl, registró valores significativamente menores que cuando fue tratado con 0,05 mol L⁻¹ de NaCl y ambos tratamientos registraron valores más bajos que el control (0 mol L⁻¹) (Figura 6.9 B). Por su parte el cultivar 'Carmolí' también presentó valores más bajos de saturación del color cuando las plantas fueron tratadas con NaCl, independiente de la concentración, indicando un color menos intenso que el control (Figura 6.9 E). Según los reportes de Garrido *et al.* (2013), las lechugas verdes, variedad Capitata cultivar 'Tempo neutro', presentaron una reducción progresiva en la concentración de clorofila a medida que aumentó la concentración de NaCl 0; 0,05; 0,1 y 0,15 mol L⁻¹ de sal, lo cual podría explicar la disminución encontrada en los valores de saturación del color del cultivar de hojas verdes.

Respecto a los valores de ángulo hue o tono, las lechugas 'Levistro' cultivadas con NaCl, presentaron valores significativamente mayores comparadas con las del control (0 mol L⁻¹). Los valores registrados, entre 106 y 108° corresponden a tonalidades amarillas-verdes (Figura 6.9 C) (McGuire, 1992). Por el contrario, el cultivar 'Carmolí' no mostró diferencias en el ángulo hue entre los tratamientos con NaCl y el control. Los valores registrados para este cultivar, fueron entre 15 y 17°, correspondientes a valores de tonalidad roja (Figura 6.9 F) (McGuire, 1992).

Según los reportes de Pinto *et al.* (2014) existiría una relación directa entre la concentración de pigmentos coloreados como clorofilas y carotenoides en diferentes condiciones ambientales y estadios fenológicos, lo que podría estar relacionado con estos cambios de color. Por otro lado, Mulabagal *et al.* (2010) indicaron que los compuestos fenólicos, específicamente las antocianinas, con alto poder antioxidante, son los pigmentos responsables de dar a los cultivares de lechuga de hojas rojas su coloración, haciendo de la medición del color una medición sencilla para estimar la concentración de pigmentos de interés como la clorofila, los carotenoides y las antocianinas.

6.2.3.1.3.- Concentración de fenoles, flavonoides, antocianinas totales y capacidad antioxidante

La concentración de compuestos antioxidantes presentó diferencias significativas entre ambos cultivares. En este sentido, el cultivar 'Carmolí' presentó una mayor concentración de fenoles totales, entre 380 y 750 mg EAG 100 g⁻¹ MF, que el cultivar 'Levistro', el cual presentó valores entre 230 y 340 mg EAG 100 g⁻¹ MF (Tabla 6.3). Estos valores indican que el cultivar 'Carmolí' registró entre 1,6 y 2,2 veces una mayor concentración de fenoles totales respecto a 'Levistro'. Los resultados anteriores fueron consistentes con los encontrados por Liu *et al.* (2007), quienes reportaron grandes variaciones en la concentración de fenoles totales entre cultivares de diferente color. Así, las variedades rojas: 'Galactic', 'Black Jack', 'New Red Fire', 'Vulcan' y 'Rave' presentaron valores entre 55,2 y 85,7 mg EAG g⁻¹ MS, mientras que las de variedades verdes: 'Envy', 'Green Vision', 'Two Star', 'Marin', 'Crisp & Green', 'Concept' y 'Thai Green' presentaron valores entre 21,0 y 34,70 mg EAG g⁻¹ MS. Por su parte Llorach *et al.* (2008) también presentaron importantes diferencias entre cultivares de hojas verdes y rojas, registrando valores entre 18,2 y 125,5 mg EAG 100 g⁻¹ MF para las variedades verdes de tipo Iceberg, Romana y Continental, y entre 322,1 y 571,2 mg EAG 100 g⁻¹ MF para las variedades rojas, hoja de roble roja y Lollo Rosso, respectivamente.

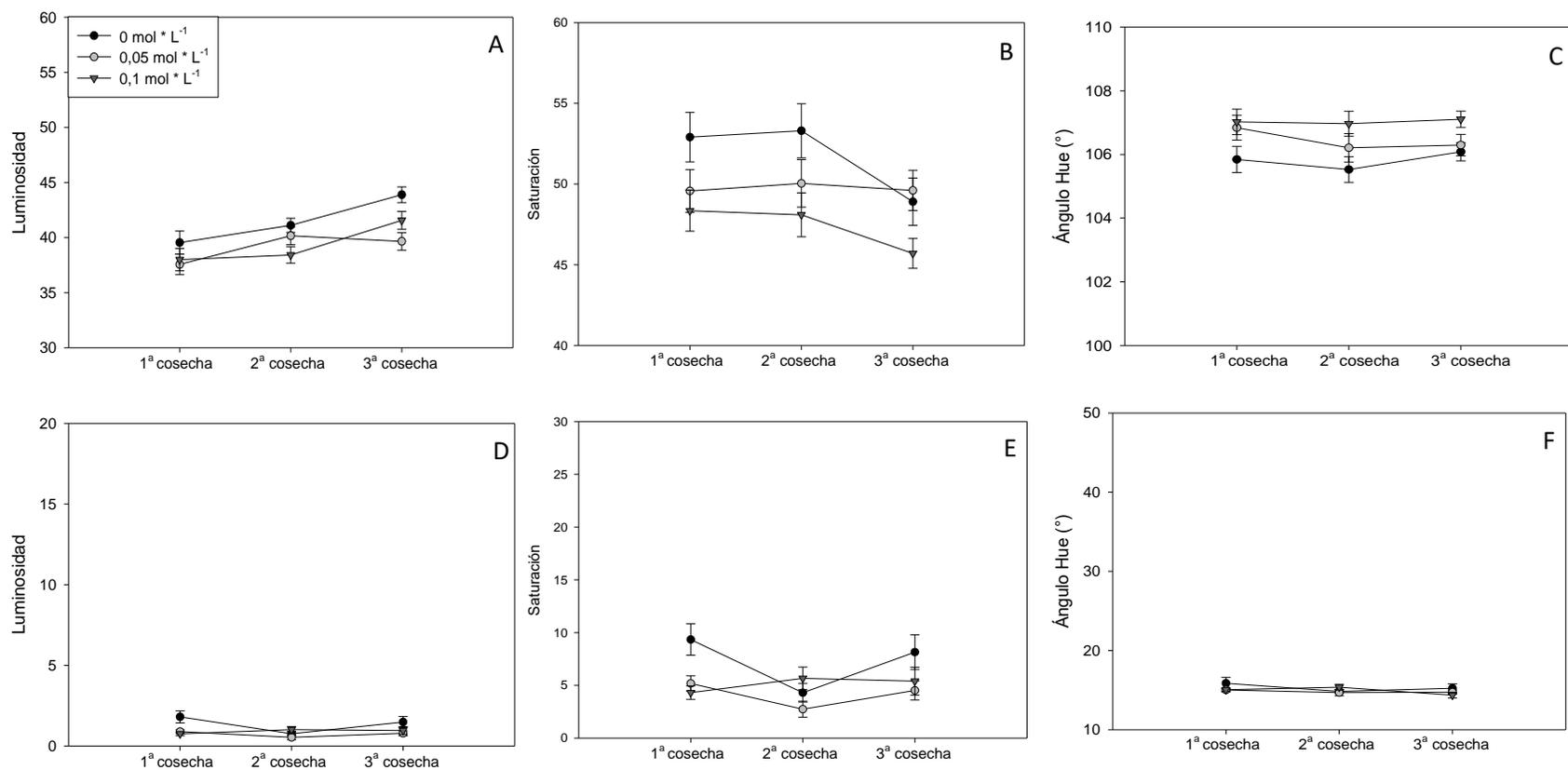


Figura 6.9. Luminosidad, saturación o croma y ángulo hue en lechugas Lollo Bionda cv. 'Levistro' y Lollo Rosso cv. 'Carmolí' durante tres tiempos de cosecha cultivadas con diferentes concentraciones de NaCl.

Las gráficas muestran los valores medios (\pm EE) de los diferentes parámetros que definen el color: Luminosidad (A, D); Saturación o croma (B, E); y ángulo hue (C, F). De lechugas cv. 'Levistro' (A-C) y cv. 'Carmolí' (D-F) cultivadas con la aplicación de diferentes concentraciones de NaCl en la solución nutritiva y durante varias cosechas sucesivas (1ª, 2ª, 3ª cosecha).

Con respecto al control (0 mol L⁻¹ de NaCl) la concentración de FT en el cultivar 'Levistro' (Tabla 6.3) fue significativamente mayor cuando hubo un tratamiento salino, independiente de la concentración de NaCl y alcanzó su mayor concentración a 0,05 mol L⁻¹ de NaCl (303,7 mg EAG 100 g⁻¹ MF). Además, presentó una respuesta significativa frente tiempo de cosecha. Así, después de la tercera cosecha, se registró la mayor concentración de FT de 316,2 mg EAG 100 g⁻¹ MF (Tabla 6.3). Por su parte el cultivar 'Carmolí' presentó interacción entre el factor concentración de NaCl y el tiempo de cosecha, registrando los mayores valores en la tercera cosecha en las lechugas cultivadas con NaCl, pero independiente de la concentración de NaCl aplicado (728-753 mg EAG 100 g⁻¹ MF). Los valores de FT encontrados para el cultivar 'Levistro' fueron mayores que los informados por Liu *et al.* (2007), Złotek *et al.* (2014) y Kim *et al.* (2016) para lechugas verdes. En el reporte de Liu *et al.* (2007) las concentraciones de fenoles totales, calculadas considerando un contenido de agua del 95% en la lechuga, fueron entre 105 y 173,5 mg 100 g⁻¹ MF para las variedades verdes. Por su parte, las concentraciones de fenoles totales reportadas por Złotek *et al.* (2014) para una lechuga verde tipo mantecosa, correspondieron a concentraciones entre 40 y 140 mg 100 g⁻¹ MF. Mientras que Kim *et al.* (2016), reportaron entre 52 y 100 mg 100 g⁻¹ MF para lechuga tipo mantecosa; 10 y 45 mg 100 g⁻¹ MF para lechuga Romana y entre 42 y 100 mg 100 g⁻¹ MF para lechuga de hoja suelta.

En relación al cultivar 'Carmolí' se encontraron valores entre 380 y 750 mg EAG 100 g⁻¹ MF (Tabla 6.3), valores que coincidieron con el rango informado por Liu *et al.* (2007) y Llorach *et al.* (2008), quienes encontraron 552 y 850 mg EAG 100 g⁻¹ FM para lechugas rojas, respectivamente.

Las concentraciones de flavonoides totales mostraron un comportamiento similar al de FT frente a los tratamientos con NaCl y el tiempo de cosecha. Sin embargo, para ambos cultivares existió una interacción entre los factores evaluados. El cultivar 'Carmolí' registró unas concentraciones de flavonoides totales entre 1.190 y 2.480 mg eq rut 100 g⁻¹ MF, valores significativamente mayores que 'Levistro', el cual presentó valores entre 960 y 1.500 mg eq rut 100 g⁻¹ MF. En ambos cultivares la concentración más alta de flavonoides totales se alcanzó en la tercera cosecha, particularmente en presencia de NaCl, pero independiente de la concentración de NaCl aplicada (Tabla 6.3). Estos resultados confirman el aumento de flavonoides totales en condiciones salinas para lechuga verde reportado por Garrido *et al.* (2013) en lechuga variedad Capitata cv. 'Tempo neutro' cultivada con concentraciones de 0,15 mol L⁻¹. Los resultados anteriores también confirman el reporte de Lucini y Bernardo (2015) quienes discuten el incremento de la concentración de flavonoides como respuesta al estrés salino, producto de la activación de las enzimas Fenilalanina amonio-liasa (PAL), 4-coumarato-CoA ligasa (4CL) y Flavanona-3-beta-hidroxilasa (F3H), involucradas en su síntesis. Además, la concentración de flavonoides registrada para el cultivar 'Levistro' estuvo cerca del rango mencionado por Złotek *et al.* (2014) quienes reportaron entre 100 y 3.000 mg de quercetina 100 g⁻¹ MF para lechugas verdes y dentro del rango reportado por Ferreres *et al.* (1997) de 1.384 a 1.686 µg g⁻¹ para lechugas de hojas rojas.

Por otro lado, la concentración de antocianinas totales medidas en el cultivar 'Carmolí' alcanzó los valores más altos en la tercera cosecha en presencia de 0,1 mol L⁻¹ de NaCl, alcanzando valores de 61,2 mg Cian3gluc eq 100 g⁻¹ MF (Tabla 6.3). Esto representó un incremento del 43 % respecto al control (0 mol L⁻¹) durante el mismo tiempo de cosecha. Algunos autores han descrito valores similares de antocianinas totales para lechugas Lollo Rosso. Así, Luna *et al.* (2012) reportaron entre 21,4 y 31,1 mg de antocianinas 100 g⁻¹ MF y Kim *et al.* (2016) entre 2 y 130 mg de antocianinas 100 g⁻¹ MF para el mismo tipo de lechugas.

En cuanto a la capacidad antioxidante (CA) medida por FRAP, el cultivar 'Levistro' tuvo una CA más baja que el cultivar 'Carmolí', siguiendo el comportamiento característico reportado para lechugas verdes y rojas descrito por Liu *et al.* (2007) y Llorach *et al.* (2008). Lo anterior se relaciona además con las mayores concentraciones de fenoles totales, flavonoides y antocianinas reportadas para los cultivares de hojas rojas con respecto a las verdes. En este sentido, el cultivar 'Levistro'

registró valores entre 360 y 560 mg eq Trolox 100 g⁻¹ MF, mientras que el cultivar 'Carmolí' registró entre 590 y 1.200 mg eq Trolox 100 g⁻¹ MF. Los valores encontrados en este estudio fueron superiores a los informados por Llorach *et al.* (2008), quienes reportaron entre 98 y 320 mg eq Trolox 100 g⁻¹ MF para lechugas verdes, pero similares para los reportados los mismos autores para Lollo Rosso, con valores de 810 mg eq Trolox 100 g⁻¹ MF. Cabe destacar que la capacidad antioxidante medida por FRAP mostró un comportamiento similar a la concentración de fenoles, flavonoides y antocianinas totales (Tabla 6.3). Resultados que se relacionan directamente con la actividad antioxidante que presentan los compuestos tipo fenoles, flavonoides y antocianinas presentes en lechugas (Złotek, *et al.*, 2014). Al igual que los demás parámetros estudiados, la CA medida por FRAP, tanto para el cultivar 'Levistro' como para 'Carmolí', presentó los valores más elevados durante la tercera cosecha y cuando las plantas fueron tratadas con 0,1 mol L⁻¹ de NaCl (Tabla 6.3). Paralelamente, la capacidad antioxidante medida por DPPH mostró un comportamiento similar a la medición realizada por el método de FRAP. Los valores de CA medida por DPPH para el cultivar 'Levistro' estuvieron entre 290 y 470 mg eq Trolox 100 g⁻¹ MF, siendo superiores a los valores reportados por Llorach *et al.* (2008) de 70 y 240 mg eq Trolox 100 g⁻¹ MF para lechuga verde por esta metodología. Por otro lado, el cultivar 'Carmolí' presentó valores de DPPH entre 450 y 860 mg eq Trolox 100 g⁻¹ MF, valores similares a los 770 mg eq Trolox 100 g⁻¹ MF reportados previamente por Llorach *et al.* (2008) para Lollo Rosso. De acuerdo a Liu *et al.* (2007), la mayor concentración de fenoles y CA de las lechugas de hojas rojas podría atribuirse a la presencia de antocianinas, específicamente a la cianidina 3-malonilglucósido, una antocianina que según Caldwell (2003) aporta alrededor del 15 % del total de CA en el extracto de lechuga roja.

Las concentraciones significativamente más altas de fenoles totales, flavonoides, antocianinas y CA detectadas para el cultivar 'Carmolí' respecto a 'Levistro', confirmarían que cultivares de hojas rojas presentan un mayor aporte de compuestos antioxidantes a la dieta de los consumidores que los cultivares de hojas verdes (Neveu *et al.*, 2010; Pérez-López *et al.*, 2014; Sgherri *et al.*, 2017).

Por tanto, de acuerdo con los resultados obtenidos, el tiempo de cosecha de la planta también determinó la acumulación de fenoles y su respuesta al estrés abiótico presentando mayores concentraciones de fenoles, flavonoides, antocianinas y capacidad antioxidante durante la tercera cosecha (Tabla 6.3). En este sentido, Sellami *et al.* (2009) observaron que el estado de crecimiento de la planta de mejorana dulce (*Origanum majorana* L.), tuvo un impacto significativo en la cantidad y la composición de los compuestos fenólicos presentes en la planta. Del mismo modo, Liu *et al.* (2007) mostraron que la temporada de cosecha afecta la concentración de compuestos antioxidantes y que las plantas cosechadas en verano tenían mayor concentración de FT y CA que las lechugas cosechadas en otoño, haciendo relevante considerar las condiciones de cultivo para la obtención de productos con alto contenido antioxidante.

Adicionalmente, el aumento de fenoles totales, flavonoides y antocianinas obtenido en condiciones de salinidad derivó en un aumento en la actividad antioxidante total. Esto podría explicarse debido a que el efecto osmótico generado por el NaCl, conduciría a una mayor producción de especies reactivas de oxígeno (EROs), lo que resultaría en un incremento de la respuesta de defensa de la planta frente al estrés oxidativo (Munns y Tester, 2008; Shabala y Munns 2012; Shabala *et al.*, 2015). En estas condiciones, las plantas activan varios mecanismos fisiológicos para aclimatarse a este ambiente estresante y según Neocleous *et al.* (2014) y Lucini *et al.* (2015), una de las respuestas metabólicas a la salinidad por NaCl involucra la síntesis de metabolitos secundarios tales como fenoles totales, flavonoides y antocianinas e implica una activación de la actividad de enzimas pertenecientes a la ruta de síntesis de los fenilpropanoides como fenilalanina amonio-liasa (PAL), 4-cumarato- CoA ligasa (4CL), flavanona-3-beta-hidroxilasa (F3H) y cinamato-4-hidroxilasa (C4H). El aumento en la concentración de fenoles, flavonoides y antocianinas totales como la CA,

sugiere que las concentraciones de 0,05 y 0,1 mol L⁻¹ de NaCl, aplicadas en la solución nutritiva, activarían los pasos clave de la biosíntesis y acumulación de compuestos fenólicos en ambos cultivares de lechuga.

Debido a que estos compuestos antioxidantes presentan efectos promotores de la salud, se consideran un valor agregado a las características nutricionales básicas de las hortalizas de hojas como las lechugas (Di Mola *et al.*, 2017). De igual manera, debido a que existen variaciones en la concentración de compuestos antioxidantes, reaccionadas a las condiciones ambientales y de crecimiento, el incremento en la concentración de compuestos antioxidantes, mediante el control de las condiciones de cultivo, se hace sumamente relevante, abriendo una nueva oportunidad para la obtención de productos ricos en compuestos de interés.

6.2.3.1.4.- Concentración de prolina total

La prolina es un metabolito soluble de bajo peso molecular que contrarresta la fuerza iónica generada en las vacuolas por la acumulación de iones. Su acumulación bajo estrés salino se ha relacionado con el ajuste osmótico, la protección de proteínas y membranas y la extinción de las EROs en varias especies vegetales (Shabala y Munns, 2012; Lucini *et al.*, 2015).

Las concentraciones de prolina mostraron diferentes respuestas al NaCl y el tiempo de cosecha según el cultivar. En el cultivar 'Levistro', las cosechas consecutivas y el aumento de la concentración de NaCl afectaron significativamente la concentración de prolina (Tabla 6.4). La concentración de prolina alcanzó los valores más altos a 0,10 mol L⁻¹ de NaCl. En estas condiciones de salinidad, la concentración de prolina el cultivar 'Levistro' disminuyó significativamente en respuestas de las cosechas consecutivas desde 396,9 µg 100 g⁻¹ MF, en la primera cosecha, a 184,5 µg 100 g⁻¹ MF en la tercera (Tabla 6.4). Por el contrario, el cultivar 'Carmolí' solo mostró un aumento significativo en la concentración de prolina cuando se incrementó la concentración de NaCl hasta 0,1 mol L⁻¹, pero no se afectó por el tiempo de cosecha. A 0,1 mol L⁻¹ de NaCl, el cultivar 'Carmolí' evidenció un aumento significativo de alrededor del 350 % en la concentración de prolina en comparación con el tratamiento control (0 mol L⁻¹ NaCl), incrementando su concentración desde 12,4 a 56,0 µg 100 g⁻¹ MF (Tabla 6.4).

Al comparar ambos cultivares se observó una diferencia significativa en las concentraciones de prolina. El cultivar 'Carmolí' alcanzó valores más bajos que 'Levistro' en todas las concentraciones de NaCl utilizadas, lo que indicaría que las lechugas verdes sintetizaron y acumularon más prolina que el cultivar 'Carmolí', como un mecanismo de protección frente a las concentraciones de NaCl evaluadas en este estudio.

Según Shabala *et al.* (2015), las altas concentraciones de NaCl podrían activar a la enzima NADPH oxidasa (Nicotiamida-Adenina Dinucleotido fosfato), lo que resultaría en un aumento de la producción de EROs, especies sobre las cuales la prolina actuaría para facilitar su extinción (Lucini *et al.*, 2015). Debido a que los compuestos fenólicos también son una estrategia de defensa involucrada en la eliminación de EROs, la síntesis de prolina estaría relacionada con la acumulación de compuestos fenólicos. Dado que el cultivar 'Carmolí' presentó valores naturalmente más altos de compuestos fenólicos que el cultivar 'Levistro' (Tabla 6.4), sería capaz de proteger de manera más eficaz las células contra el daño generado por las EROs. Por lo que, los cultivares de variedades rojas como 'Carmolí', no necesitarían una concentración tan elevada de prolina para combatir la producción de EROs causada por las concentraciones altas de NaCl. Por el contrario, la menor concentración de compuestos antioxidantes presentes en las variedades de hojas verdes como 'Levistro' necesitaría de otras estrategias, como la síntesis de prolina para combatir las EROs generadas por el estrés salino, reflejándose en un incremento significativo de esta especie en respuesta a la concentración de NaCl (Tabla 6.4).

Tabla 6.3. Concentración de fenoles, flavonoides, antocianinas totales y capacidad antioxidante para lechugas Lollo Bionda cv. ‘Levistro’ y Lollo Rosso cv. ‘Carmoli’, crecidas con diferentes concentraciones de NaCl durante tres cosechas sucesivas.

| Factor | Nivel | Fenoles | | | | Flavonoides | | | | Antocianinas | | Capacidad antioxidante | | | | | | | |
|-----------------------|--------------------------|-------------------------------|--------------------|--------------------|---------------------|----------------------------------|---------------------|----------------------|-------------------|--|--------------------|-------------------------------------|---------------------|---------------------|--------------------|--------------------|--------------------|---------------------|------|
| | | ‘Levistro’ | | ‘Carmoli’ | | ‘Levistro’ | | ‘Carmoli’ | | ‘Carmoli’ | | FRAP | | DPPH | | | | | |
| | | mg EAG 100 g ⁻¹ MF | | | | mg eq Rut 100 g ⁻¹ MF | | | | mg eq Cian3gluc 100 g ⁻¹ MF | | mg eq Trolox 100 g ⁻¹ MF | | | | | | | |
| | | Media | EE | Media | EE | Media | EE | Media | EE | Media | EE | Media | EE | Media | EE | Media | EE | Media | EE |
| Tiempo de cosecha (1) | 1 ^a | 279,1 ^b | 8,7 | 408,4 | 9,2 | 1124,9 | 16,7 | 1282,2 | 26,8 | 28,6 | 0,9 | 458,2 | 10,4 | 631,3 | 17,1 | 355,9 | 3,8 | 70,1 | 10,1 |
| | 2 ^a | 262,5 ^c | 4,2 | 596,0 | 13,8 | 1099,5 | 24,1 | 1895,1 | 53,5 | 38,5 | 0,6 | 403,7 | 10,1 | 899,0 | 23,5 | 336,0 | 7,3 | 640,8 | 20,2 |
| | 3 ^a | 316,2 ^a | 6,0 | 685,6 | 16,2 | 1376,8 | 42,7 | 2247,2 | 64,0 | 53,3 | 1,8 | 506,4 | 15,9 | 1080,4 | 31,8 | 443,7 | 9,8 | 782,1 | 19,0 |
| NaCl (2) | 0 mol L ⁻¹ | 259,2 ^b | 4,9 | 491,9 | 17,3 | 1075,0 | 23,5 | 1533,7 | 57,0 | 36,3 | 1,2 | 412,9 | 12,2 | 752,6 | 30,2 | 343,3 | 8,9 | 556,6 | 18,8 |
| | 0,05 mol L ⁻¹ | 303,7 ^a | 9,4 | 598,5 | 23,7 | 1283,4 | 44,9 | 1938,0 | 86,7 | 42,3 | 2,1 | 468,1 | 13,3 | 907,7 | 39,3 | 396,2 | 11,6 | 659,3 | 28,0 |
| | 0,1 mol L ⁻¹ | 294,9 ^a | 5,7 | 599,6 | 30,3 | 1242,8 | 31,4 | 1952,8 | 104,5 | 41,8 | 3,1 | 487,3 | 15,1 | 950,4 | 50,0 | 396,2 | 11,5 | 677,1 | 35,8 |
| 1 × 2 | 1 ^a × 0 | 260,6 | 8,0 | 384,3 ^f | 20,0 | 1101,2 ^b | 40,4 | 1191,1 ^f | 56,5 | 30,3 ^e | 1,8 | 456,1 ^b | 23,7 | 593,2 ^e | 39,9 | 349,9 ^e | 8,1 | 474,0 ^d | 23,1 |
| | 2 ^a × 0 | 237,4 | 3,1 | 515,8 ^d | 7,4 | 962,9 ^c | 11,1 | 1570,4 ^d | 29,6 | 35,7 ^d | 0,5 | 361,1 ^c | 13,9 | 769,6 ^d | 23,0 | 292,8 ^d | 5,2 | 532,7 ^c | 15,6 |
| | 3 ^a × 0 | 279,7 | 7,0 | 575,6 ^c | 9,0 | 1160,9 ^b | 32,1 | 1839,7 ^c | 32,8 | 42,7 ^c | 1,2 | 421,6 ^b | 11,5 | 895,1 ^c | 31,5 | 387,2 ^b | 10,8 | 663,0 ^b | 18,2 |
| | 1 ^a × 0,05 | 301,2 | 23,1 | 441,9 ^e | 8,0 | 1151,0 ^b | 24,6 | 1380,2 ^e | 21,7 | 30,9 ^e | 0,9 | 451,5 ^b | 11,3 | 672,1 ^e | 18,4 | 360,9 ^e | 6,4 | 483,3 ^{cd} | 11,1 |
| | 2 ^a × 0,05 | 272,8 | 5,2 | 625,6 ^b | 9,8 | 1176,5 ^b | 37,6 | 2011,5 ^b | 33,6 | 39,9 ^e | 0,5 | 417,8 ^b | 14,8 | 910,6 ^c | 21,5 | 355,5 ^c | 5,9 | 673,6 ^b | 15,5 |
| | 3 ^a × 0,05 | 337,1 | 6,6 | 728,1 ^a | 8,5 | 1522,7 ^a | 82,7 | 2422,4 ^a | 52,2 | 56,1 ^b | 1,4 | 535,1 ^a | 21,5 | 1140,3 ^a | 24,2 | 472,0 ^a | 12,4 | 820,8 ^a | 11,8 |
| | 1 ^a × 0,1 | 275,4 | 6,1 | 399,2 ^f | 12,0 | 1122,5 ^b | 17,7 | 1275,3 ^{ef} | 33,5 | 24,6 ^f | 1,3 | 467,2 ^b | 19,0 | 628,6 ^e | 23,2 | 356,8 ^c | 5,0 | 452,9 ^d | 16,8 |
| | 2 ^a × 0,1 | 277,5 | 3,5 | 646,6 ^b | 21,6 | 1159,3 ^b | 25,0 | 2103,5 ^b | 75,1 | 39,7 ^c | 1,4 | 432,1 ^b | 15,6 | 1016,9 ^b | 23,4 | 359,7 ^c | 10,6 | 716,0 ^b | 34,7 |
| 3 ^a × 0,1 | 331,8 | 3,0 | 753,1 ^a | 9,2 | 1446,7 ^a | 28,0 | 2479,6 ^a | 69,0 | 61,2 ^a | 2,5 | 562,7 ^a | 21,6 | 1205,9 ^a | 39,6 | 471,9 ^a | 8,9 | 862,4 ^a | 16,6 | |
| valor p (1) | | *** | | *** | | *** | | *** | | *** | | *** | | *** | | *** | | *** | |
| valor p (2) | | *** | | *** | | *** | | *** | | *** | | *** | | *** | | *** | | *** | |
| valor p (1 × 2) | | ns | | *** | | *** | | *** | | *** | | *** | | *** | | *** | | *** | |

Concentración de NaCl: 0 mol L⁻¹ (control); 0,05 mol L⁻¹; 0,1 mol L⁻¹. Tiempo de cosecha: primera (1^a); segunda (2^a); tercera (3^a). FRAP: Ferric reducing antioxidant power, DPPH: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, EAG: equivalentes de ácido gálico; Eq Rut: equivalentes de rutina; Eq Cian3gluc: equivalentes de cianidina 3 glucósido; eq Trolox: equivalentes de Trolox; MF: masa fresca. Los valores representan medias de 27 datos para la cosecha y la concentración de NaCl y de 9 mediciones para la interacción (1 × 2). ^{a,b,c,d,e,f} Letras diferentes corresponden a diferencias significativas determinadas por la prueba de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher con un nivel de significancia de $p < 0,05$. ns: no significante; ***: $p < 0,001$.

Debido a que la síntesis de prolina tiene un costo energético asociado (Munns y Tester, 2008), este ocurría a expensas del crecimiento de la planta. Lo anterior estaría relacionado con la disminución de MF observada en las plantas de lechuga cultivadas en presencia de NaCl. El hecho de que el cultivar 'Carmolí' presentó sólo una leve reducción de masa fresca a concentraciones de NaCl de 0,1 mol L⁻¹ (Figura 6.8 D), lo que indicaría que este cultivar de hojas rojas estaría más adaptado para responder frente a este tipo de estrés debido a su mayor concentración de fenoles, flavonoides y antocianinas totales no necesitaría destinar parte de su energía a la síntesis de prolina (Munns y Tester, 2008). Esta respuesta reafirmaría la posible relación entre la concentración de prolina y de compuestos fenólicos, sin embargo, se necesitarían estudios a nivel transcripcional y funcional de las vías de síntesis de prolina y de compuestos fenólicos para esclarecer su relación y confirmar esta hipótesis.

Tabla 6.4. Concentración de prolina para lechugas Lollo Bionda cv. 'Levistro' y Lollo Rosso cv. 'Carmolí' crecidas con diferentes concentraciones de NaCl durante tres cosechas sucesivas.

| Factor | Nivel | Prolina | | | |
|------------------------|--------------------------|--------------------------------------|------|-------------------|------|
| | | 'Levistro' | | 'Carmolí' | |
| | | -----µg 100 g ⁻¹ MF ----- | | | |
| | | Media | EE | Media | EE |
| Tiempo de cosecha (1) | 1 ^a | 168,4 | 58,7 | 28,9 | 8,6 |
| | 2 ^a | 117,4 | 45,0 | 29,7 | 8,4 |
| | 3 ^a | 84,2 | 25,8 | 24,6 | 5,9 |
| NaCl (2) | 0 mol L ⁻¹ | 19,6 | 3,0 | 12,4 ^b | 1,4 |
| | 0,05 mol L ⁻¹ | 58,2 | 11,5 | 14,9 ^b | 0,5 |
| | 0,1 mol L ⁻¹ | 292,2 | 31,7 | 56,0 ^a | 5,5 |
| (1 × 2) | 1 ^a × 0 | 10,0 ^f | 4,6 | 12,1 | 2,3 |
| | 2 ^a × 0 | 27,6 ^{ef} | 1,7 | 13,9 | 4,1 |
| | 3 ^a × 0 | 21,3 ^{ef} | 0,6 | 11,0 | 0,5 |
| | 1 ^a × 0,05 | 98,2 ^d | 12,8 | 15,6 | 0,8 |
| | 2 ^a × 0,05 | 29,5 ^{ef} | 3,5 | 13,7 | 1,0 |
| | 3 ^a × 0,05 | 46,8 ^e | 11,2 | 15,4 | 1,0 |
| | 1 ^a × 0,1 | 396,9 ^a | 9,2 | 59,0 | 14,3 |
| | 2 ^a × 0,1 | 295,2 ^b | 23,3 | 61,6 | 8,6 |
| | 3 ^a × 0,1 | 184,5 ^c | 11,3 | 47,3 | 5,4 |
| valor <i>p</i> (1) | | *** | | ns | |
| valor <i>p</i> (2) | | *** | | *** | |
| valor <i>p</i> (1 × 2) | | *** | | ns | |

Concentración de NaCl: 0 mol L⁻¹ (control); 0,05 mol L⁻¹; 0,1 mol L⁻¹. Tiempo de cosecha: primera (1^a); segunda (2^a); tercera (3^a). Los valores representan medias de 27 datos para la cosecha y concentración de NaCl y de nueve mediciones para la interacción (1 × 2). ^{a,b,c,d,e,f} Letras diferentes corresponden a diferencias significativas determinadas por la prueba de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher con un nivel de significancia de *p* < 0,05. ns: no significativo; ***: *p* < 0,001.

6.2.3.1.5.- Densidad estomática y celular y espacio intercelular

Debido a que la salinidad reduce la absorción de agua por parte de la planta, ésta podría afectar la morfología de la hoja como el área, densidad y cierre estomático, como una forma de regular los procesos de conductancia estomática y transpiración (Romero-Aranda *et al.*, 2001).

Tanto para el cultivar 'Levistro' como 'Carmolí' se observó un efecto significativo en la densidad estomática en respuesta al tiempo cosecha. Además, ambos cultivares presentaron valores significativamente más bajos en la primera cosecha en comparación con la segunda y tercera cosechas (Tabla 6.5), lo que indicaría una diferencia de la densidad estomática según el estado de desarrollo en las plantas de lechuga. Por otro lado, la densidad estomática para el cultivar 'Levistro' fue significativamente menor que 'Carmolí' mostrando un valor promedio de 47,0 y 56,4 estomas mm^{-2} , respectivamente.

Contrario a lo reportado por Romero-Aranda *et al.* (2001), en tomate, donde las plantas regadas con una solución nutritiva a la cual se le incorporó 0,035 y 0,070 mol L^{-1} de NaCl, presentaron una disminución en la densidad estomática respecto del control sin NaCl, en las lechugas del cultivar 'Levistro' y 'Carmolí' no se registraron disminuciones significativas en la densidad estomática producto de la incorporación de NaCl en la solución nutritiva. Por otro lado, el índice estomático no fue afectado por el tiempo de cosecha ni por la concentración de NaCl (Tabla 6.5). Finalmente, respecto de la densidad celular, en el cultivar 'Levistro' hubo una interacción significativa entre el tiempo de cosecha y la concentración de NaCl. Los mayores valores de densidad celular fueron registrados en la tercera cosecha para las lechugas 'Levistro' del control (0 mol L^{-1}) y cuando fueron cultivadas con 0,1 mol L^{-1} de NaCl (Tabla 6.5). Por el contrario, para el cultivar 'Carmolí' se encontró un efecto significativo independiente para cada factor, registrándose valores significativamente mayores en la tercera cosecha (830,6 células mm^{-2}) y en plantas cultivadas en presencia de NaCl, alcanzando valores de 737,8-746,1 células mm^{-2} (Tabla 6.5). Este incremento en el recuento celular pudo deberse a que la disminución en el consumo de agua reduce la división y expansión celular (Carillo *et al.*, 2019) por lo que, en una misma área de hoja, se observarían más células pequeñas. Cabe destacar que la densidad celular fue significativamente mayor en el cultivar 'Carmolí' que en 'Levistro' con valores medios de 708,5 y 492,9 células mm^{-2} , respectivamente.

Respecto del espacio intercelular, se ha reportado que la salinidad causa alteraciones anatómicas en algunas especies vegetales. En poroto, algodón y atriplex se ha observado que el aumento en la salinidad provoca un incremento en el grosor de la epidermis, del mesófilo, longitud y diámetro de las células del tejido empalizado y diámetro de las células del tejido esponjoso (Yadav *et al.*, 2011). En contraste, en *Brugueira parviflora* tratadas con 0,4 mol L^{-1} de NaCl, el grosor de la epidermis, mesófilo, y los espacios intercelulares disminuyeron significativamente (Parida *et al.*, 2004). Para evaluar el efecto del cloruro de sodio sobre la morfología celular se realizaron cortes histológicos en hojas de lechuga del cultivar 'Levistro' (Figura 6.10) y 'Carmolí' (Figura 6.11). En estas imágenes se observó una reducción en los espacios intercelulares (ein) y un aumento en los tejidos parenquimático empalizado (pe) y esponjoso (pes), para ambos cultivares, a medida que aumentó la concentración de NaCl. El análisis de resultados mostró una interacción significativa entre el cultivar y la concentración de NaCl en el espacio intercelular. En estas condiciones, el cultivar 'Levistro' registró un mayor porcentaje de espacio intercelular que 'Carmolí' el cual disminuyó significativamente, de 30,7 % en el control a 0 mol L^{-1} hasta llegar a un 21,7 % a una concentración de 0,1 mol L^{-1} de NaCl. De manera contraria, el espacio intercelular en el cultivar 'Carmolí', se mantuvo entre 12,6 y 15,6 % (Tabla 6.6) sin presentar diferencias significativas producto de la adición de NaCl.

La reducción en el espacio intercelular encontrada en el cultivar 'Levistro' fue confirmada por Garrido *et al.* (2013) para la lechuga verde variedad Capitata cv. 'Tempo neutro', donde reportaron un espacio intercelular del 56,1 % para el control (0 mol L^{-1}); 53,0 % para las plantas

tratadas con 0,05 y 0,1 mol L⁻¹ y de 47,8 % tratadas con 0,15 mol L⁻¹. Por otro lado, Parida *et al.*, 2004 para *B. parviflora* también mostraron cambios en la estructura anatómica de la hoja, registrando una reducción en la cantidad de espacios intercelulares en el tejido esponjoso de un 21 a un 16% cuando las plantas fueron tratadas con 0,4 mol L⁻¹ de NaCl.

Tabla 6.5. Densidad estomática, densidad celular e índice estomático para lechugas Lollo Bionda cv. 'Levistro' y Lollo Rosso cv. 'Carmolí' crecidas con diferentes concentraciones de NaCl durante tres cosechas sucesivas.

| Factor | Nivel | Densidad estomática | | | | Densidad celular | | | | Índice estomático | | | |
|-----------------------|--------------------------|---------------------------------|------|--------------------|--------------------|---------------------------------|-------|--------------------|------|-------------------|-----|-----------|-----|
| | | 'Levistro' | | 'Carmolí' | | 'Levistro' | | 'Carmolí' | | 'Levistro' | | 'Carmolí' | |
| | | — N° Estomas mm ⁻² — | | | | — N° Células mm ⁻² — | | | | | | | |
| | | Media | EE | Media | EE | Media | EE | Media | EE | Media | EE | Media | EE |
| Tiempo de cosecha (1) | 1 ^a | 36,5 ^b | 2,4 | 51,4 ^b | 3,3 | 395,4 | 11,0 | 579,4 ^c | 22,3 | 8,5 | 0,5 | 8,1 | 0,4 |
| | 2 ^a | 53,1 ^a | 2,5 | 54,7 ^{ab} | 3,7 | 501,5 | 16,1 | 715,4 ^b | 20,2 | 9,6 | 0,5 | 7,1 | 0,4 |
| | 3 ^a | 51,4 ^a | 2,5 | 63,0 ^a | 2,8 | 581,9 | 20,5 | 830,6 ^a | 35,4 | 8,2 | 0,4 | 7,2 | 0,3 |
| NaCl (2) | 0 mol L ⁻¹ | 48,1 | 2,9 | 52,2 | 3,2 | 491,6 | 26,3 | 641,6 ^b | 36,6 | 9,0 | 0,4 | 7,7 | 0,4 |
| | 0,05 mol L ⁻¹ | 47,3 | 3,4 | 60,5 | 2,8 | 470,0 | 12,8 | 746,1 ^a | 25,7 | 9,1 | 0,6 | 7,5 | 0,3 |
| | 0,1 mol L ⁻¹ | 45,6 | 2,5 | 56,4 | 4,0 | 517,3 | 27,7 | 737,8 ^a | 37,5 | 8,2 | 0,4 | 7,2 | 0,4 |
| (1×2) | 1 ^a x 0 | 37,3 | 2,5 | 49,7 | 5,9 | 368,1 ^d | 12,8 | 499,8 | 25,4 | 9,2 | 0,5 | 9,0 | 0,8 |
| | 2 ^a x 0 | 52,2 | 5,4 | 49,7 | 5,9 | 494,9 ^{bc} | 26,3 | 636,6 | 30,1 | 9,4 | 0,6 | 7,3 | 0,9 |
| | 3 ^a x 0 | 54,7 | 4,5 | 57,2 | 5,0 | 611,8 ^a | 33,0 | 788,3 | 70,0 | 8,3 | 0,8 | 6,8 | 0,3 |
| | 1 ^a x 0,05 | 34,8 | 5,4 | 57,2 | 6,3 | 432,7 ^{cd} | 20,6 | 634,1 | 20,8 | 7,5 | 1,1 | 8,2 | 0,6 |
| | 2 ^a x 0,05 | 57,2 | 5,0 | 54,7 | 2,5 | 480,0 ^{bc} | 27,1 | 785,8 | 21,0 | 10,8 | 1,1 | 6,5 | 0,2 |
| | 3 ^a x 0,05 | 49,7 | 4,5 | 69,6 | 3,8 | 497,4 ^{bc} | 10,6 | 818,2 | 50,0 | 9,1 | 0,8 | 7,9 | 0,4 |
| | 1 ^a x 0,1 | 37,3 | 4,5 | 47,3 | 5,0 | 385,5 ^d | 15,9 | 604,3 | 47,2 | 8,8 | 1,0 | 7,3 | 0,6 |
| | 2 ^a x 0,1 | 49,7 | 2,5 | 59,7 | 0,2 | 529,7 ^b | 31,1 | 723,7 | 29,6 | 8,7 | 0,5 | 7,5 | 1,0 |
| 3 ^a x 0,1 | 49,7 | 4,5 | 62,2 | 5,2 | 636,6 ^a | 34,2 | 885,3 | 65,8 | 7,2 | 0,4 | 6,7 | 0,7 | |
| valor p (1) | | *** | | * | | *** | | *** | | ns | | ns | |
| valor p (2) | | ns | | ns | | ns | | ** | | ns | | ns | |
| valor p (1 × 2) | | ns | | ns | | *** | | ns | | ns | | ns | |

Concentración de NaCl: 0 mol L⁻¹ (control); 0,05 mol L⁻¹; 0,1 mol L⁻¹. Tiempo de cosecha: primera (1^a); segunda (2^a); tercera (3^a). Valores corresponden a medias de 15 datos para el tiempo de cosecha y concentración de NaCl y de cinco mediciones para la interacción (1 × 2). ^{a,b,c,d} Letras diferentes corresponden a diferencias significativas determinadas por la prueba de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher con un nivel de significancia de $p < 0,05$. ns: no significante; *: $<0,05$; **: $<0,01$; ***: $<0,001$.

Tabla 6.6. Espacio intercelular de lechugas Lollo Bionda cv. ‘Levistro’ y Lollo Rosso cv. ‘Carmolí’ crecidas con diferentes concentraciones de NaCl.

| Factor | Nivel | Espacio intercelular | |
|--------------|--------------------------|----------------------|-----|
| | | ---% área--- | |
| | | Media | EE |
| Cultivar (1) | ‘Levistro’ (L) | 27,2 ^a | 0,9 |
| | ‘Carmolí’ (C) | 13,7 ^b | 0,6 |
| NaCl (2) | 0 mol L ⁻¹ | 24,9 ^a | 1,5 |
| | 0,05 mol L ⁻¹ | 18,7 ^b | 1,3 |
| | 0,1 mol L ⁻¹ | 16,8 ^b | 1,0 |
| (1 × 2) | L × 0 | 30,7 ^a | 1,4 |
| | L × 0,05 | 29,0 ^a | 0,9 |
| | L × 0,1 | 21,7 ^b | 1,4 |
| | C × 0 | 15,6 ^c | 1,4 |
| | C × 0,05 | 12,9 ^c | 0,9 |
| | C × 0,1 | 12,6 ^c | 0,8 |
| | valor <i>p</i> (1) | | *** |
| | valor <i>p</i> (2) | | *** |
| | valor <i>p</i> (1 × 2) | | *** |

Concentración de NaCl: 0 mol L⁻¹ (control); 0,05 mol L⁻¹; 0,1 mol L⁻¹. Valores corresponden a medias del procesamiento de datos de 108 imágenes para el cultivar, de 72 imágenes para la concentración de NaCl y de 36 imágenes para la interacción (1 × 2). ^{a,b,c} Letras diferentes corresponden a diferencias significativas determinadas por la prueba de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher con un nivel de significancia de $p < 0,05$. ***: $p < 0,001$.

La alta presencia de antioxidantes naturales en las lechugas rojas como las del cultivar ‘Carmolí’ sugiere que debe promoverse su consumo y cultivo debido al mayor aporte de compuestos saludables y a su mayor adaptabilidad a condiciones ambientales adversas.

*Este ensayo dio origen al artículo científico titulado “Changes in Agronomic, Antioxidant Compounds, and Morphology Parameters of Green and Red Lettuces (*Lactuca sativa* L.) by Successive Harvests and UV-B SupplementatioEffect of NaCl and harvest time on antioxidant compounds and morphological cell changes in Lollo Bionda and Lollo Rosso lettuces” publicado en mayo de 2022 por los autores Mónica Flores, Asunción Amorós y Víctor Hugo Escalona, en la revista Chilean Journal of Agricultural Research (<https://doi.org/10.4067/S0718-58392022000400537>)

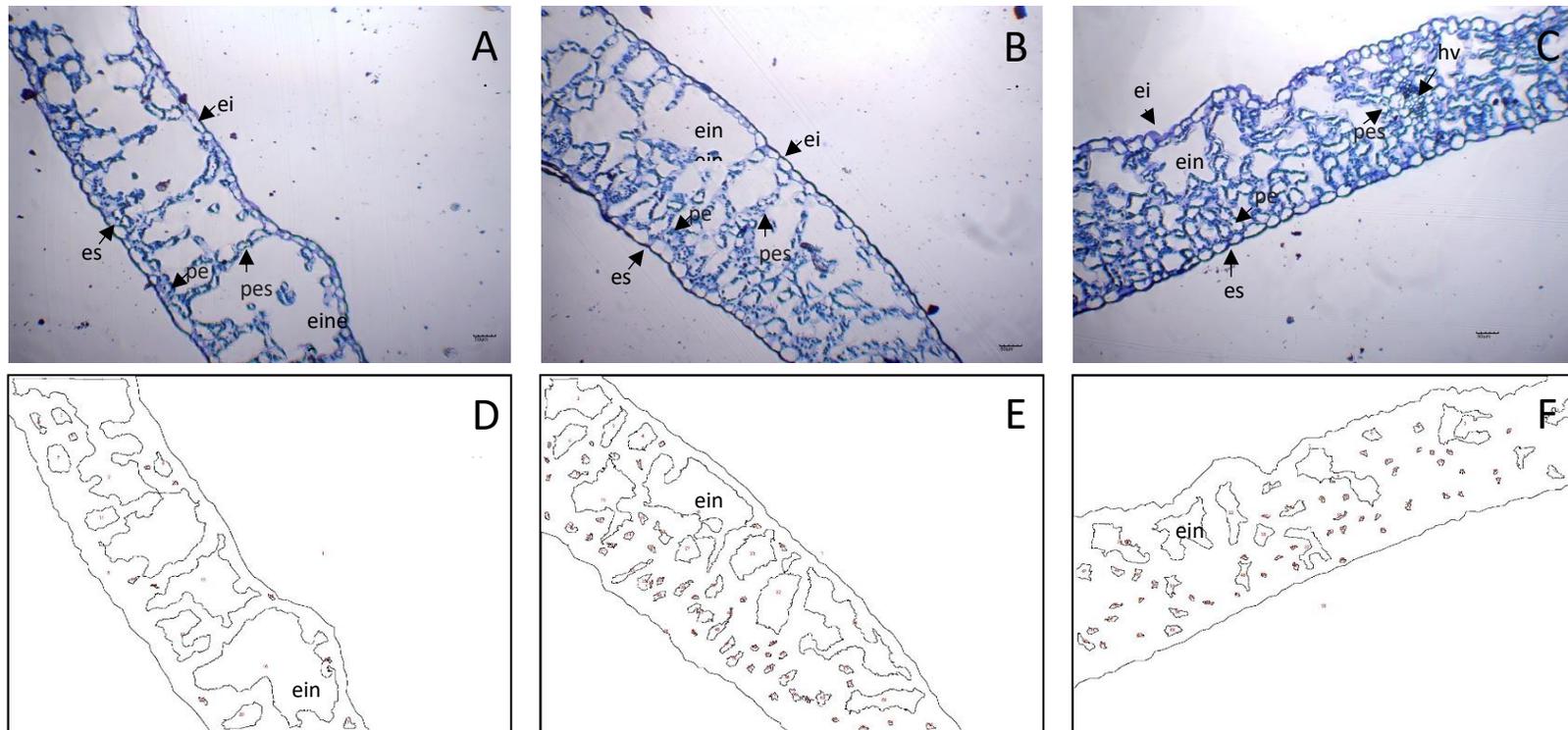


Figura 6.10. Imágenes del corte transversal del tejido foliar de hojas lechuga Lollo Bionda cv. 'Levistro' cultivadas con diferentes concentraciones de NaCl.

Concentraciones de NaCl: 0 (A); 0,05 (B) y 0,1 mol L⁻¹ de NaCl (C). Imágenes capturadas con un microscopio óptico con un objetivo de 100X. (D-F) corresponden a imágenes procesadas con el software ImageJ para A-C donde se destacan los espacios intercelulares. es: epidermis superior; ei: epidermis inferior; pe: parénquima empalzado; pes: parénquima esponjoso, ein: espacio intercelular; hv: haz vascular.

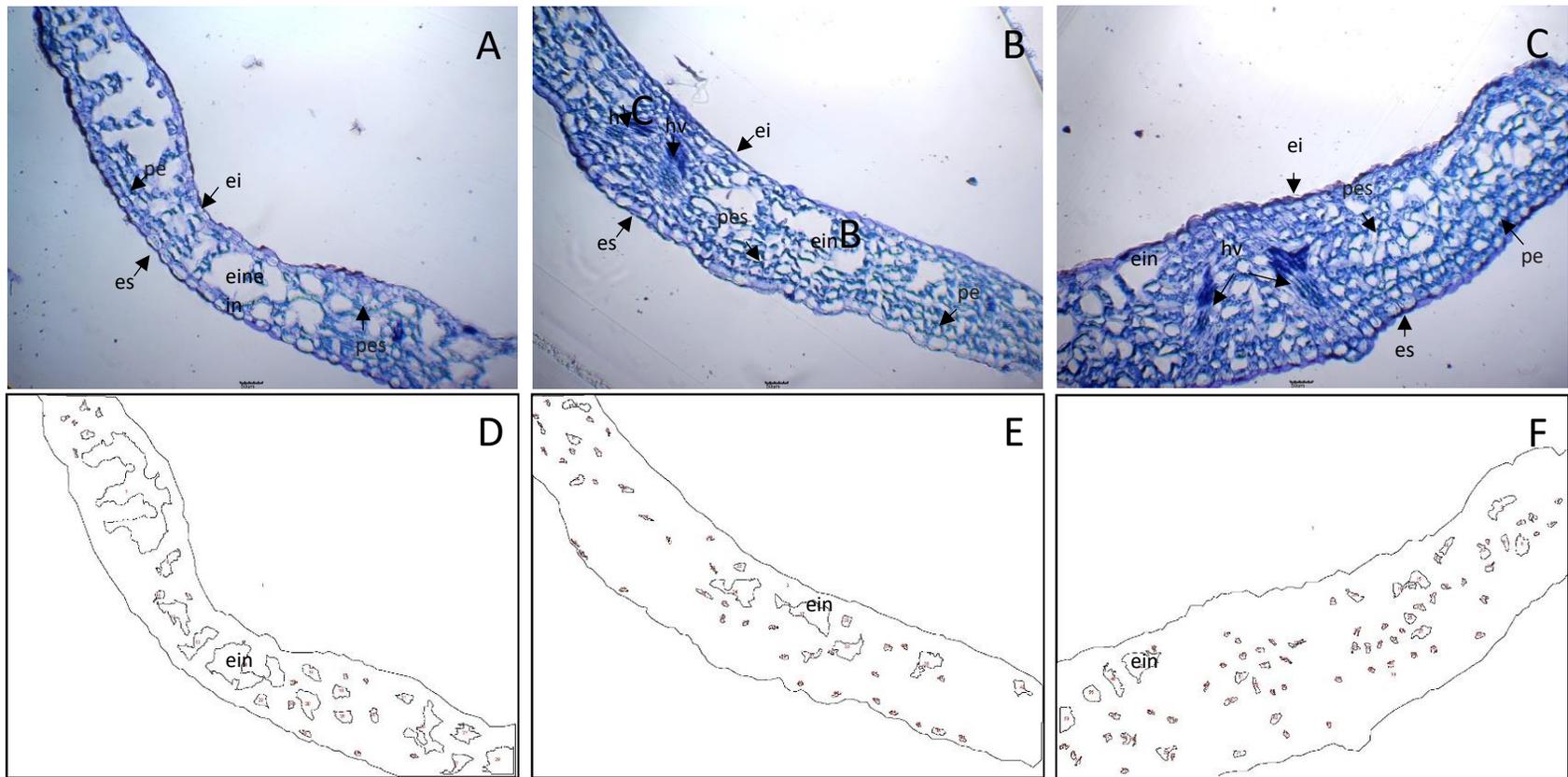


Figura 6.11. Imágenes del corte transversal del tejido foliar de hojas lechuga Lollo Rosso cv. 'Carmoli' cultivadas con diferentes concentraciones de NaCl.

Concentraciones de NaCl: 0 (A); 0,05 (B) y 0,1 mol L⁻¹ de NaCl (C). Imágenes capturadas con un microscopio óptico con un objetivo de 100X. (D-F) corresponden a imágenes procesadas con el software ImageJ para A-C donde se destacan los espacios intercelulares. es: epidermis superior; ei: epidermis inferior; pe: parénquima empalizado; pes: parénquima esponjoso, ein: espacio intercelular; hv: haz vascular.

6.2.4.- Conclusiones

La presencia de NaCl en la solución nutritiva de lechugas hidropónicas y consecuente aumento en la conductividad eléctrica aumenta la MS y la concentración de compuestos antioxidantes de los cultivares 'Levistro' y 'Carmolí', pero también reduce la masa fresca. Sin embargo, el aumento de la concentración de NaCl y las cosechas consecutivas estimularían la síntesis de compuestos antioxidantes de ambos cultivares.

Las mayores concentraciones iniciales de antioxidantes presentes en las lechugas rojas, las protegerían contra el estrés abiótico causado por 0,05 y 0,1 mol L⁻¹ de NaCl y el daño provocado por los cortes realizados durante las cosechas sucesivas, evidenciado por una menor respuesta en la concentración de prolina en comparación con las lechugas verdes. Estos resultados además concuerdan con la mayor reducción en el espacio intracelular, registrado en las lechugas verdes cultivadas en presencia de NaCl en la solución nutritiva.

6.2.5.- Bibliografía

Ainsworth, E.A., and Gillespie, K. M. 2007. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent. *Nat. Protoc.* 2, 875- 877. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.102>

Al-Maskri, A., Al-Kharusi, L., Al-Miqbali., H., Khan, M.M. 2010. Effects of salinity stress on growth of lettuce (*Lactuca sativa*) under closed-recycle nutrient film technique. *Int. J. Agric. Biol.* 12, 377–380. http://www.fsublishers.org/published_papers/90819..pdf

Ashraf, M., and Foolad, M. 2007. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environ. Exp. Bot.* 59, 206-216. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2005.12.006>

Bartha, C., Fodorpatiki, L., Martinez-Ballesta, M., Popescu, O., and Carvajal, M. 2015. Sodium accumulation contributes to salt stress tolerance in lettuce cultivars. *J. Appl. Bot. Food Qual.* 88, 42-48. <https://doi.org/10.5073/JABFQ.2015.088.008>

Bates, L., Waldren, R., and Teare, I. 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant Soil* 39, 205-207. <https://doi.org/10.1007/BF00018060>

Benzie, I.F. and Strain, J.J., 1996. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of 'Antioxidant Power': The FRAP Assay. *Anal. Biochem.* 239, 70–76. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>

Butcher, K., Wick, A.F., DeSutter, T., Chatterjee, A., Harmon, J. 2016. Soil salinity: a threat to global food security. *Agron. J.* 108, 2189-2200. <https://doi.org/10.2134/agronj2016.06.0368>

Caldwell, C. 2003. Alkylperoxyl radical scavenging activity of red leaf lettuce (*Lactuca sativa* L.) phenolics. *J. Agric. Food Chem.* 51, 589-4595. <https://doi.org/10.1021/jf030005q>.

Carillo, P., Raimondi, G., Kyriacou, M.C., Pannico A., El-Nakhel, C., Cirillo, V., Colla, G., De Pascale, S., Roupheal, Y. 2019. Morpho-physiological and homeostatic adaptive responses triggered by omeprazole enhance lettuce tolerance to salt stress. *Sci. Hort.* 249, 22-30. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.01.038>

Carranza, C., Lancho, O., Miranda, D., Chaves, B. 2009. Análisis del crecimiento de lechuga (*Lactuca sativa* L.) "Batavia" cultivada en un suelo salino de la Sabana de Bogotá. *Agron. Colomb.* 27, 1.

Di Mola, I., Roupheal, Y., Colla, G., Fagnano, M., Paradiso, R., and Mori, M. 2017. Morphophysiological traits and nitrate content of greenhouse lettuce as affected by irrigation with saline water. *HortScience.* 52,1716-1721. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI12501-17>

Di Rienzo, J.A., Casanoves, F., Balzarini, M.G., Gonzalez, L., Tablada, M., and Robledo, C.W. InfoStat versión., 2017. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. Disponible en <http://www.infostat.com.ar>.

Du, W.-X., Avena-Bustillos, R., Breksa, A., McHugh, T., 2014. UV-B light as a factor affecting total soluble phenolic contents of various whole and fresh-cut specialty crops. *Postharvest Biol. Technol.* 93, 72-82. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2014.02.004>

Ferreres, F., Gil, M.I., Castañer, M., and Tomás-Barberán, F.A. 1997. Phenolic metabolites in red pigmented lettuce (*Lactuca sativa*). Changes with minimal processing and cold storage. *J. Agric. Food Chem.* 45, 4249-4254. <https://doi.org/10.1021/jf970399j>

Galieni, A., Di Mattia, C., De Gregorio, M., Specca, S., Mastrocola, D., Pisante, M., Stagnari, F., 2015. Effects of nutrient deficiency and abiotic environmental stresses on yield, phenolic compounds, and antiradical activity in lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Sci. Hort.* 187, 93-101. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.02.036>

Garrido, Y., Tudela, J.A., Marín, A., Mestre, T., Martínez, V., Gil, M.I. 2013. Physiological, phytochemical, and structural changes of multi-leaf lettuce caused by salt stress. *J. Sci. Food Agric.* 94, 1592-1599. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6462>

- Gupta, S., Prakash, J., 2009. Studies on Indian Green Leafy Vegetables for Their Antioxidant Activity. *Plant Foods Hum. Nutr.* 64, 39-45. <https://doi.org/10.1007/s11130-008-0096-6>
- Kim, H.-J., Fonseca, J., Choi, J.-H., Kubota, C., and Kwon, D.Y. 2008. Salt in irrigation water affects the nutritional and visual properties of Romaine lettuce (*Lactuca sativa* L.). *J. Agric. Food Chem.* 56, 3772-3776. <https://doi.org/10.1021/jf0733719>
- Kim, M., Moon, Y., Tou, J., Mou, B., and Waterland, N. 2016. Nutritional value, bioactive compounds, and health benefits of lettuce (*Lactuca sativa* L.). *J. Food Compos. Anal.* 49, 19-34. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2016.03.004>
- Liu, X., Ardo, S., Bunning, M., Parry, J., Zhou, K., Stushnoff, C., Stoniker, F., Yu, L., Kendall, P. 2007. Total phenolic content and DPPH* radical scavenging activity of lettuce (*Lactuca sativa* L.) grown in Colorado. *LWT Food Sci. Technol.* 40, 552-557. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2005.09.007>
- Llorach, R., Martínez-Sánchez, A., Tomás-Barberán, F., Gil, M., Ferreres, F. 2008. Characterization of polyphenols and antioxidant properties of five lettuce varieties and escarole. *Food Chem.* 108, 1028-1038. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.11.032>
- Lucini, L., and Bernardo, L. 2015. Comparison of proteome response to saline and zinc stress in lettuce. *Front. Plant Sci.* 6, 240. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00240>
- Lucini, L., Roupael Y., Carderelli, M., Canaguier, R., Kumar, P., Colla, G. 2015. The effect of a plant-derived bio stimulant on metabolic profiling and crop performance of lettuce grown under saline conditions. *Sci. Hort.* 182, 124-133. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2014.11.022>
- McGuire, R. 1992. Reporting of objective color measurements. *HortScience* 27, 1254-1255. <https://doi.org/10.21273/hortsci.27.12.1254>
- Miller, G., Suzuki, N., Ciftci-Yilmaz, S., Mittler, R. 2010. Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. *Plant Cell Environ.* 33, 453-467 <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2009.02041.x>
- Mulabagal, V., Ngouajio, M., Nair, A., Zhang, Y., and Gottumukkala, A. 2010. In vitro evaluation of red and green lettuce (*Lactuca sativa*) for functional food properties. *Food Chem.* 118, 300-306. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.04.119>
- Munns, R., and Tester, M. 2008. Mechanisms of salinity tolerance. *Ann. Rev. Plant Biol.* 59, 651-681. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092911>
- Neocleous, D., Koukounaras, A., Siomos, A.S., and Vasilakakis, M. 2014. Assessing the salinity effects on mineral composition and nutritional quality of green and red 'baby' lettuce. *J. Food Qual.* 37, 1-8. <https://doi.org/10.1111/jfq.12066>
- Neveu, V., Perez-Jiménez, J., Vos, F., Crespy, V., du Chaffaut, L., Mennen, L., Knox, C., Eisner, R., Cruz, J., Wishart, D., Scalbert, A. 2010. Phenol-Explorer: an online comprehensive database on polyphenol contents in foods. Database. <https://doi.org/10.1093/database/bap024>
- Parida, A.K., Das, A.B., Mitra, B. 2004. Effects of salt on growth, ion accumulation, photosynthesis and leaf anatomy of the mangrove, *Bruguiera parviflora*. *Trees* 18, 167-174. <https://doi.org/10.1007/s00468-003-0293-8>
- Parida, A., Das, A. 2005. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 60, 324-349. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2004.06.010>
- Pasternak, D., De Malach, Y., Borovic, I., Shram, M., Aviram, C. 1986. Irrigation with brackish water under desert conditions. IV. Salt tolerance studies with lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Agric. Water Manag.* 11, 303-311. [https://doi.org/10.1016/0378-3774\(86\)90046-6](https://doi.org/10.1016/0378-3774(86)90046-6)
- Pérez-López, U., Pinzino, C., Quartacci, F., Ranieri, A., Sgherri, C. 2014. Phenolic Composition and Related Antioxidant Properties in Differently Colored Lettuces: A Study by Electron Paramagnetic Resonance (EPR) Kinetics. *J. Agric. Food Chem.* 62, 12001-12007 <https://doi.org/10.1021/jf503260v>

- Pinto, E., Almeida, A., Aguilar, A., Ferreira, I. 2014. Changes in macro minerals, trace elements and pigments content during lettuce (*Lactuca sativa* L.) growth: Influence of soil composition. *Food Chem.* 152, 603-611. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.12.023>
- Romani, A., Pinelli, P., Galardi, C., Sani, G., Cimato, A., and Heimler, D. 2002. Polyphenols in greenhouse and open-air-grown lettuce. *Food Chem.* 79, 337-342. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00170-X](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00170-X).
- Romero-Aranda, R., Soria, T., Cuartero, J. 2001. Tomato plant-water uptake and plant-water relationships under saline growth conditions. *Plant Sci.* 160, 265-272. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(00\)00388-5](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(00)00388-5)
- Sakalauskaitė, J., Viskelis, P., Dambrauskiene, E., Sakalauskienė, S., Samuolienė, G., Brazaityte, A., Duchovskis, P., Urbonaviciene, D. 2012. The effects of different UVB radiation intensities on morphological and biochemical characteristics in *Ocimum basilicum* L. *J. Sci. Food Agric.* 93, 1266-1271. <https://doi.org/10.1002/jsfa.5879>
- Schneider, C.A., Rasband, W.S., and Eliceiri, K.W. 2012. NIH image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods* 9, 671-675. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>
- Sellami, I.H., Maamouri, E., Chahed, T., Wannas, W.A., Kchouk, M.E., and Marzouk, B. 2009. Effect of growth stage on the content and composition of the essential oil and phenolic fraction of sweet marjoram (*Origanum majorana* L.). *Ind. Crops. Prod.* 30, 95-402. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2009.07.010>
- Sgherri, C., Pérez-López, U., Micaelli, F., Miranda-Apodaca, J., Mena-Petite, A., Munoz-Rueda, A., Frank Quartacci, M. 2017. Elevated CO₂ and salinity are responsible for phenolics-enrichment in two differently pigmented lettuces. *Plant Physiol. Biochem.* 115, 269-278. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.04.006>
- Shabala, S., and Munns, R. 2012. Salinity stress: Physiological constraints and adaptive mechanisms. In Shabala, S. (ed.) *Plant Stress Physiology* (59-93). CABI, Wallingford, UK. <https://doi.org/10.1079/9781845939953.0059>
- Shabala, S., Wu, H., and Bose, J. 2015. Salt stress sensing and early signaling events in plant roots: Current knowledge and hypothesis. *Plant Sci.* 241, 109-119. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2015.10.003>
- Sharma, P., Jha, A. B., Dubey, R. S., Pessarakli, M. 2012. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *J. Exp. Bot.* 2012, 217037. <https://doi.org/10.1155/2012/217037>
- Sivankalyani, V., Sela, N., Feygenberg, O., Zemach, H., Maurer, D., and Alkan, N. 2016. Transcriptome dynamics in mango fruit peel reveals mechanisms of chilling stress. *Front. Plant Sci.* 7, 1579. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01579>
- Sonneveld, C., and Straver, N. 1994. Nutrient solutions for vegetables and flowers grown in water or substrates. 10th ed. Series: Voedingsoplossingen Glastuinbouw N°8. PBG, Aalsmeer, Naaldwijk, The Netherlands.
- Sumner, M.J. 2015. Epoxy resins for light and transmission electron microscopy. In Yeung, E.C.T., Stasolla, C., Summer, M., and Huang, B. (eds.) *Plant micro techniques and protocols* (83-101). Springer, Cham, Switzerland. https://doi.org/10.1007/978-3-319-19944-3_5
- Tanji, K. K., & Kielen, N. C. 2002. *Agricultural Drainage Water Management in Arid and Semi-Arid Areas* (FAO Irrigation and Drainage Paper 61). FAO Corporate Document Repository. Recuperado de <http://www.fao.org/3/a-ap103e.pdf>
- Tharasena, B., Lawan, S., 2014. Phenolics, flavonoids and antioxidant activity of vegetables as Thai side dish. *APCBEE Procedia* 8, 99-104. <https://doi.org/10.1016/j.apcbee.2014.03.008>

- Xie, C., Zhang, R., Qu, Y., Miao, Z., Zhang, Y., Shen, X., Wang, T., Dong, J. 2012. Overexpression of MtCAS31 enhances drought tolerance in transgenic Arabidopsis by reducing stomatal density. *New Phytol.* 195, 124-135. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2012.04136.x>
- Xu, C., Mou, B. 2015. Evaluation of Lettuce Genotypes for Salinity Tolerance. *HortScience* 50, 1441–1446. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.50.10.1441>
- Yadav, S., Irfan, M., Ahmad, A., Hayat, S. 2011. Causes of salinity and plant manifestations to salt stress: A review. *J. Environ. Biol.* 32, 667-685. http://www.jeb.co.in/journal_issues/201109_sep11/paper_22.pdf
- Zlotek, U., Swieca, M., Jakubczyk, A. 2014. Effect of abiotic elicitation on main health-promoting compounds, antioxidant activity and commercial quality of butter lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Food Chem.* 148, 253–260. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.10.031>
- Zörb, C., Hühling, K., Kutschera, U., Geilfus, C.M. 2015. Salinity Stiffens the Epidermal Cell Walls of Salt-Stressed Maize Leaves: Is the Epidermis Growth-Restricting? *PLoS One.* 10, e0118406. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118406>

6.3.- Efecto de la aplicación de diferentes concentraciones de cloruro de sodio (NaCl) sobre el rendimiento y concentración de compuestos fenólicos de lechugas Lollo Bionda cv. 'Levistro' y Lollo Rosso cv. 'Carmolí' y su identificación por cromatografía líquida

6.3.1.- Introducción

El exceso de salinidad puede tener consecuencias perjudiciales en el crecimiento y desarrollo de las plantas y en casos extremos, incluso, causar la muerte (Munns y Tester, 2008). Sin embargo, la salinidad se considera un factor de estrés químico que ha demostrado afectar tanto la calidad física como la composición química de diversas hortalizas. Este estrés es capaz de mejorar atributos como el color, la textura, apariencia visual, firmeza y sabor, así como también las propiedades promotoras de salud debido a que provoca un incremento en la concentración de antioxidantes y compuestos bioactivos (Rouphael *et al.*, 2018; Hawrylak-Nowak *et al.*, 2021).

En este sentido, se ha observado que niveles leves o moderados de salinidad de entre 25 y 50 mmol L⁻¹ de NaCl pueden tener un efecto estimulante en la síntesis y acumulación de metabolitos secundarios, mejorando el potencial antioxidante y calidad funcional de las hortalizas de fruto como melón, sandía, tomate, pimentón, pepino y frutilla (Rouphael *et al.*, 2018). Por otro lado, se ha reportado que concentraciones de entre 25 y 80 mmol L⁻¹ de NaCl serían capaces de mejorar la calidad de hortalizas como *Ipomoea acuática*, incrementando la concentración de antocianinas y otros compuestos de interés como los tocoferoles (Kitayama *et al.*, 2021). Además, las concentraciones elevadas de salinidad, de hasta 150 mmol L⁻¹, podrían incrementar de manera significativa la concentración de flavonoides en lechuga (Rouphael *et al.*, 2018). Sin embargo, en variedades de lechuga de interés comercial como Lollo Bionda y Lollo Rosso, no hay información suficiente sobre los cambios en la concentración de los ácidos fenólicos y flavonoides de manera individual.

Dado el potencial de mejora en la calidad funcional de las hortalizas inducida por la salinidad, la implementación de estrategias que incrementen la salinidad en el agua de riego puede ser una valiosa herramienta en la horticultura moderna para satisfacer, por un lado, las demandas de la industria agroalimentaria y por otro, las demandas de los consumidores que buscan productos de alta calidad y que aporten beneficios a su salud. Por lo anterior, el objetivo de este ensayo es evaluar el efecto de diferentes concentraciones de cloruro de sodio (NaCl), aplicadas a la solución nutritiva, durante el cultivo de las lechugas Lollo Bionda cultivar 'Levistro' y Lollo Rosso cultivar 'Carmolí' en la identificación y cuantificación de compuestos fenólicos mediante cromatografía líquida de alto rendimiento.

6.3.2.- Metodología

6.3.2.1- Material vegetal y condiciones de cultivo

El material vegetal utilizado en este ensayo correspondió a lechugas de tipo Lollo Bionda cultivar 'Levistro' (hojas verdes) y de tipo Lollo Rosso cultivar 'Carmolí' (hojas rojas) de la empresa Rijk Zwaan, las cuales fueron cultivadas como se describe en la sección 4.1, durante la temporada de primavera. Las características del invernadero donde se llevó a cabo el cultivo correspondieron a las descritas en la sección 5.2.2.1. Las condiciones ambientales de cultivo: temperaturas mínimas y máximas del aire, temperatura, conductividad eléctrica, oxígeno disuelto y pH de la solución nutritiva, fueron registradas durante todo el periodo de cultivo y se presentan en la Figura 6.12.

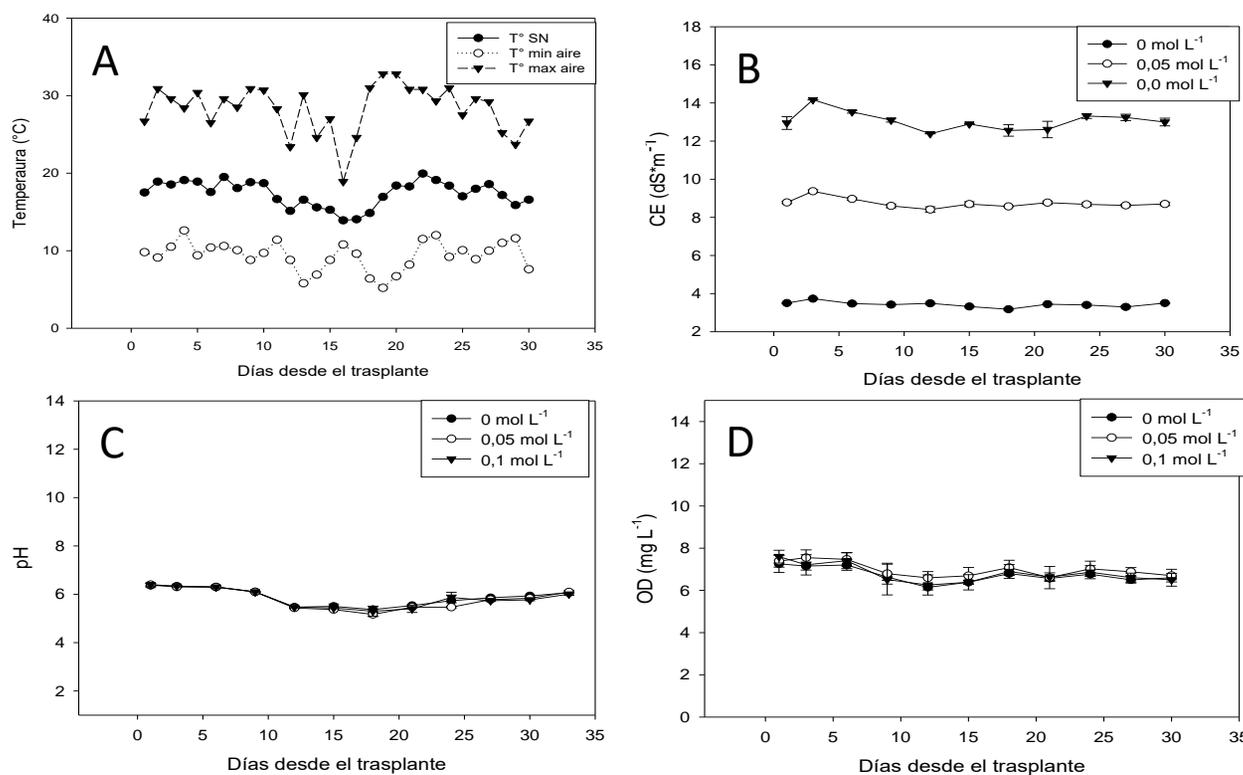


Figura 6.12. Temperaturas medias mínimas y máximas del aire en el invernadero y temperaturas de la solución nutritiva, conductividad eléctrica, pH y oxígeno disuelto en la solución nutritiva registradas durante el cultivo.

En la figura se presentan los parámetros ambientales registrados durante el cultivo de lechugas tipo Lollo Bionda cv. 'Levistro' y Lollo Rosso cv. 'Carmolí' con aplicación de diferentes concentraciones de cloruro de sodio (NaCl): 0; 0,05 y 0,1 mol L⁻¹ en la solución nutritiva. A: Temperaturas máximas y mínimas del aire dentro del invernadero y temperaturas de la solución nutritiva (SN) en °C. B: Conductividad eléctrica (CE) de la SN expresada en dS m⁻¹, C: pH de la SN. D: oxígeno disuelto expresado en mg L⁻¹ presente en la SN. Puntos representan medias ± EE del registro diario, a las 10 am, de tres mediciones por repetición (n=9).

6.3.2.2.- Montaje del ensayo y diseño experimental

Para evaluar el efecto del cloruro de sodio (NaCl) sobre el rendimiento y la concentración e identificación de compuestos fenólicos en lechugas, se estudiaron dos cultivares de lechuga, 'Levistro' y 'Carmolí'. El experimento fue dispuesto en tres bloques con un arreglo de parcelas divididas. La parcela principal correspondió a la concentración de cloruro de sodio aplicado en la solución nutritiva (0; 0,05; 0,1 mol L⁻¹) y la subparcela correspondió al cultivar. Cada bloque representó una repetición, por lo que hubo tres sistemas hidropónicos de raíz flotante independientes para cada tratamiento de NaCl evaluado.

La aplicación de los tratamientos con cloruro de sodio, se realizó mediante la preparación de una solución concentrada de NaCl y la incorporación de una cantidad determinada de esta en cada reservorio de solución nutritiva hasta obtener las tres concentraciones de NaCl deseadas: 0 mol L⁻¹, usado como control; 0,05 mol L⁻¹ y 0,1 mol L⁻¹.

6.3.2.3.- Parámetros de crecimiento de las plantas (MF, MS, % MS)

Los parámetros de crecimiento de masa fresca (MF), masa seca (MS) y porcentaje de masa seca (% MS) fueron obtenidos de acuerdo con la metodología descrita en la sección 4.3.

6.3.2.4.- Parámetros de color (L, C*, hue)

Los parámetros de color fueron evaluados como una característica de calidad de las hojas y se evaluaron siguiendo la metodología descrita en la sección 5.2.2.4. Los datos fueron analizados utilizando el espacio de color CIE L*a*b* y el software SpectraMagic NX, obteniéndose los valores de luminosidad (L), saturación de color o croma (C*) y el ángulo del tono o matiz (hue) (McGuire, 1992).

6.3.2.5.-Determinación de compuestos funcionales

6.3.2.5.1- Extracción de las fracciones fenólicas

Las extracciones de los compuestos fenólicos solubles se llevaron a cabo siguiendo las recomendaciones de Galieni *et al.* 2015, como se describe en detalle en la sección 4.4.1.

6.3.2.5.2.- Determinación de la concentración de fenoles totales

La concentración de fenoles totales (FT) se midió utilizando el método propuesto por Ainsworth y Gillespie (2007), como se describe en la sección 4.4.2. Los resultados fueron expresados como miligramos equivalentes de ácido gálico por cada 100 gramos masa fresca (mg EAG 100 g⁻¹ MF).

6.3.2.5.3.- Determinación de la concentración de flavonoides totales

La concentración de flavonoides totales se midió siguiendo el método propuesto por Tharasena y Lawan (2014) como se detalla en la sección 5.2.2.5.3. Los resultados de esta determinación fueron expresados como miligramos equivalentes de rutina (eq Rut) en 100 gramos de masa fresca (mg eq Rut 100 g⁻¹ MF).

6.3.2.5.4.- Determinación de la concentración de antocianinas totales

La concentración de antocianinas totales se determinó utilizando el método de pH diferencial siguiendo las recomendaciones de Du *et al.* (2014) y detallado en la sección 5.2.2.5.4. El contenido total de antocianinas se expresó como miligramos equivalentes de cianidina-3-glucósido (eq Cian3gluc) en 100 gramos de masa fresca (mg eq Cian3gluc 100 g⁻¹ MF).

6.3.2.5.5.- Determinación de la capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante (CA) se llevó a cabo mediante dos métodos, descritos en la 4.4.3.

6.3.2.5.5.1.- Método de FRAP

El método de FRAP (Ferric reducing antioxidant power) fue realizado de acuerdo con la metodología propuesta por Benzie y Strain (1996) y detallado en la sección 4.4.3.1. Los resultados fueron expresados como miligramos equivalentes de Trolox (eq Trolox) por cada 100 gramos de materia fresca (mg eq Trolox 100 g⁻¹ MF).

6.3.2.5.5.2.- Método de DPPH

El método de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) fue realizado según la metodología descrita en Gupta y Prakash (2009) como se detalla en la sección 4.4.3.2. Los resultados fueron expresados como miligramos equivalentes de Trolox (eq Trolox) por cada 100 gramos de materia fresca (mg eq Trolox 100 g⁻¹ MF).

6.3.2.6.- Cuantificación e identificación de compuestos fenólicos por UPLC

La cuantificación e identificación de los compuestos fenólicos de tipo ácidos fenólicos y flavonoides, se llevó a cabo mediante cromatografía líquida de ultra alto rendimiento (UPLC) siguiendo las recomendaciones de Romani *et al.* (2002) como se describe en detalle en la sección 5.3.2.6. El espectro de absorción de cada peak fue utilizado para identificar la familia de compuestos a la cual pertenecía y la concentración de los diferentes ácidos fenólicos se determinó utilizando una curva de calibración de ácido clorogénico y expresados como miligramos equivalentes de ácido clorogénico por cada 100 gramos de masa fresca (mg eq ácido clorogénico 100g⁻¹ MF). Por su parte, para la determinación de la concentración de los flavonoides se utilizó una curva de rutina, los resultados fueron expresados como miligramos equivalentes de rutina por cada 100 g de masa fresca (mg eq rutina 100g⁻¹ MF). Para los cálculos finales se consideraron los resultados nueve inyecciones, correspondientes a extracciones de tres muestras por repetición.

6.3.2.7.- Cuantificación e identificación de antocianinas por UPLC

La cuantificación e identificación de antocianinas se llevó a cabo mediante cromatografía líquida de ultra alto rendimiento (UPLC) siguiendo las recomendaciones de Blackhall *et al.* (2018) como se describe en detalle en la sección 5.3.2.7. La concentración de las diferentes antocianinas se expresó como miligramos equivalentes de cianidina 3 glicósido por cada 100 gramos de masa fresca (mg eq cian3gluc 100 g⁻¹ MF) y fueron resultado de medias aritméticas de nueve inyecciones, correspondientes a tres muestras por repetición.

6.3.2.8. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando el software InfoStat versión 2017 (Di Rienzo *et al.*, 2017) como se describe en la sección 4.4.4.

6.3.3.- Resultados y discusión

6.3.3.1.- Rendimiento de lechugas tipo Lollo Bionda y Lollo Rosso cultivadas con diferentes dosis de cloruro de sodio

En la Figura 6.13 se observa el tamaño relativo de las lechugas tipo Lollo Bionda cv. 'Levistro' y Lollo Rosso cv. 'Carmolí', luego de 30 días de cultivo en un sistema hidropónico de raíz flotante con una aplicación de 0, 0,05 y 0,1 mol L⁻¹ de NaCl en la solución nutritiva. En la imagen se observa una reducción en el tamaño de las lechugas producto de la adición de NaCl. El análisis estadístico para la masa fresca de las lechugas confirma esta observación (Figura 6.14). De acuerdo con los análisis estadísticos, la masa fresca mostró una diferencia significativa entre cultivares y para el tratamiento con NaCl. En este sentido el cultivar 'Levistro' presentó mayor MF que el cultivar 'Carmolí', presentando valores en un rango entre 39,40 y 82,9 y 22,5-53,9 g, respectivamente (Figura 6.14). La presencia de NaCl en la solución nutritiva disminuyó la MF en ambos cultivares, siendo una respuesta concentración dependiente. Las plantas de lechuga cultivada con 0,05 mol L⁻¹ de NaCl presentó menor MF que el control y la lechuga cultivada con una concentración de 0,1 mol L⁻¹ de salinidad presentó valores aún menores. La reducción de materia fresca para el cultivar 'Levistro' cuando fueron cultivadas con 0,05 mol L⁻¹ de NaCl fue de un 27 % con respecto al control (0 mol L⁻¹) y de un 53 % cuando fueron cultivadas con 0,1 mol L⁻¹ de NaCl (Figura 6.14 A). De igual manera, el cultivar 'Carmolí' también se vio afectado por la salinidad y mostró un comportamiento similar al cultivar 'Levistro'. Cuando las plantas fueron cultivadas con 0,05 mol L⁻¹ de NaCl presentaron una reducción del 34 % con respecto al control (0 mol L⁻¹). Mientras que las cultivadas con 0,1 mol L⁻¹ de salinidad registraron una reducción del 58 % (Figura 6.14 B). Bartha *et al.* (2015), reportaron un comportamiento similar para el cultivar 'Asparagina', donde se alcanzó una reducción del 31 % cuando las plantas fueron cultivadas con 0,05 mol L⁻¹ de NaCl y del 51 % cuando se utilizó 0,1 mol L⁻¹ de NaCl. Por otro lado, estas reducciones en la masa fresca fueron un poco superiores a las reportadas por Al-Maskri *et al.* (2010) para el cultivar 'Paris Islands Cos', estos autores encontraron que, con respecto al testigo, la MF disminuyó en un 10 y un 41 % cuando las plantas fueron cultivadas con 0,05 mol L⁻¹ y 0,1 mol L⁻¹ de NaCl respectivamente. La variabilidad en las respuestas podría deberse a la sensibilidad innata a la concentración de sal de cada uno de los cultivares (Bartha *et al.*, 2015).

El porcentaje de masa seca también presentó diferencias significativas entre cultivares y tratamiento salino. El cultivar 'Carmolí' registró un mayor porcentaje de MS, con valores entre 5,7 y 7,8 % en comparación con el cultivar 'Levistro' el cual registró valores entre 4,8 y 6,8 % (Figura 6.15). Un alto contenido de NaCl en la solución nutritiva produjo un incremento en el porcentaje de MS en ambos cultivares (Figura 6.15). En el caso del cultivar 'Levistro', al comparar el control (0 mol L⁻¹) con los tratamientos 0,05 mol L⁻¹ y 0,1 mol L⁻¹ de NaCl el incremento fue de 0,8 y 2 puntos porcentuales (Figura 6.15 A). Para el cultivar 'Carmolí' se observó una tendencia similar, registrándose un incremento de 0,8 puntos porcentuales para 0,05 mol L⁻¹ de NaCl con respecto al control y un incremento de 2,1 puntos porcentuales para 0,1 mol L⁻¹ (Figura 6.15 B). Este comportamiento fue informado previamente por Bartha *et al.* (2015) quienes reportaron un mayor porcentaje de MS en hojas de lechuga cultivadas con elevada salinidad. Este aumento podría deberse a la acumulación de iones y la síntesis de solutos compatibles como proteínas, aminoácidos y azúcares, como mecanismo de protección contra el estrés salino (Parida y Das, 2005).

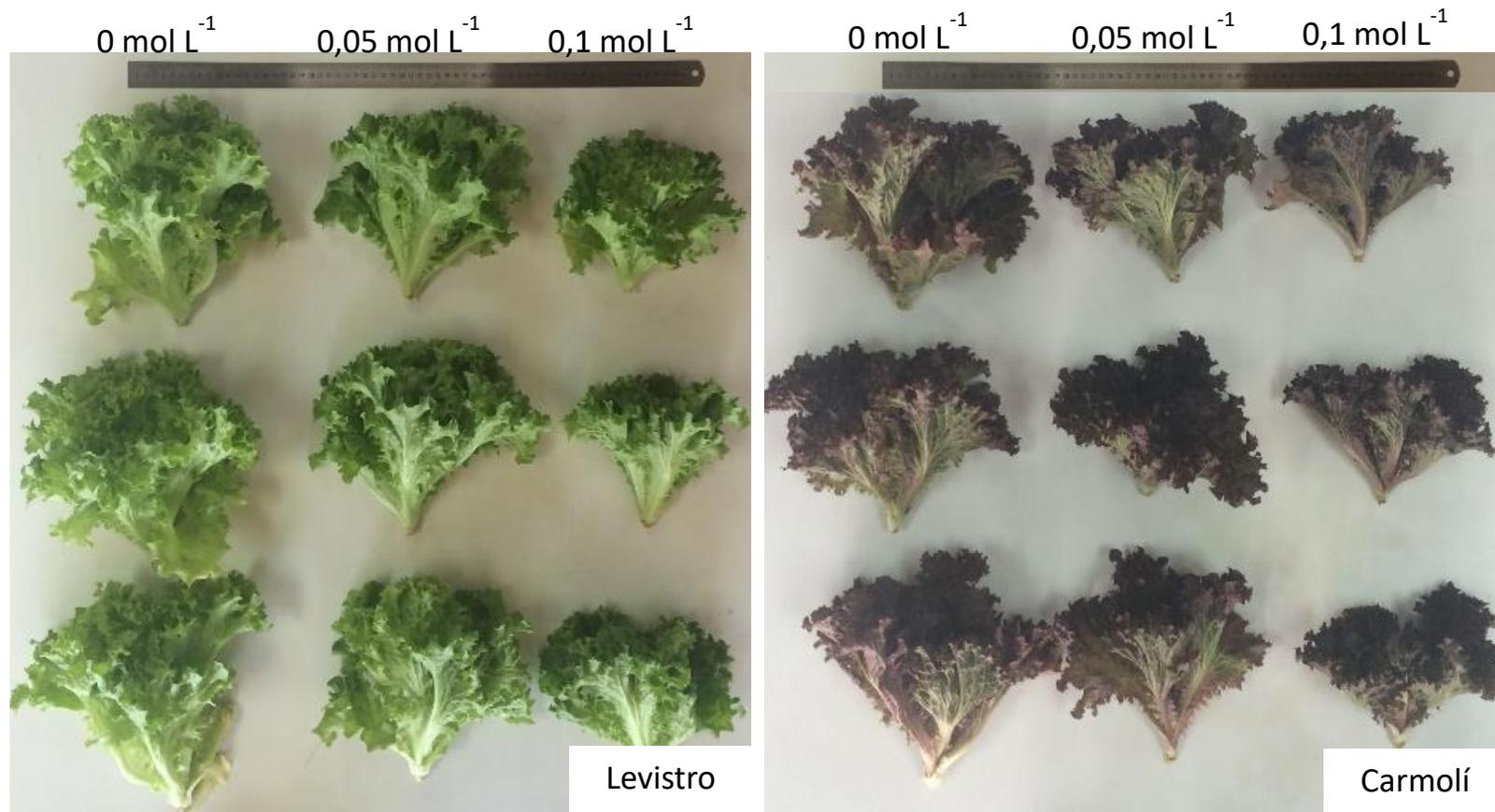


Figura 6.13. Imagen del tamaño comparativo de lechugas tipo Lollo Bionda cv. 'Levistro' y lechugas tipo Lollo Rosso cv. 'Carmolí' cultivadas con diferentes concentraciones de NaCl.

La imagen muestra el efecto de la salinidad (NaCl) sobre el tamaño relativo de lechugas 'Levistro' (izquierda) y 'Carmolí' (derecha) luego de 30 días de cultivo.

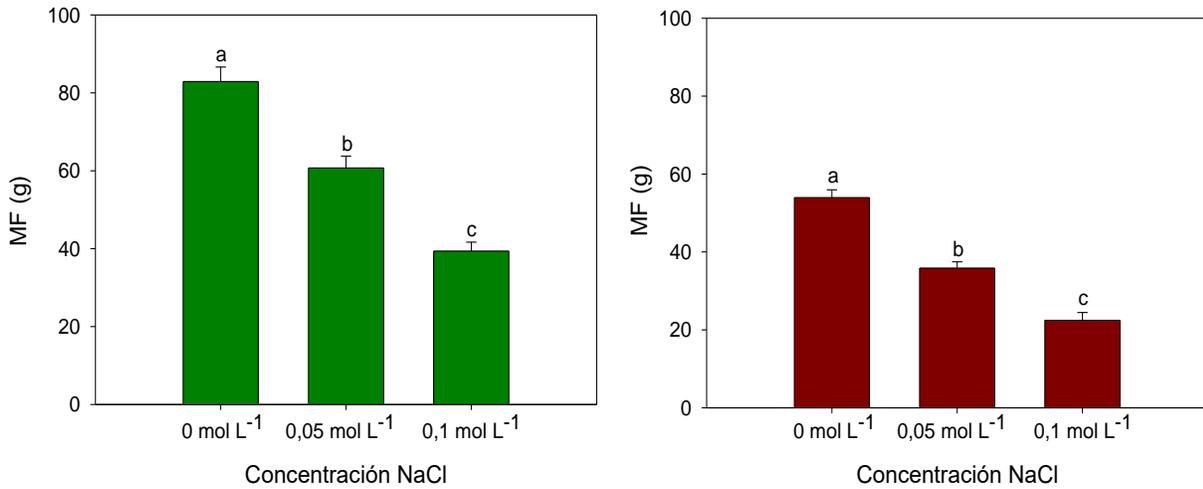


Figura 6.14. Masa fresca (MF) de lechugas tipo Lollo Bionda cv. 'Levistro' y tipo Lollo Rosso cv. 'Carmolí' cultivadas con diferentes concentraciones de NaCl.
 Las gráficas muestran la masa fresca (MF) de lechugas tipo Lollo Bionda cv. 'Levistro' (A) y Lollo Rosso cv. 'Carmolí' (B) cultivadas con diferentes concentraciones de NaCl en la solución nutritiva durante 30 días. Las barras representan medias (\pm EE) de 5 réplicas biológicas por repetición ($n=15$). ^{a,b,c} Letras diferentes corresponden a diferencias significativas determinadas por la prueba de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher con un nivel de significancia de $p < 0,05$.

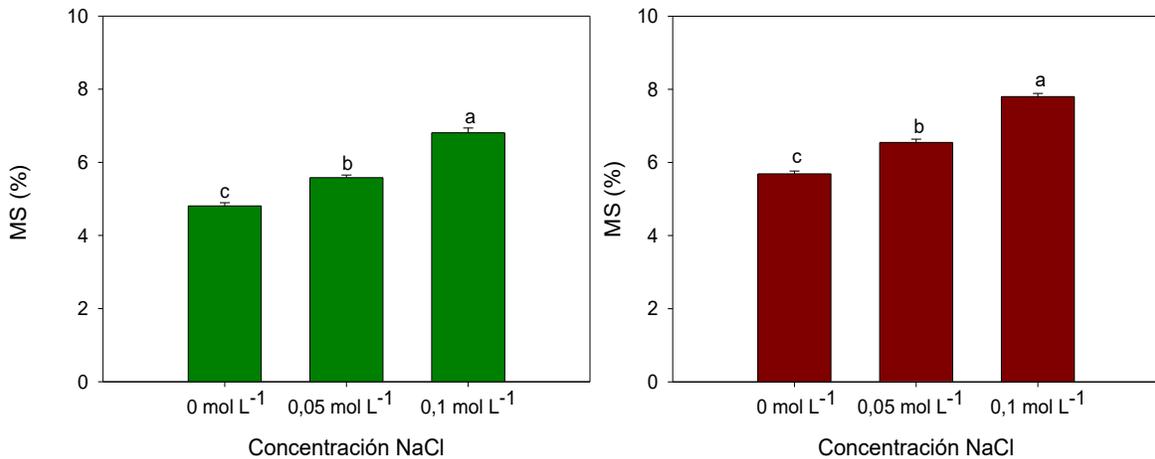


Figura 6.15. Porcentaje de masa seca (%MS) de lechugas tipo Lollo Bionda cv. 'Levistro' y Lollo Rosso cv. 'Carmolí' cultivadas con diferentes concentraciones de NaCl.
 Las gráficas muestran el porcentaje de masa seca (%MS) de lechugas tipo Lollo Bionda cv. 'Levistro' (A) y Lollo Rosso cv. 'Carmolí' (B) cultivadas con diferentes concentraciones de NaCl en la solución nutritiva durante 30 días. Las barras representan medias (\pm EE) de 5 réplicas biológicas por repetición ($n=15$). ^{a,b,c} Letras diferentes corresponden a diferencias significativas determinadas por la prueba de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher con un nivel de significancia de $p < 0,05$.

6.3.3.2.- Color de lechugas tipo Lollo Bionda y Lollo Rosso cultivadas con diferentes concentraciones de cloruro de sodio

El cultivar 'Levistro' presentó una diferencia significativa producto del tratamiento salino en la luminosidad registrando un mayor valor (53,1) cuando las plantas fueron cultivadas con una concentración de 0,05 mol L⁻¹ de NaCl (Tabla 6.7). También se registró un efecto significativo producto de la salinidad para el ángulo hue, donde el mayor valor fue registrado en las plantas crecidas con 0,1 mol L⁻¹ de NaCl, acercándose a tonalidades más verdes (McGuire, 1992). De acuerdo con Bartha *et al.* (2015) el menor contenido de agua registrado en la masa fresca confiere un color verde más oscuro a las hojas de lechuga, lo que podría explicar esta tendencia. Por otro lado, para el cultivar 'Carmolí', el tratamiento salino sólo ejerció un efecto significativo en la saturación de color o croma, disminuyendo su valor a medida que aumentó a concentración de NaCl en la solución nutritiva, lo cual indica una menor definición en el color (Tabla 6.7). Por su parte, la luminosidad y el tono o ángulo hue para este cultivar no presentaron diferencias en respuesta al tratamiento salino.

6.3.3.3.- Concentración de fenoles, flavonoides, antocianinas totales y capacidad antioxidante en lechugas tipo Lollo Bionda y Lollo Rosso cultivadas con diferentes concentraciones de cloruro de sodio

Como se ha reportado previamente, el contenido total de fenoles totales presentó diferencias significativas entre el cultivar 'Levistro' y el cultivar 'Carmolí'. Registrando valores entre 443 y 580 mg EAG 100 g⁻¹ MF para el cultivar verde y entre 3.222 y 4.385 mg EAG 100 g⁻¹ MF para el cultivar rojo (Tabla 6.8). Esta menor concentración en el contenido total de fenoles registrada en los cultivares verdes por sobre los rojos ha sido mencionada anteriormente por Liu *et al.* (2007) y Llorach *et al.* (2008) entre otros. El contenido fenólico más alto observado en el cultivar 'Carmolí' en comparación con el cultivar 'Levistro', se puede atribuir a la presencia de una gran cantidad de ácido fenólico, flavonoides y antocianinas en lechuga con hojas rojas (Liu *et al.*, 2007; Tsormpatsidis *et al.*, 2008).

Cabe destacar que los valores reportados para el cultivar 'Levistro' fueron mayores a los reportados por Llorach *et al.* (2008) y Złotek *et al.* (2014) quienes, para otras lechugas verdes, encontraron rangos entre 18 y 126 mg EAG 100 g⁻¹ MF y entre 40 y 130 mg EAG 100 g⁻¹ MF, respectivamente. Para el caso del cultivar 'Carmolí' también se registraron valores superiores a los informados por Llorach *et al.* (2008) registrando un valor medio de 571 mg EAG 100 g⁻¹ MF para un cultivar no especificado de 'Lollo Rosso'. Estas diferencias en la concentración de fenoles totales entre cultivares han sido reportadas previamente por autores como; Llorach *et al.* (2008) y Mulabagal *et al.* (2010). Adicionalmente Dannehl y Josuttis (2014), reportaron que es posible encontrar enormes diferencias, incluso de 14 veces, en la concentración de compuesto fenólicos al comparar 30 cultivares diferentes de tomate. Lo anterior explicaría las importantes diferencias entre los valores registrados en este estudio con los reportados por otros autores.

Además de las diferencias en los cultivares estudiados y en las condiciones de crecimiento entre los estudios, las diferencias en los protocolos de extracción podrían explicar parcialmente las discrepancias en las concentraciones de compuestos fenólicos y en la actividad antioxidante registrada (Liu *et al.*, 2007; Lafarga *et al.*, 2012). Por otro lado, no sólo la concentración de polifenoles afecta la capacidad antioxidante de los alimentos sino también el tipo de polifenoles estudiados. Se han identificado varios miles de moléculas que tienen una estructura de polifenol, los cuales pueden clasificarse en: (1) ácidos fenólicos, que se pueden subdividir en los derivados del benzoico ácido y los derivados del ácido cinámico; (2) flavonoides, tales como quercetina y antocianinas; (3) estilbenos y (4) lignanos, con diferente capacidad antioxidante (Manach *et al.*, 2004).

Tabla 6.7. Luminosidad, saturación o croma y ángulo hue de lechugas tipo Lollo Bionda cv. 'Levistro' y Lollo Rosso cv. 'Carmolí', cultivadas con diferentes concentraciones de NaCl.

| Tratamiento NaCl (mol L ⁻¹) | Luminosidad | | | | Saturación o croma | | | | Ángulo hue | | | |
|---|-------------------|-----|-----------|-----|--------------------|-----|--------------------|-----|--------------------|-----|-----------|-----|
| | 'Levistro' | | 'Carmolí' | | 'Levistro' | | 'Carmolí' | | 'Levistro' | | 'Carmolí' | |
| | Media | EE | Media | EE | Media | EE | Media | EE | Media | EE | Media | EE |
| 0 | 49,8 ^b | 0,9 | 11,5 | 1,6 | 46,2 | 1,2 | 21,3 ^a | 0,9 | 106,0 ^b | 0,2 | 39,0 | 4,0 |
| 0,05 | 53,1 ^a | 1,0 | 9,2 | 1,4 | 44,6 | 0,7 | 19,8 ^{ab} | 1,1 | 106,2 ^b | 0,2 | 35,2 | 3,7 |
| 0,1 | 48,2 ^b | 0,7 | 7,8 | 1,5 | 45,4 | 0,8 | 16,4 ^b | 1,6 | 106,9 ^a | 0,2 | 31,4 | 4,9 |
| valor <i>p</i> | *** | | ns | | ns | | * | | ** | | ns | |

En la tabla se presentan los diferentes parámetros que definen el color: Luminosidad, saturación o croma y ángulo hue en lechugas tipo Lollo Bionda cv. 'Levistro' y Lollo Rosso cv. 'Carmolí' cultivadas con diferentes concentraciones de NaCl. Los valores representan medias y error estándar (EE) de 30 datos. ^{a,b} Letras diferentes corresponden a diferencias significativas determinadas por la prueba de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher con un nivel de significancia de $p < 0,05$. ns: no significativo; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$.

Existen importantes diferencias en la composición de compuestos fenólicos de variedades verdes y rojas de lechuga. Por ejemplo, Martínez-Sánchez *et al.* (2012) informaron que los ácidos fenólicos fueron el grupo principal de fenoles en variedades de lechugas de hoja verde, mientras que los flavonoles fueron los más abundantes en lechugas de hojas rojas. Estos autores informaron también que las antocianinas, pigmentos altamente antioxidantes pertenecientes al grupo de los flavonoides, sólo estaban presentes en las variedades de hoja roja. Mulabagal *et al.* (2010) mostraron que la mayor actividad biológica de las lechugas rojas, medida como inhibición en la peroxidación de lípidos, está dada por la presencia de antocianinas.

Según los reportes de Mulabagal *et al.* (2010), Złotek *et al.* (2014) y Galieni *et al.* (2015), la concentración de compuestos con actividad antioxidantes como los compuestos fenólicos también responden a las condiciones ambientales. En este sentido, al evaluar el efecto del tratamiento por NaCl para los cultivares estudiados se observó un incremento significativo en la concentración de fenoles totales a medida que aumentó la concentración de NaCl en la solución nutritiva (Tabla 6.8). Al comparar con el control (0 mol L⁻¹ de NaCl) con los tratamientos de 0,05 mol L⁻¹ y 0,1 mol L⁻¹ de NaCl, el cultivar 'Levistro' presentó un aumento en la concentración de fenoles totales de 14 y un 31 %, respectivamente. Para el cultivar 'Carmolí', los resultados siguieron una tendencia similar con un aumento de 14 y 36 % para los tratamientos de 0,05 mol L⁻¹ y 0,1 mol L⁻¹ de NaCl (Tabla 6.8). El incremento en la concentración de fenoles totales, producto del aumento de la concentración de NaCl en la solución nutritiva, confirma los resultados reportados por Colla *et al.* (2012), donde un incremento de 0,001 a 0,03 mol L⁻¹ de NaCl en la solución nutritiva, aumentó la concentración total de polifenoles en alcachofa y cardo en un 6 % e incrementó un 94 y un 190 % la concentración de ácido clorogénico y luteolina, respectivamente.

Por otro lado, la concentración flavonoides totales presentó un comportamiento similar al contenido de fenoles. El cultivar 'Carmolí' presentó una mayor concentración de flavonoides que el cultivar 'Levistro' registrando una concentración entre 1.538 y 1.974 mg eq Rut 100 g⁻¹ MF y entre 449 y 567 mg eq Rut 100 g⁻¹ MF, respectivamente. Además, se registró un incremento significativo en la concentración de flavonoides a medida que se aumentó la concentración de NaCl en la solución nutritiva (Tabla 5.8). En concordancia con los resultados reportados por Garrido *et al.* (2013), para lechuga verde *var. Capitata*, se observó un incremento en la concentración total de flavonoides producto de la concentración de NaCl. Sin embargo, estos autores reportan que este incremento se produjo cuando se alcanzó una concentración de NaCl de 0,15 mol L⁻¹, mientras que en este ensayo el incremento en la concentración de flavonoides totales, tanto para el cultivar 'Levistro' como para

el cultivar 'Carmolí' se observó a partir de concentraciones de NaCl más bajas (0,05 y 0,1 mol L⁻¹) (Tabla 6.8). Para el caso del cultivar 'Levistro', el incremento alcanzado fue del 26 % cuando las plantas fueron cultivadas con una concentración de 0,1 mol L⁻¹ con respecto al control (0 mol L⁻¹). De igual manera, para el cultivar 'Carmolí' el incremento comprando las mismas concentraciones de NaCl (0,1 y 0 mol L⁻¹) alcanzó el 28 %.

La concentración de antocianinas en el cultivar Carmolí aumentó debido al incremento en la concentración de NaCl. Cuando las lechugas fueron cultivadas con una concentración de 0,1 mol L⁻¹ de NaCl registraron 5,4 mg eq Cian 100 g⁻¹ MF, lo cual representa un incremento del 31 % con respecto al control (0 mol L⁻¹ NaCl) (Tabla 6.8). Esta concentración de antocianinas estuvo dentro del rango reportado por Kim *et al.* (2016), entre 2 y 130 mg de antocianinas 100 g⁻¹ MF, para el mismo tipo de lechugas.

Debido a que los compuestos fenólicos: fenoles, flavonoides y antocianinas, son compuestos biológicamente activos, con propiedades antioxidantes (Złotek *et al.*, 2014), la capacidad antioxidante medida por FRAP y DPPH tuvo un comportamiento similar a estas determinaciones en ambos cultivares y respondió a la aplicación de NaCl. En este sentido, la capacidad antioxidante medida por el método de FRAP presentó diferencias significativas entre los cultivares 'Levistro' y 'Carmolí', exhibiendo mayores valores para la variedad de hojas rojas. Así, la CA medida por FRAP exhibió valores entre 165 y 215 mg eq Trolox 100 g⁻¹ MF para 'Levistro', mientras que presentó entre 600 y 818 mg eq Trolox 100 g⁻¹ MF para 'Carmolí' (Tabla 6.8). Estos valores de FRAP se encontraron dentro del rango reportado por Llorach *et al.* (2008) para lechugas de hojas verdes, con valores entre 98 y 320 mg eq Trolox 100 g⁻¹ MF y entre 660 y 810 mg eq Trolox 100 g⁻¹ MF para lechugas rojas. La presencia de ácidos fenólicos y flavonoides, pero sobre todo, la presencia de antocianinas en la lechuga roja, explicaría la alta capacidad antioxidante en las lechugas cv. 'Carmolí' (Tabla 6.8) (Liu *et al.*, 2007).

Por otro lado, se produjo un incremento significativo en la capacidad antioxidante debido al aumento en la concentración de NaCl en la solución nutritiva, para ambos cultivares. Para el cultivar 'Levistro', el incremento con respecto al control (0 mol L⁻¹), fue de un 14 % para las plantas crecidas con 0,05 mol L⁻¹ de NaCl y de un 30 % cuando se incorporó una concentración de 0,1 mol L⁻¹ de NaCl en la solución nutritiva. Para el cultivar 'Carmolí', este incremento fue significativo sólo para la mayor concentración de NaCl evaluada (0,1 mol L⁻¹), registrando un aumento del 36 % en la capacidad antioxidante respecto del control.

Adicionalmente, la CA medida por DPPH, el cultivar 'Levistro' registró valores entre 121 y 173 mg eq Trolox 100 g⁻¹ MF, mientras que el cultivar 'Carmolí' registró valores entre 692 y 954 mg eq Trolox 100 g⁻¹ MF (Tabla 6.8). Estos valores estuvieron dentro del rango presentado por Llorach *et al.* (2008) para lechugas verdes de entre 70 y 240 mg eq Trolox 100 g⁻¹ MF, y ligeramente más altos a los reportados por el mismo autor para lechugas rojas, de entre 580 y 775 mg eq Trolox 100 g⁻¹ MF.

La capacidad antioxidante medida por DPPH también presentó un incremento en respuesta a la salinidad. Con respecto al control (0 mol L⁻¹), el cultivar 'Levistro' presentó un incremento del 21 % de la capacidad antioxidante a una concentración de 0,05 mol L⁻¹ de NaCl y de un 43 % a una concentración de 0,1 mol L⁻¹. Por su parte, el incremento en la capacidad antioxidante medida por DPPH para el cultivar 'Carmolí', a una concentración de 0,05 mol L⁻¹ fue de un 21 % respecto del control y a una concentración de 0,1 mol L⁻¹ fue del 38 % (Tabla 6.8).

Tabla 6.8. Concentración de fenoles, flavonoides, antocianinas totales y capacidad antioxidante para lechugas Lollo Bionda cv. ‘Levistro’ y Lollo Rosso cv. ‘Carmolí’, cultivadas con diferentes dosis de NaCl incorporada en la solución nutritiva.

| Tratamiento NaCl (mol L ⁻¹) | Fenoles totales | | | | Flavonoides totales | | | | Antocianinas totales | | Capacidad antioxidante | | | | | | | |
|---|---|------|---------------------|-------|--|------|---------------------|------|--|-----|---|-----|--|------|--------------------|-----|--------------------|------|
| | ‘Levistro’ | | ‘Carmolí’ | | ‘Levistro’ | | ‘Carmolí’ | | ‘Carmolí’ | | FRAP | | DPPH | | | | | |
| | -----mg EAG 100 g ⁻¹ MF----- | | | | -----mg eq rut 100 g ⁻¹ MF----- | | | | mg eq cian3gluc 100 g ⁻¹ MF | | ---mg eq Trolox 100 g ⁻¹ MF--- | | ---mg eq Trolox 100 g ⁻¹ MF-- | | | | | |
| | Media | EE | Media | EE | Media | EE | Media | EE | Media | EE | Media | EE | Media | EE | Media | EE | Media | EE |
| 0 | 443,0 ^c | 11,3 | 3222,3 ^c | 56,7 | 448,8 ^c | 9,5 | 1538,2 ^c | 50,5 | 4,1 ^b | 0,2 | 165,2 ^c | 4,7 | 600,1 ^b | 17,3 | 121,0 ^c | 7,6 | 692,2 ^c | 30,7 |
| 0,05 | 506,0 ^b | 15,5 | 3689,9 ^b | 112,0 | 512,1 ^b | 13,6 | 1712,6 ^b | 46,4 | 4,3 ^b | 0,2 | 187,9 ^b | 4,5 | 639,2 ^b | 19,6 | 147,1 ^b | 5,0 | 836,4 ^b | 17,2 |
| 0,1 | 580,3 ^a | 18,8 | 4384,8 ^a | 105,9 | 566,6 ^a | 15,2 | 1973,8 ^a | 49,8 | 5,4 ^a | 0,3 | 215,0 ^a | 8,3 | 818,5 ^a | 14,5 | 173,0 ^a | 6,1 | 954,4 ^a | 31,7 |
| valor p | *** | | *** | | *** | | *** | | *** | | *** | | *** | | *** | | *** | |

En la tabla se muestra la concentración de fenoles totales (mg EAG 100 g⁻¹ MF), flavonoides (mg eq rut 100 g⁻¹ MF), antocianinas (mg eq cian3gluc 100 g⁻¹ MF) y capacidad antioxidante medida por los métodos de FRAP (mg eq Trolox 100 g⁻¹ MF) y DPPH (mg eq Trolox 100 g⁻¹ MF) para lechugas Lollo Bionda cv. ‘Levistro’ y Lollo Rosso cv. ‘Carmolí’ cultivadas con diferentes concentraciones de NaCl (mol L⁻¹). Valores representan medias y error estándar (EE) de 9 datos para cada concentración de NaCl. EAG: equivalentes de ácido gálico; eq rut: equivalentes de rutina; eq cian3gluc equivalentes de cianidina 3-glicósido; eq Trolox: equivalentes de Trolox; MF: Masa fresca. ^{a,b,c} Letras diferentes corresponden a diferencias significativas determinadas por la prueba de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher con un nivel de significancia de $p < 0,05$. ns: no significante; ***: $p < 0,001$.

6.3.3.4.- Concentración de ácidos fenólicos y flavonoides en lechugas tipo Lollo Bionda y Lollo Rosso cultivadas con diferentes concentraciones de cloruro de sodio

Las muestras de lechuga cultivadas con diferentes concentraciones de cloruro de sodio en la solución nutritiva presentaron los mismos cromatogramas que las cultivadas con radiación UV-B (Figuras 5.18 y 5.19).

Para el cultivar 'Levistro' el peak N° 1 (Figura 5.18), clasificado como ácido fenólico, fue el segundo ácido fenólico de mayor concentración encontrado en este tipo de lechuga. Debido a su espectro de absorción y su abundancia relativa en lechuga, fue identificado como derivado de ácido clorogénico (Llorach *et al.*, 2008; Santos *et al.*, 2014). Según los resultados de Marin *et al.* (2015), el segundo ácido fenólico de mayor abundancia relativa presente en lechuga correspondería específicamente al ácido 5-cafeoilquinico. En el cultivar 'Levistro', este ácido fenólico mostró un incremento significativo en su concentración a medida que aumentó la concentración de NaCl en la solución nutritiva. Con respecto al control, la concentración del ácido 5-cafeoilquinico en el tratamiento con 0,1 mol L⁻¹ de NaCl presentó una diferencia de 217,2 mg eq ácido clorogénico 100 g⁻¹ MF, lo cual representa un incremento del 82 % (Tabla 6.9). Debido al importante aumento del ácido 5-cafeoilquinico en una condición de cultivo con una alta concentración de NaCl, pudiese considerarse como un indicador para identificar plantas expuestas a este tipo de condición salina.

Por su parte, el peak N° 5, segundo ácido fenólico presentado en la tabla 6.9 y clasificado como un derivado de ácido clorogénico debido a su espectro de absorción, respondió de manera significativa al tratamiento con NaCl. Con respecto al control (0 mol L⁻¹), este derivado de ácido clorogénico registró una reducción en su concentración de 16,9 mg eq ácido clorogénico 100 g⁻¹ MF en las plantas cultivadas con 0,1 mol L⁻¹ de NaCl, lo cual representa una reducción del 37 % con respecto al control (Tabla 6.9).

El peak N° 6, fue el ácido fenólico más abundante. Para el cultivar 'Levistro' alcanzó concentraciones entre 451,2 y 500,4 mg eq ácido clorogénico 100 g⁻¹ MF y no presentó variaciones en su concentración producto del uso de NaCl en la solución nutritiva (Tabla 6.9). Según los reportes de Ribas-Agustí *et al.* (2010); Santos *et al.* (2014) y Marin *et al.* (2015) el ácido el ácido fenólico más abundante en lechugas correspondería al ácido chicórico. Finalmente, en el cultivar 'Levistro', el peak N° 12 también identificado como derivado de ácido clorogénico, mostró un incremento significativo cuando las plantas fueron expuestas a 0,1 mol L⁻¹ de NaCl. Para este tratamiento salino la diferencia en la concentración fue de 10,5 mg eq ácido clorogénico 100 g⁻¹ MF con respecto al control, representando un incremento del 44 %.

Adicionalmente, para el cultivar 'Levistro' se cuantificaron 3 de los 7 compuestos tipo flavonoides encontrados (Tabla 6.10). El peak N° 7 (Figura 5.18), identificado como derivado de quercetina por la semejanza de su espectro de absorción con el espectro de un estándar de quercetina, no mostró diferencias en su concentración en respuesta a la salinidad por NaCl y presentó concentraciones entre 2,5 y 2,7 mg eq rutina 100 g⁻¹ MF (Tabla 6.10). El peak N° 9 fue identificado como luteolina, considerando la semejanza de su espectro con el espectro de absorción de la luteolina reportado por Barbosa *et al.* (2013). Según el reporte de Marin *et al.* (2015), la luteolina presente en las lechugas corresponde específicamente a la luteolina-3-O-glucuronido, la cual en este estudio presentó concentraciones entre 0,2 y 0,4 mg eq rutina 100 g⁻¹ MF y no mostró variaciones en su concentración debido al uso de NaCl (Tabla 6.10).

El peak N° 10, fue el compuesto tipo flavonoide más abundante, por lo que posiblemente corresponda a quercetina 3-O-(6"-O-malonil)-glucósido (Santos *et al.*, 2014; Marin *et al.*, 2015). Este flavonoide, presentó una tendencia a aumentar su concentración cuando se agregaron 0,1 mol L⁻¹ de NaCl en la solución nutritiva, sin embargo, esta tendencia no logró ser significativa (Tabla 6.10).

Tabla 6.9. Concentración de ácidos fenólicos, obtenida por UPLC, para lechuga tipo Lollo Bionda cv. 'Levistro' cultivada con diferentes concentraciones de NaCl.

| Tratamiento NaCl (mol L ⁻¹) | Peak N° 1 | | Peak N° 5 | | Peak N° 6 | | Peak N° 12 | |
|---|--|------|-------------------------------|-----|-----------------|------|-------------------------------|-----|
| | Ácido 5-cafeoilquinico | | Derivado de ácido clorogénico | | Ácido chicórico | | Derivado de ácido clorogénico | |
| | -----mg eq ácido clorogénico 100 g ⁻¹ MF----- | | | | | | | |
| | Media | EE | Media | EE | Media | EE | Media | EE |
| 0 | 264,4 ^b | 26,7 | 45,4 ^a | 4,7 | 463,5 | 59,3 | 23,6 ^b | 2,4 |
| 0,05 | 313,4 ^b | 36,6 | 42,7 ^a | 6,4 | 500,4 | 84,1 | 23,3 ^b | 1,9 |
| 0,1 | 481,6 ^a | 56,1 | 28,6 ^b | 1,4 | 451,2 | 49,6 | 34,1 ^a | 2,6 |
| valor <i>p</i> | ** | | * | | ns | | ** | |

En la tabla se presenta la concentración, determinada por UPLC, de 4 ácidos fenólicos presentes en lechuga Lollo Bionda cv. 'Levistro' cultivada con diferentes concentraciones de NaCl (mol L⁻¹). Los ácidos fenólicos fueron identificados por tiempo de retención, espectro de absorción y abundancia relativa en lechuga. Los valores representan medias y error estándar (EE) de 9 datos expresados en mg eq ácido clorogénico 100 g⁻¹ MF. ^{a,b} Letras diferentes corresponden a diferencias significativas determinadas por la prueba de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher con un nivel de significancia de *p* < 0,05. ns: no significativo; *: *p* < 0,05; **: *p* < 0,01.

Tabla 6.10. Concentración de flavonoides, obtenida por UPLC, para lechuga tipo Lollo Bionda cv. 'Levistro' cultivada con diferentes concentraciones de NaCl.

| Tratamiento NaCl (mol L ⁻¹) | Peak N° 7 | | Peak N° 9 | | Peak N° 10 | |
|---|---|-----|---------------------------|-----|--|-----|
| | Derivado de quercetina | | Luteolina-3-O-glucuronido | | Quercetina 3-O-(6''-O-malonil)-glucósido | |
| | -----mg eq rutina 100 g ⁻¹ MF----- | | | | | |
| | Media | EE | Media | EE | Media | EE |
| 0 | 2,5 | 0,5 | 0,2 | 0,1 | 6,5 | 1,1 |
| 0,05 | 2,7 | 0,7 | 0,4 | 0,2 | 6,8 | 1,5 |
| 0,1 | 2,7 | 0,5 | 0,3 | 0,1 | 9,4 | 1,8 |
| valor <i>p</i> | ns | | ns | | ns | |

En la tabla se presenta la concentración, determinada por UPLC, de 3 compuestos tipo flavonoides presentes en lechuga Lollo Bionda cv. 'Levistro' cultivada con diferentes concentraciones de NaCl (mol L⁻¹). Los flavonoides fueron identificados por tiempo de retención, espectro de absorción y abundancia relativa en lechuga. Valores representan medias y error estándar (EE) de 9 datos expresados en mg eq rutina 100 g⁻¹ MF. ns: no significativo.

Un análisis similar fue realizado para el cultivar 'Carmolí'. Para este cultivar se observó que la concentración del ácido 5-cafeoilquinico (peak N° 1), aumentó de manera significativa a medida que se incrementó la concentración de NaCl en la solución nutritiva. El aumento en la concentración del ácido fue de 1.026,9 mg eq ácido clorogénico 100 g⁻¹ MF, lo cual representa un incremento del 101,8 % con respecto a los 1.008,3 mg eq ácido clorogénico 100 g⁻¹ MF registrados para el control (0 mol L⁻¹ de NaCl). Por su parte, la concentración del peak N° 5, identificado como un derivado de ácido clorogénico también fue afectada de manera significativa por la concentración de NaCl. En este caso, la mayor concentración fue de 136,7 mg eq ácido clorogénico 100 g⁻¹ MF y se obtuvo cuando las lechugas fueron cultivadas con 0,05 mol L⁻¹ de NaCl. Este incremento correspondió a un

46 % con respecto al control, donde se registró un valor de 93,6 mg eq ácido clorogénico 100 g⁻¹ MF (Tabla 6.11). Adicionalmente, la concentración del ácido chicórico (peak N° 6), registró concentraciones entre 1.267,7 y 1.567,6 mg eq ácido clorogénico 100 g⁻¹ MF, sin presentar diferencias de concentración en respuesta al incremento en la concentración de NaCl aplicado a la solución nutritiva. Finalmente, el peak N° 12, identificado como un derivado de ácido clorogénico presentó un aumento significativo al tratamiento con NaCl, registrando a 0,1 mol L⁻¹ de NaCl, un incremento de 28,4 mg eq ácido clorogénico 100 g⁻¹ MF, aumento que representa el 24 % con respecto al valor registrado para control (Tabla 6.11).

El importante aumento del ácido 5-cafeoilquinico registrado tanto en el cultivar 'Carmolí' como en el cultivar 'Levistro' en respuesta al tratamiento con NaCl, podría confirmar la posible utilización de este compuesto como un compuesto indicador de la exposición a estrés por NaCl.

En cuanto a los compuestos de tipo flavonoide, cinco de ellos pudieron ser cuantificados para el cultivar 'Carmolí'. De ellos, el más abundante fue el peak N° 10, que, según su espectro de absorción y abundancia relativa en lechuga, correspondería a la quercetina 3-malonilglucósido (Santos *et al.*, 2014). Este compuesto presentó un incremento significativo de 110,9 mg eq rutina 100 g⁻¹ MF cuando las lechugas fueron cultivadas con 0,1 mol L⁻¹ respecto al control. Incremento que representa un aumento del 21 % (Tabla 6.12).

Los peaks N° 9 y 11 identificados respectivamente como luteolina-3-O-glucuronido y derivado de quercetina, también registraron un incremento de concentración del orden del 20 % respecto del control (0 mol L⁻¹), cuando las lechugas fueron cultivadas con la mayor dosis de NaCl evaluada (0,1 mol L⁻¹). Específicamente la luteolina-3-O-glucuronido registró un incremento del 28,9 %, pasando de registrar 191,1 mg eq rutina 100 g⁻¹ MF, en el control, hasta llegar a 246,4 mg eq rutina 100 g⁻¹ MF cuando se usó 0,1 mol L⁻¹ de NaCl en la solución nutritiva (Tabla 6.12). Por otro lado, el peak N° 11, compuesto derivado de quercetina, registró un incremento del 22,5 %, pasando de una concentración de 20,0 mg eq rutina 100 g⁻¹ MF, registrada en el control, a una concentración de 24,5 mg eq rutina 100 g⁻¹ MF, obtenida cuando las plantas fueron cultivadas con 0,1 mol L⁻¹ de NaCl. Finalmente, los peaks 7 y 8, ambos identificados como derivados de quercetina, no presentaron variaciones de concentración significativas en respuesta a la incorporación de NaCl en la solución nutritiva (Tabla 6.12).

Tabla 6.11. Concentración de ácidos fenólicos, obtenida por UPLC, para lechuga tipo Lollo Rosso cv. 'Carmolí' cultivada con diferentes concentraciones de NaCl.

| Tratamiento NaCl (mol L ⁻¹) | Peak N° 1 | | Peak N° 5 | | Peak N° 6 | | Peak N° 12 | |
|---|--|------|-------------------------------|-----|-----------------|-------|-------------------------------|-----|
| | Ácido 5-cafeoilquinico | | Derivado de ácido clorogénico | | ácido chicórico | | Derivado de ácido clorogénico | |
| | -----mg eq ácido clorogénico 100 g ⁻¹ MF----- | | | | | | | |
| | Media | EE | Media | EE | Media | EE | Media | EE |
| 0 | 1008,3 ^c | 61,1 | 93,6 ^b | 8,1 | 1567,6 | 192,4 | 116,6 ^b | 4,4 |
| 0,05 | 1437,8 ^b | 41,6 | 136,7 ^a | 4,5 | 1267,7 | 75,4 | 115,8 ^b | 6,2 |
| 0,1 | 2035,2 ^a | 44,8 | 97,0 ^b | 4,2 | 1307,2 | 32,3 | 145,0 ^a | 5,8 |
| valor p | *** | | *** | | ns | | *** | |

En la tabla se presenta la concentración, determinada por UPLC, de 4 ácidos fenólicos presentes en lechuga Lollo Rosso cv. 'Carmolí' cultivadas con diferentes concentraciones de NaCl (mol L⁻¹). Los ácidos fenólicos fueron identificados por tiempo de retención, espectro de absorción y abundancia relativa en lechuga. Valores representan medias y error estándar (EE) de 9 datos expresados en mg eq ácido clorogénico 100 g⁻¹ MF ^{a,b,c}. Letras diferentes corresponden a diferencias significativas determinadas por la prueba de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher con un nivel de significancia de $p < 0,05$. ns: no significativo; ***: $p < 0,001$.

Tabla 6.12. Concentración de flavonoides obtenida por UPLC, para lechuga tipo Lollo Rosso cv. 'Carmolí' cultivada con diferentes concentraciones de NaCl.

| Tratamiento NaCl (mol L ⁻¹) | Peak N° 7 | | Peak N° 8 | | Peak N° 9 | | Peak N° 10 | | Peak N° 11 | |
|---|--|------|------------------------|-----|---------------------------|------|--|-------------------|------------------------|-----|
| | Derivado de quercetina | | Derivado de quercetina | | Luteolina-3-O-glucuronido | | Quercetina 3-O-(6''-O-malonil)-glucósido | | Derivado de quercetina | |
| | -----mg eq rutina 100g ⁻¹ MF----- | | | | | | | | | |
| | Media | EE | Media | EE | Media | EE | Media | EE | Media | EE |
| 0 | 117,7 | 14,7 | 48,0 | 6,7 | 191,1 ^b | 16,0 | 527,0 | 28,5 ^b | 20,0 ^b | 1,2 |
| 0,05 | 98,2 | 8,6 | 50,7 | 5,9 | 213,5 ^{ab} | 18,6 | 537,1 | 19,4 ^b | 20,8 ^b | 1,1 |
| 0,1 | 107,5 | 6,4 | 50,9 | 5,2 | 246,4 ^a | 6,6 | 637,9 | 8,1 ^a | 24,5 ^a | 1,0 |
| valor p | ns | | ns | | * | | ** | | * | |

En la tabla se presenta la concentración, determinada por UPLC, de 5 flavonoides presentes en lechuga Lollo Rosso cv. 'Carmolí' cultivada con diferentes concentraciones de NaCl (mol L⁻¹). Los flavonoides fueron identificados por tiempo de retención, espectro de absorción y abundancia relativa en lechuga. Valores representan medias y error estándar (EE) de 9 datos expresados en mg eq rutina 100g⁻¹ MF. ^{a,b} Letras diferentes corresponden a diferencias significativas determinadas por la prueba de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher con un nivel de significancia de $p < 0,05$. ns: no significativo; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$.

6.3.3.5.- Concentración de antocianinas en lechugas tipo Lollo Rosso cultivadas con diferentes concentraciones de cloruro de sodio

Por su parte, dos de las tres antocianinas identificadas fueron cuantificadas (Tabla 6.13). La concentración de la cianidina 3-O-glicósido varió entre 29 y 37 mg eq cian3gluc 100 g⁻¹ MF mientras que la de cianidina 3-O-(6''-O malonil)-glicósido varió entre 33 y 43 mg eq cian3gluc 100 g⁻¹ MF. A diferencia de lo reportado por Hawrylak-Nowak *et al.* (2021) para melisa donde la aplicación de NaCl produjo un incremento significativo de las antocianinas en la lechuga Lollo Rosso cv. 'Carmolí' no se observó este efecto.

Tabla 6.13. Concentración de antocianinas obtenida por UPLC, para lechuga tipo Lollo Rosso cv. 'Carmolí' cultivadas con diferentes concentraciones de NaCl.

| Tratamiento NaCl (mol L ⁻¹) | Antocianina N° 1 | | Antocianina N° 3 | |
|---|--|-----|---|-----|
| | cianidina 3-O-glicósido | | cianidina 3-O-(6''-O malonil)-glicósido | |
| | -----mg eq cian3gluc 100 g ⁻¹ MF----- | | | |
| | Media | EE | Media | EE |
| 0 | 29,2 | 4,3 | 33,8 | 5,3 |
| 0,05 | 36,6 | 6,8 | 43,2 | 8,6 |
| 0,1 | 32,8 | 7,2 | 42,1 | 9,1 |
| valor p | ns | | ns | |

En la tabla se presenta la concentración, determinada por UPLC, de 2 antocianinas presentes en lechuga Lollo Rosso cv. 'Carmolí' cultivadas con diferentes concentraciones de NaCl (mol L⁻¹). Las antocianinas fueron identificadas por tiempo de retención, espectro de absorción y abundancia relativa en lechuga. Valores representan medias y error estándar (EE) de 9 datos expresados en mg eq cian3gluc 100 g⁻¹ MF. ns: no significativo.

6.3.4.- Conclusiones

La aplicación de NaCl durante el cultivo de lechugas de los cultivares 'Levistro' y 'Carmolí' resultó en una reducción del peso fresco y un aumento significativo en la concentración de compuestos fenólicos totales y en la capacidad antioxidante de las lechugas. Esta respuesta demostraría un efecto del aumento en la concentración de NaCl y de la CE en la activación y acumulación de compuestos antioxidantes. Por lo tanto, es posible obtener lechugas enriquecidas con antioxidantes mediante la aplicación controlada de sal (NaCl) durante el cultivo.

A pesar de las diferencias entre los cultivares, tanto 'Levistro' como 'Carmolí' exhibieron una respuesta similar al incremento en la salinidad y CE. Ambos cultivares mostraron un incremento significativo en la concentración del ácido 5-cafeoilquinico, el cual, después de su evaluación en diferentes cultivares de hoja verde y roja, podría ser utilizado como un fitoquímico indicador de la exposición al estrés por NaCl.

6.3.5.- Bibliografía

- Ainsworth, E.A., and Gillespie, K. M. 2007. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent. *Nat. Protoc.* 2, 875- 877. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.102>
- Al-Maskri, A., Al-Kharusi, L., Al-Miqbali., H., Khan, M.M. 2010. Effects of salinity stress on growth of lettuce (*Lactuca sativa*) under closed-recycle nutrient film technique. *Int. J. Agric. Biol.* 12, 377–380. http://www.fspublishers.org/published_papers/90819..pdf
- Barbosa da Silva, J., dos Santos Temponi, V., Miranda Gasparetto, C., Luiz Fabri, R., de Oliveira Aragão, D.M., de Castro Campos Pinto, N., Ribeiro, A., Scio, E., Del-Vechio-Vieira, G., Vieira de Sousa, O., Alves, M.S. 2013. *Vernonia condensata* Baker (Asteraceae): A Promising Source of Antioxidants. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2013. 698018. <https://doi.org/10.1155/2013/698018>
- Bartha, C., Fodorpataki, L., Martinez-Ballesta, M., Popescu, O., and Carvajal, M. 2015. Sodium accumulation contributes to salt stress tolerance in lettuce cultivars. *J. Appl. Bot. Food Qual.* 88, 42-48. <https://doi.org/10.5073/JABFQ.2015.088.008>
- Benzie, I.F. and Strain, J.J., 1996. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of ‘Antioxidant Power’: The FRAP Assay. *Anal. Biochem.* 239, 70–76. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>
- Blackhall, M., Berry, R., Davies, N., Walls, J. 2018. Optimized extraction of anthocyanins from Reid Fruits’ *Prunus avium* ‘Lapins’ cherries. *Food chem.* 256, 280–285. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.02.137>
- Colla, G., Roupael, Y., Cardarelli, M., Svecova, E., Rea, E., Lucini, L. 2012. Effects of saline stress on mineral composition, phenolic acids and flavonoids in leaves of artichoke and cardoon genotypes grown in floating system. *J. Sci. Food Agric.* <https://doi.org/10.1002/jsfa.5861>
- Dannehl, D., & Josuttis, M. 2014. Cultivar and production effects on bioactive polyphenols. In R.R. Watson (Ed.), *Polyphenols in Plants, Isolation, Purification and Extract Preparation* (1st ed., pp. 3-13). *Academic Press.* <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397934-6.00001-2>
- Di Rienzo, J.A., Casanoves, F., Balzarini, M.G., Gonzalez, L., Tablada, M., and Robledo, C.W. InfoStat versión., 2017. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. Disponible en <http://www.infostat.com.ar>
- Du, W.-X., Avena-Bustillos, R., Breksa, A., McHugh, T., 2014. UV-B light as a factor affecting total soluble phenolic contents of various whole and fresh-cut specialty crops. *Postharvest Biol Technol.* 93, 72-82. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2014.02.004>
- Galieni, A., Di Mattia, C., De Gregorio, M., Specca, S., Mastrocola, D., Pisante, M., Stagnari, F. 2015. Effects of nutrient deficiency and abiotic environmental stresses on yield, phenolic compounds, and antiradical activity in lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Sci. Hort.* 187, 93-101. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.02.036>
- Garrido, Y., Tudela, J.A., Marín, A., Mestre, T., Martínez, V., Gil, M.I. 2013. Physiological, phytochemical, and structural changes of multi-leaf lettuce caused by salt stress. *J. Sci. Food Agric.* 94, 1592-1599. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6462>
- Gupta S, Prakash J, 2009. Studies on Indian green leafy vegetables for their antioxidant Activity. *Plant Foods Hum. Nutr.* 64:39-45. <https://doi.org/10.1007/s11130-008-0096-6>
- Hawrylak-Nowak, B., Dresler, S., Stasinska-Jakubas, M., Wójciak, M., Sowa, I., Matraszek Gawron, R. 2021. NaCl-Induced Elicitation Alters Physiology and Increases Accumulation of Phenolic Compounds in *Melissa officinalis* L. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 6844. <https://doi.org/10.3390/ijms22136844>
- Kim, H.-J.; Fonseca, J.M.; Choi, J.-H.; Kubota, C.; Kwon, D.Y. 2008. Salt in irrigation water affects the nutritional and visual properties of romaine lettuce (*Lactuca sativa* L.). *J. Agric. Food Chem.* 56, 3772–3776. <https://doi.org/10.1021/jf0733719>

- Kim, M., Moon, Y., Tou, J., Mou, B., and Waterland, N. 2016. Nutritional value, bioactive compounds, and health benefits of lettuce (*Lactuca sativa* L.). *J. Food Compost. Anal.* 49, 19-34. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2016.03.004>
- Kitayama, M.; Tisarum, R.; Theerawitaya, C.; Samphumphung, T.; Takagaki, M.; Kirdmanee, C.; Cha-Um, S. 2019. Regulation on anthocyanins, α -tocopherol and calcium in two water spinach (*Ipomoea aquatica*) cultivars by NaCl salt elicitor. *Sci. Hortic.* 249, 390–400. <https://doi.org/10.3390/ijms22136844>.
- Lafarga, T., Villaró, S., Rivera, A., Bobo, G., Aguiló-Aguayo, I. 2020. Bioaccessibility of polyphenols and antioxidant capacity of fresh or minimally processed modern or traditional lettuce (*Lactuca sativa* L.) varieties. *J. Food Sci. Technol.* 57, 754–763. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-04108-7>
- Liu, X., Ardo, S., Bunning, M., Parry, J., Zhou, K., Stushnoff, C., Stoniker, F., Yu, L., Kendall, P., 2007. Total phenolic content and DPPH* radical scavenging activity of lettuce (*Lactuca sativa* L.) grown in Colorado. *LWT Food Sci. Technol.* 40, 552-557. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2005.09.007>
- Llorach, R., Martínez-Sánchez, A., Tomás-Barberán, F.A., Gil, M.I., Ferreres, F., 2008. Characterization of polyphenols and antioxidant properties of five lettuce varieties and escarole. *Food Chem.* 108, 1028–1038. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.11.032>
- López-Berenguer, C., Martínez-Ballesta, M.D.C., Moreno, D.A., Carvajal, M., GarcíaViguera, C., 2009. Growing hardier crops for better health: salinity tolerance and the nutritional value of broccoli. *J. Agric. Food Chem.* 57, 572–578. <http://dx.doi.org/10.1021/jf802994p>
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., Jiménez, L. 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* 79, 727–747. <https://doi.org/10.1093/ajcn/79.5.727>
- Marin, A., Ferrer, F., Barberá, G.G., Gil, M.I. 2015. Weather Variability Influences Color and Phenolic Content of Pigmented Baby Leaf Lettuces throughout the Season. *J. Agric. Food Chem.* 63, 1673–1681. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b00120>
- Martínez-Sánchez, A., Luna, M.C., Selma, M.V., Tudela, J.A., Abad, J., Gil, M.I. 2012. Baby-leaf and multi-leaf of green and red lettuces are suitable raw materials for the fresh-cut industry. *Postharvest Biol. Technol.* 63, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2011.07.010>
- McGuire, R. 1992. Reporting of objective color measurements. *HortScience* 27, 1254-1255. <https://doi.org/10.21273/hortsci.27.12.1254>
- Mulabagal, V., Ngouajio, M., Nair, A., Zhang, Y., Gottumukkala, A., Nair, M. 2010. In vitro evaluation of red and green lettuce (*Lactuca sativa*) for functional food properties. *Food Chem.* 118, 300-306. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.04.119>
- Munns, R., and Tester, M. 2008. Mechanisms of salinity tolerance. *Ann. Rev. Plant Biol.* 59, 651-681. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092911>
- Parida, A., Das, A. 2005. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 60, 324-349. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2004.06.010>
- Ribas-Agustí, A., Gratacós-Cubarsí, M., Sárraga, C., García-Regueiro, J.A., Castellari, M. 2010. Analysis of eleven phenolic compounds including novel p-coumaroyl derivatives in lettuce (*Lactuca sativa* L.) by ultra-high-performance Liquid chromatography with photodiode array and mass spectrometry detection. *Phytochem. Anal.* 22, 555–563. <https://doi.org/10.1002/pca.1318>
- Romani, A., Pinelli, P., Galardi, C., Sani, G., Cimato, A., and Heimler, D. 2002. Polyphenols in greenhouse and open-air-grown lettuce. *Food Chem.* 79, 337-342. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00170-X](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00170-X).
- Rouphael, Y.; Petropoulos, S.A.; Cardarelli, M.; Colla, G. 2018. Salinity as eustressor for enhancing quality of vegetables. *Sci. Hortic.* 234, 361–369. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.02.048>

Santos, J., Oliveira, M.B.P.P., Ibáñez, E., Herrero, M. 2014. Phenolic profile evolution of different ready-to-eat baby-leaf vegetables during storage. *J. Chromatogr. A.* 1327, 118– 131. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2013.12.085>

Tharasena, B., Lawan, S., 2014. Phenolics, flavonoids and antioxidant activity of vegetables as Thai side dish. *APCBEEProcedia* 8, 99–104. <https://doi.org/10.1016/j.apcbee.2014.03.008>

Tsormpatsidis, E., Henbest, RGC., Davis, NH., Hadley, P., Wagstaffe, A. 2008. UV irradiance as a major influence on growth, development, and secondary products of commercial importance in Lollo Rosso lettuce ‘Revolution’ grown under polyethylene films. *Environ. Exp. Bot.* 63, 232–239. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2007.12.002>

Viacava, G., Roura, S., Berrueta, L., Iriando, C., Gallo, B., Alonso-Salces, R. 2017. Characterization of phenolic compounds in green and red oak leaf lettuce cultivars by UHPLC-DAD-ESI-QToF/MS using MSE scan mode. *J. Mass Spectrom.* 52, 873–902. <https://doi.org/10.1002/jms.4021>

Zlotek, U., Swieca, M., Jakubczyk, A., 2014. Effect of abiotic elicitation on main health-promoting compounds, antioxidant activity and commercial quality of butter lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Food Chem.* 148, 253–260. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.10.031>

6.4.- Efecto del uso de estrategias de postcosecha que involucran bajas temperaturas en combinación con una concentración de gases con bajo O₂ y moderado CO₂, en la concentración de compuestos fenólicos lechugas tipo Lollo Bionda cv. 'Levistro' y Lollo Rosso cv. 'Carmolí', provenientes de un tratamiento de campo con adición de NaCl en la solución nutritiva

6.4.1.- Introducción

La salinidad por NaCl, aplicada a la solución nutritiva durante el cultivo de lechugas, puede tener un positivo en la acumulación de compuestos fenólicos mejorando la capacidad antioxidante y por tanto la calidad funcional de este tipo de hortalizas (Rouphael *et al.*, 2018; Kitayama *et al.*, 2021; Hawrylak-Nowak *et al.*, 2021). Este comportamiento quedó demostrado en las secciones 6.1, 6.2 y 6.3 donde la concentración de los compuestos fenólicos estudiados, fenoles, flavonoides y antocianinas totales en las plantas de lechuga, resultaron en un incremento en respuesta a la presencia de salinidad por NaCl en la solución nutritiva (0,05; 0,1 mol L⁻¹) cuando fueron comparadas con el control (0 mol L⁻¹). Sin embargo, si la postcosecha de las hortalizas, en este caso de las lechugas no es adecuada, se produce un incremento en la concentración de especies reactivas de oxígeno. Para combatir este incremento en las EROs el producto debe utilizar sus reservas de compuestos antioxidantes para contrarrestar este estrés, lo que a su vez elimina la ventaja de ser una buena fuente de antioxidantes (Meitha *et al.*, 2020).

Debido a lo anterior se hace necesario buscar estrategias postcosecha que logren proteger la acumulación de compuestos fenólicos alcanzada durante el cultivo, mediante el uso de NaCl en la concentración nutritiva, y asegurar su llega al consumidor. Dentro de las estrategias postcosecha destacan el uso de bajas temperaturas (Saini *et al.*, 2016; Meitha *et al.*, 2020) y el uso de embalajes con atmósfera modificada (EAM) (De Corato, 2019). Si bien el uso de estas estrategias está ampliamente distribuido en hortalizas como la lechuga, algunos autores han demostrado que la respuesta a la baja temperatura es variedad dependiente (Lafarga *et al.*, 2020) y que los beneficios de los envases en atmosfera modificada (EAM) dependen de una serie de factores, como la especie, el cultivar, prácticas culturales etapa de desarrollo y manejo postcosecha entre otros (Ghidelli y Pérez-Gago, 2017).

En consecuencia, el objetivo de este ensayo consistió en evaluar, durante un periodo corto de conservación, el comportamiento de la concentración de compuestos fenólicos mediante el uso de estrategias de postcosecha que involucran bajas temperaturas en combinación con una concentración de bajo O₂ y moderado CO₂ en lechugas tipo Lollo Bionda y Lollo Rosso provenientes de un tratamiento de campo que incorporó la adición de NaCl en la solución nutritiva. Para ello se utilizó la siguiente metodología.

6.4.2- Metodología

6.4.2.1.- Material vegetal y condiciones de cultivo

El material vegetal utilizado en este experimento correspondió a lechugas de tipo Lollo Bionda cultivar 'Levistro' (hojas verdes) y de tipo Lollo Rosso cultivar 'Carmolí' (hojas rojas) de la empresa Rijk Zwaan (Chile). La germinación de las semillas de lechuga de ambos cultivares, condiciones de cultivo de los almácigos y trasplante se llevó a cabo como se detallada en la sección 4.1 durante la temporada de otoño. Las características del invernadero donde se llevó a cabo el cultivo correspondieron a las descritas en la sección 5.2.2.1.

Los cultivares de lechuga 'Levistro' y 'Carmolí' se organizaron en tres bloques utilizando un arreglo de parcelas divididas, donde la parcela principal correspondió a la concentración de NaCl aplicada (0; 0,05; 0,1 mol L⁻¹), mientras que la subparcela correspondió al cultivar. Cada bloque se

consideró como una repetición por lo que hubo tres sistemas hidropónicos independientes para cada tratamiento evaluado.

La aplicación de los tratamientos con cloruro de sodio (NaCl) se llevó a cabo como se describe en la sección 6.2.2.2 obteniéndose una concentración de 0; 0,05 y 0,1 mol L⁻¹ de NaCl en la solución nutritiva.

Una vez que las lechugas del grupo de control alcanzaron un tamaño adecuado para la cosecha, después de 30 días, se cosecharon las plantas completas para su análisis. Con el objetivo de contar con suficiente material vegetal para el ensayo de postcosecha, las plantas de un mismo cultivar, provenientes de las tres repeticiones de cada tratamiento salino, fueron mezcladas.

6.4.2.2.- Mínimo procesamiento en fresco

Una vez cosechadas las plantas de lechugas, el material vegetal fue llevado a una sala de procesos a 5°C donde se realizó el procesamiento mínimo, descrito en detalle en la sección 5.4.2.2.

6.4.2.3.- Montaje y diseño experimental

El experimento consistió en un diseño factorial de 2 x 2 x 3 donde el primer factor correspondió a la temperatura de almacenamiento: 5 o 10 °C; el segundo factor correspondió a la concentración de gases utilizada para el almacenamiento: aire o barrido de nitrógeno (N₂) y el tercer factor correspondió a la concentración de NaCl aplicada en la solución nutritiva durante el cultivo (0; 0,05; 0,1 mol L⁻¹). Cabe destacar que se realizaron mediciones a cosecha y luego de 3 días de almacenamiento, simulando el periodo que transcurre desde la cosecha hasta que el producto llega al consumidor.

Las características de los envases plásticos y las concentraciones de gases utilizadas para el almacenamiento correspondieron a las detalladas en la sección 5.4.2.3. Una vez envasadas y selladas, las bolsas fueron almacenadas en oscuridad a 5 y 10 °C. Los resultados de este experimento fueron presentados separados por cultivar: 'Levistro' y 'Carmolí'.

6.4.2.4.- Monitoreo concentración de gases dentro de la bolsa

La composición gaseosa del espacio de cabeza (O₂ y CO₂) de las bolsas fue monitoreada durante 3 días utilizando un analizador tipo Dansensor CheckPoint como se describe en la sección 5.4.2.4. La concentración de gases dentro de las bolsas almacenadas a 5°C se presenta en la Figura 6.16, mientras que la composición gaseosa en las bolsas almacenadas a 10 °C se presenta en la Figura 6.17.

6.4.2.5.-Determinación de compuestos funcionales

6.4.2.5.1- Extracción de las fracciones fenólicas

La extracción de los compuestos fenólicos se llevó a cabo siguiendo las recomendaciones de Galieni *et al.* (2015), como se detalla en la sección 4.4.1.

6.4.2.5.2.- Determinación de la concentración de fenoles totales

La concentración de fenoles totales (FT) se midió utilizando el método propuesto por Ainsworth y Gillespie (2007), como se describe en detalle en la sección 4.4.2. Los resultados fueron expresados como miligramos equivalentes de ácido gálico por cada 100 gramos masa fresca (mg EAG 100 g⁻¹ MF).

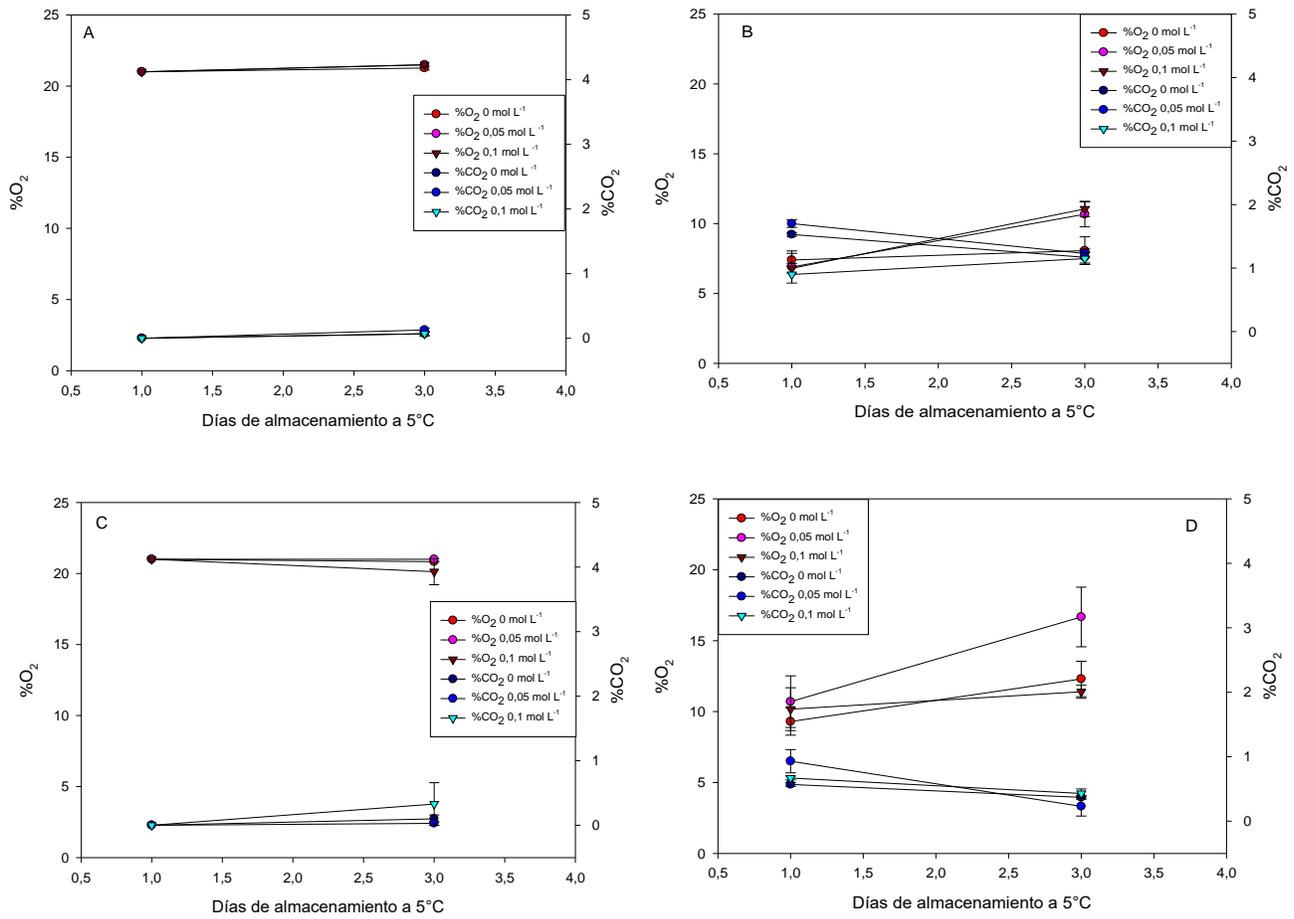


Figura 6.16. Concentración de gases a 5°C dentro de las bolsas de lechugas provenientes de diferentes tratamientos con NaCl.

Las gráficas muestran la concentración de gases (O₂ y CO₂) en % para los tratamientos de aire (A y C) y atmósfera modificada activa, generada por barrido de N₂ (B, D), para lechugas tipo Lollo Bionda cv. 'Levistro' (A, B) y tipo Lollo Rosso cv. 'Carmoli' (C, D), cultivadas con diferentes concentraciones de NaCl (0; 0,05; 0,1 mol L⁻¹), durante 6 días de almacenamiento a 5 °C. Puntos representan valores medios ± EE de 3 réplicas biológicas por repetición (n=9).

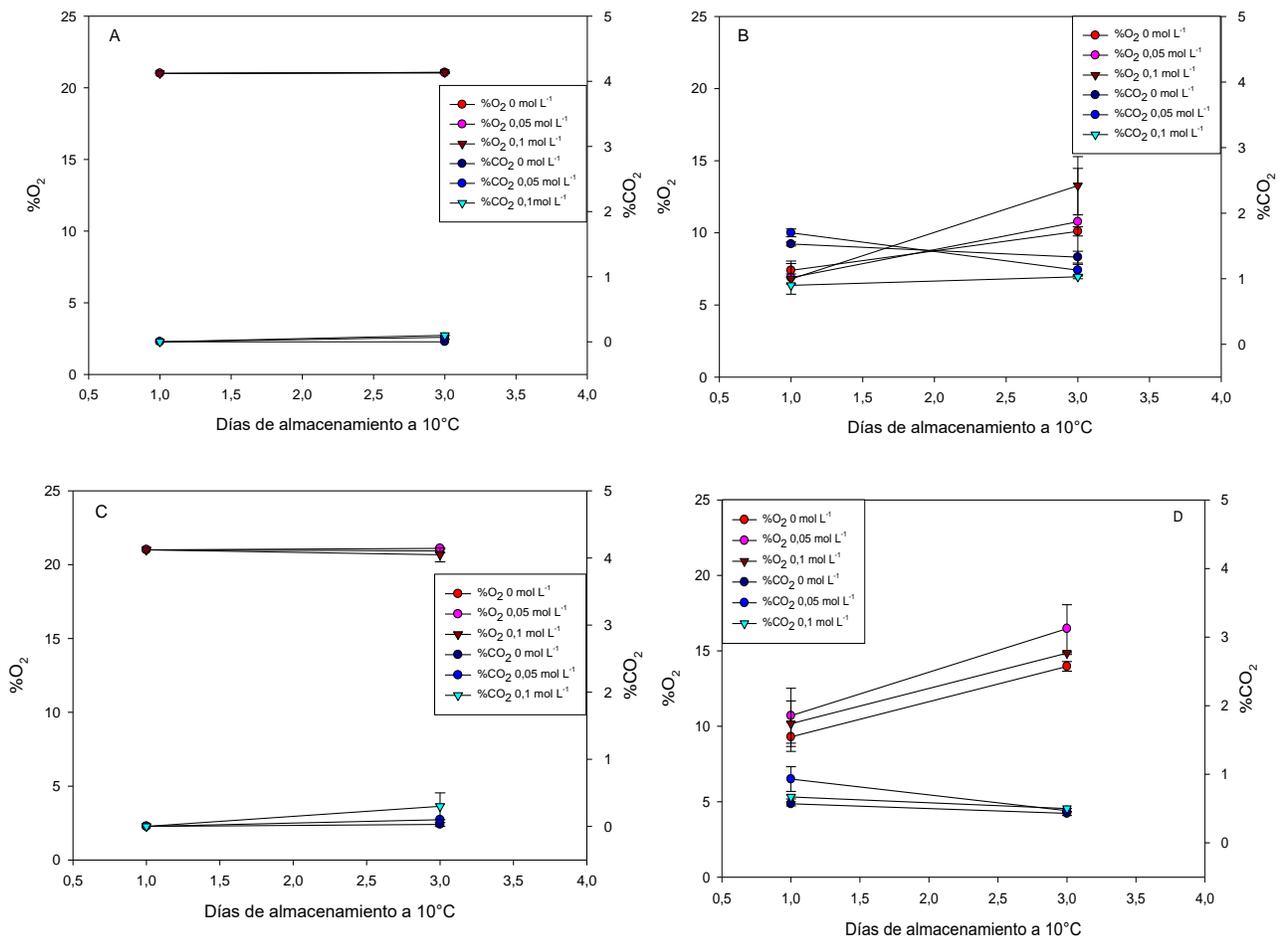


Figura 6.17. Concentración de gases a 10 °C dentro de las bolsas de lechugas provenientes de diferentes tratamientos con NaCl.

Concentración de gases O₂ y CO₂ en % para los tratamientos de aire (A y C) y atmósfera modificada activa, generada por barrido de N₂ (B, D), para lechugas tipo Lollo Bionda cv. 'Levistro' (A, B) y tipo Lollo Rosso cv. 'Carmolí' (C, D) cultivadas con diferentes concentraciones de NaCl (0; 0,05; 0,1 mol L⁻¹) durante 6 días de almacenamiento a 10 °C. Puntos representan valores medios ± EE de 3 réplicas biológicas por repetición (n=9).

6.4.2.5.3.- Determinación de la concentración de flavonoides totales

La concentración de flavonoides totales se midió de acuerdo al método propuesto por Tharasena y Lawan (2014) como se detalla en la sección 5.2.2.5.3. Los resultados fueron expresados como miligramos equivalentes de rutina (eq Rut) en 100 gramos de masa fresca ($\text{mg eq Rut } 100 \text{ g}^{-1} \text{ MF}$).

6.4.2.5.4.- Determinación de la concentración de antocianinas totales

La concentración de antocianinas totales se determinó utilizando el método de pH diferencial siguiendo las recomendaciones de Du *et al.* (2014), como se detalla en la sección 5.2.2.5.4. Los resultados fueron expresados como miligramos equivalentes de cianidina-3-glucósido (eq Cian3gluc) en 100 gramos de masa fresca ($\text{mg eq Cian3gluc } 100 \text{ g}^{-1} \text{ MF}$).

6.4.2.5.5.- Determinación de la capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante (CA) de las diferentes muestras se llevó a cabo mediante dos métodos, descritos en la sección 4.4.3.

6.4.2.5.5.1.- Método de FRAP

El método de FRAP (Ferric reducing antioxidant power) fue realizado de acuerdo con la metodología descrita por Benzie y Strain (1996). Detallado en la sección 4.4.3.1. Los resultados fueron expresados en miligramos equivalentes de Trolox (eq Trolox) por cada 100 gramos de materia fresca ($\text{mg eq Trolox } 100 \text{ g}^{-1} \text{ MF}$).

6.4.2.5.5.2.- Método de DPPH

El método de DPPH fue realizado según la metodología descrita en Gupta y Prakash (2009) como se detalla en la sección 4.4.3.2. Los resultados fueron expresados como miligramos equivalentes de Trolox (eq Trolox) por cada 100 gramos de materia fresca ($\text{mg eq Trolox } 100 \text{ g}^{-1} \text{ MF}$).

6.4.2.6.- Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando el software InfoStat versión 2017 (Di Rienzo *et al.*, 2017) como se describe en la sección 4.4.4.

6.4.3.- Resultados y discusión

6.4.3.1.- Concentración de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante de lechugas a cosecha y luego de tres días de almacenamiento postcosecha

La concentración de fenoles totales presentó un incremento en el tercer día de almacenamiento con respecto al día de la cosecha. Para el cultivar 'Levistro' se obtuvieron valores entre 1166,3 y 1347,1 $\text{mg EAG} \cdot 100 \text{ g}^{-1} \text{ MF}$ el día de la cosecha (Tabla 6.14) y entre 1642,1 y 1818,1 $\text{mg EAG} \cdot 100 \text{ g}^{-1} \text{ MF}$ el tercer día de almacenamiento (Tabla 6.14). Lo cual representa un incremento entre un 34,9 y un 40,8 % a diferencia de lo reportado por Luna *et al.* (2012), quienes después de un período de almacenamiento de 2 días en aire a 7° C, observaron un aumento de cuatro veces en la concentración de fenoles totales en lechuga mínimamente procesada. Por otro lado, para el cultivar 'Carmolí', se registró una disminución en la concentración de fenoles totales entre la cosecha y el tercer día de almacenamiento en frío, registrando valores entre 2075,9 y 2474,5 $\text{mg EAG } 100 \text{ g}^{-1} \text{ MF}$ el día de la cosecha (Tabla 6.14) y entre 1412,9 y 1550,3 $\text{mg EAG } 100 \text{ g}^{-1} \text{ MF}$ al tercer

día de almacenamiento (Tabla 6.14). Diferencia que representa una disminución de entre 31,9 y 37,3 %. Contrario a lo reportado por Martínez-Sánchez *et al.* (2012), quienes registraron un aumento en la concentración de fenoles totales en lechuga de hoja verde, hoja roja y Lollo Rosso (Z-Seeds S.L., Almería, España) luego de 7 días de almacenamiento.

En cuanto a la concentración de flavonoides totales, el día de la cosecha para el cultivar 'Levistro' se registró una concentración de flavonoides totales de entre 278,0 y 403,8 mg eq rut 100 g⁻¹ MF mientras que el cultivar 'Carmolí' obtuvo una concentración entre 609,5 y 840,2 mg eq rut 100 g⁻¹ MF (Tabla 6.14). Al tercer día de almacenamiento, los valores registrados para el cultivar 'Levistro' fueron entre un 26,3 y 40,1% menores, alcanzando valores entre 166,5 y 297,5 mg eq rut 100 g⁻¹ MF. Por su parte que para el cv. 'Carmolí' se observaron concentraciones entre 32,0 y 45,7% menores al tercer día de almacenamiento, registrando entre 414,2 y 455,9 eq rut 100 g⁻¹ MF (Tabla 6.15). Finalmente, al comparar la capacidad antioxidante (CA) medida por FRAP, para el cultivar 'Levistro' se registraron valores de 445,2 y 455,3 mg eq trolox* 100 g⁻¹ MF el día de la cosecha (Tabla 6.14) y valores entre 23,7 y 50,6% mayores, alcanzando valores entre 550,7 y 685,7 mg eq trolox* 100 g⁻¹ MF al tercer día de almacenamiento (Tabla 6.15). Este incremento en la CA parece estar relacionado con el incremento en la concentración de flavonoides totales registrado para este cultivar. Lo anterior confirma los resultados reportados por Lafarga *et al.* (2020), quienes encontraron que el procesamiento mínimo seguido de un período de almacenamiento de 7 días, resultaba en un aumento en los valores de FRAP y DPPH en diferentes variedades de lechuga. Sin embargo, estos autores informaron valores de FRAP entre 1,64 ± 0,17 y 10,13 ± 0,24 mg eq ácido ascórbico 100 g⁻¹ MF, valores menores que los registrados en este estudio para 'Levistro' (Tablas 6.12 y 6.13).

Un comportamiento distinto se observó para el cultivar 'Carmolí', donde se registraron valores entre 764,7 y 852,3 mg eq trolox 100 g⁻¹ MF el día de la cosecha (Tabla 6.14) y de 784,3 y 796,0 mg eq trolox 100 g⁻¹ MF para el tercer día de almacenamiento (Tabla 6.15). Esta diferencia en el comportamiento de la actividad antioxidante por diferentes variedades de lechugas ratifica los resultados obtenidos por Lafarga *et al.* (2020), donde mencionan que la actividad antioxidante durante el almacenamiento, no es la misma para las diez variedades estudiadas. Esta diferencia podría deberse a la bioactividad de los diferentes polifenoles acumulados en cada variedad de lechuga luego del mínimo proceso.

Por su parte, el día de la cosecha la CA medida por DPPH registró valores entre 976,4 y 1.041,0 mg eq trolox* 100 g⁻¹ MF para el cultivar 'Levistro' (Tabla 6.14) y una disminución de entre 56,3 y 61,6 %, hasta llegar a valores entre 375,0 y 454,6 mg eq trolox* 100 g⁻¹ MF al tercer día de almacenamiento (Tabla 6.15). Finalmente, durante la cosecha, para el cultivar 'Carmolí' se registraron valores entre 1.169,8 y 1.297,8 mg eq trolox* 100 g⁻¹ MF (Tabla 6.14) y se redujo a valores entre 409,3 y 433,2 mg eq trolox* 100 g⁻¹ MF al tercer día de almacenamiento (Tabla 6.15), lo cual representa una disminución entre el 65,0 y 66,6 %. A diferencia de lo reportado por Lafarga *et al.* (2020), que señalan un incremento en la capacidad antioxidante, medida por DPPH luego del almacenamiento, en este estudio se observó una reducción en la CA producto del almacenamiento. Sin embargo, los valores de DPPH fueron superiores a los reportados por Lafarga *et al.* (2020) de entre 3,00 ± 0,25 y 14,07 ± 0,25 mg eq ácido ascórbico 100 g⁻¹.

Tabla 6.14. Concentración a cosecha de fenoles, flavonoides, antocianinas totales y capacidad antioxidante (FRAP y DPPH) de lechugas Lollo Bionda ‘Levistro’ y Lollo Rosso ‘Carmolí’ cultivadas bajo diferentes concentraciones de NaCl.

| Tratamiento NaCl (mol L ⁻¹) | Fenoles totales | | Flavonoides totales | | | | Antocianinas totales | | | | Capacidad antioxidante | | | | | | | | |
|---|-------------------------------|------|-------------------------------|------|----------------------------------|------|----------------------------------|------|--|-----|-------------------------------------|------|---------------------|------|-------------------------------------|------|---------------------|------|-------|
| | ‘Levistro’ | | ‘Carmolí’ | | ‘Levistro’ | | ‘Carmolí’ | | ‘Carmolí’ | | FRAP | | | | DPPH | | | | |
| | mg EAG 100 g ⁻¹ MF | | mg EAG 100 g ⁻¹ MF | | mg eq rut 100 g ⁻¹ MF | | mg eq rut 100 g ⁻¹ MF | | mg eq cian3gluc 100 g ⁻¹ MF | | mg eq Trolox 100 g ⁻¹ MF | | | | mg eq Trolox 100 g ⁻¹ MF | | | | |
| | Media | EE | Media | EE | Media | EE | Media | EE | Media | EE | Media | EE | Media | EE | Media | EE | Media | EE | Media |
| 0 | 1166,3 | 28,7 | 2322,4 ^a | 83,2 | 384,2 | 49,8 | 724,2 ^{ab} | 19,8 | 24,3 | 0,8 | 445,2 | 13,5 | 796,5 ^{ab} | 23,9 | 976,4 | 17,0 | 1192,8 ^b | 17,2 | |
| 0,05 | 1168,6 | 57,9 | 2075,9 ^b | 60,2 | 403,8 | 48,6 | 609,5 ^b | 65,1 | 23,8 | 1,2 | 455,3 | 12,6 | 764,7 ^b | 22,3 | 990,7 | 8,9 | 1297,8 ^a | 1,3 | |
| 0,1 | 1347,1 | 39,8 | 2474,5 ^a | 41,7 | 278,0 | 37,6 | 840,2 ^a | 54,5 | 25,5 | 1,7 | 446,6 | 13,4 | 852,3 ^a | 25,5 | 1041,0 | 19,1 | 1169,8 ^b | 27,0 | |
| valor <i>p</i> | ns | | * | | ns | | * | | ns | | ns | | * | | ns | | ** | | |

En la tabla se muestra el efecto de la salinidad (NaCl) (mol L⁻¹) sobre la concentración de fenoles totales (mg EAG 100 g⁻¹ MF), flavonoides (mg eq rut 100 g⁻¹ MF), antocianinas (mg eq cian3gluc 100 g⁻¹ MF) y capacidad antioxidante medida por los métodos de FRAP (mg eq Trolox 100 g⁻¹ MF) y DPPH (mg eq Trolox 100 g⁻¹ MF) para lechugas Lollo Bionda cv. ‘Levistro’ y Lollo Rosso cv. ‘Carmolí’ a cosecha. Valores representan medias y error estándar (EE) de 9 datos para cada concentración de NaCl. EAG: equivalentes de ácido gálico; eq rut: equivalentes de rutina; eq cian3gluc equivalentes de cianidina 3-glicósido; eq Trolox: equivalentes de Trolox; MF: Masa fresca. ^{a,b} Letras diferentes corresponden a diferencias significativas determinadas por la prueba de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher con un nivel de significancia de *p* < 0,05. ns: no significativo; *: < 0,05; **: <0,01.

Tabla 6.15. Concentración de fenoles, flavonoides, antocianinas totales y capacidad antioxidante (FRAP y DPPH) lechuga Lollo Bionda ‘Levistro’ y Lollo Rosso ‘Carmolí’ cultivadas bajo diferentes concentraciones de NaCl luego de 3 días de almacenamiento bajo diferentes temperaturas y atmósferas.

| Factor | Nivel | Fenoles totales | | Flavonoides totales | | | | Antocianinas totales | | | | Capacidad Antioxidante | | | | | | | |
|----------------------|--------------------------|-------------------------------|-------|----------------------------------|-------|--------------------|------|--|------|-------------------|-----|-------------------------------------|-------|---------------------|-------|-------------------------------------|------|--------------------|------|
| | | ‘Levistro’ | | ‘Carmolí’ | | ‘Levistro’ | | ‘Carmolí’ | | ‘Carmolí’ | | FRAP | | | | DPPH | | | |
| | | Media | EE | Media | EE | Media | EE | Media | EE | Media | EE | Media | EE | Media | EE | Media | EE | Media | EE |
| | | mg EAG 100 g ⁻¹ MF | | mg eq rut 100 g ⁻¹ MF | | | | mg eq cian3gluc 100 g ⁻¹ MF | | | | mg eq Trolox 100 g ⁻¹ MF | | | | mg eq Trolox 100 g ⁻¹ MF | | | |
| T° (1) | 5 | 996,7 ^b | 37,3 | 1851,5 ^a | 76,3 | 305,7 ^a | 28,2 | 213,9 ^b | 20,6 | 7,8 ^b | 0,6 | 587,1 | 78,6 | 490,5 ^b | 28,8 | 307,9 ^b | 12,5 | 467,4 ^a | 14,2 |
| | 10 | 2438,7 ^a | 288,3 | 1128,8 ^b | 117,0 | 123,6 ^b | 27,1 | 650,1 ^a | 21,5 | 28,3 ^a | 0,6 | 638,3 | 89,0 | 1087,4 ^a | 22,1 | 525,2 ^a | 75,6 | 375,8 ^b | 11,5 |
| Atm (2) | Aire | 1314,8 ^b | 93,1 | 1744,0 ^a | 100,9 | 257,8 ^a | 39,2 | 411,1 | 60,2 | 17,6 | 2,6 | 506,1 | 70,0 | 780,4 | 79,1 | 315,9 ^b | 54,7 | 424,2 | 19,8 |
| | AM | 2120,6 ^a | 343,4 | 1236,3 ^b | 130,8 | 171,5 ^b | 27,4 | 453 | 53,0 | 18,4 | 2,5 | 719,2 | 89,0 | 797,6 | 74,4 | 517,1 ^a | 76,8 | 419,0 | 13,8 |
| Tratamiento NaCl (3) | 0 mol L ⁻¹ | 1818,1 | 346,7 | 1412,9 | 199,6 | 166,5 ^b | 48,1 | 420,6 | 71,8 | 19,6 ^a | 3,0 | 685,7 | 77,7 | 796,0 | 98,9 | 454,6 | 76,1 | 422,3 | 28,4 |
| | 0,05 mol L ⁻¹ | 1692,9 | 366,4 | 1507,2 | 157,8 | 297,5 ^a | 38,2 | 414,2 | 65,9 | 17,3 ^b | 3,3 | 550,7 | 133,9 | 784,3 | 102,1 | 419,8 | 65,7 | 433,2 | 18,1 |
| | 0,1 mol L ⁻¹ | 1642,1 | 285,9 | 1550,3 | 123,2 | 179,9 ^b | 33 | 455,9 | 73,8 | 17,2 ^b | 3,1 | 601,6 | 89,6 | 786,6 | 84,5 | 375,2 | 59,6 | 409,3 | 3,65 |
| | valor p (1) | *** | | *** | | *** | | *** | | *** | | ns | | *** | | ** | | *** | |
| | valor p (2) | ** | | *** | | *** | | ns | | ns | | ns | | ns | | ** | | ns | |
| | valor p (3) | ns | | ns | | *** | | ns | | * | | ns | | ns | | ns | | ns | |
| | valor p (1 x 2) | * | | ns | | * | | ns | | ns | | ns | | ns | | ** | | ns | |
| | valor p (1 x 3) | ns | | * | | ns | | ns | | ns | | ns | | ns | | ns | | ns | |

En la tabla se muestra el efecto de diferentes condiciones de almacenamiento: temperatura (5 y 10 °C); atmósfera (Aire, Atmósfera modificada (AM)) al tercer día de almacenamiento, sobre la concentración de fenoles totales (mg EAG 100 g⁻¹ MF), flavonoides (mg eq rut 100 g⁻¹ MF), antocianinas (mg eq cian3gluc 100 g⁻¹ MF) y capacidad antioxidante medida por los métodos de FRAP (mg eq Trolox 100 g⁻¹ MF) y DPPH (mg eq Trolox 100 g⁻¹ MF) para lechugas Lollo Bionda cv. ‘Levistro’ y Lollo Rosso cv. ‘Carmolí’ cultivadas con diferentes concentraciones de salinidad (NaCl) (mol L⁻¹). Evaluación realizada al tercer día de almacenamiento (Periodo de comercialización). Valores representan medias y error estándar (EE) de 3 datos para la interacción (1 x 2 x 3). EAG: equivalentes de ácido gálico; eq rut: equivalentes de rutina; eq cian3gluc equivalentes de cianidina 3-glicósido; eq Trolox: equivalentes de Trolox; MF: Masa fresca. ^{a,b} Letras diferentes corresponden a diferencias significativas determinadas por la prueba de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher con un nivel de significancia de $p < 0,05$. ns: no significativo; *: < 0,05; **: < 0,01; *** < 0,001. No existe interacción 2x3 ni interacción triple (1x2x3) para ninguno de los factores estudiados.

6.4.3.2.- Efecto de la temperatura y atmosfera de almacenamiento en la concentración de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante de lechugas luego de tres días de almacenamiento postcosecha

En cuanto a las diferentes condiciones de almacenamiento, la temperatura presentó un efecto significativo en la concentración de fenoles, flavonoides totales y CA por DPPH para ambos cultivares. También se presentó un efecto significativo en la concentración de antocianinas totales y CA por FRAP para el cultivar 'Carmolí', producto de la temperatura. El almacenamiento a 10°C, con respecto a 5°C, resultó en un incremento del 145 % en la concentración de fenoles totales para el cultivar 'Levistro', registrando 2.438,7 y 996,6 mg EAG 100 g⁻¹ MF, respectivamente (Tabla 6.15). Adicionalmente, se observó un incremento del 204 % en la concentración de flavonoides para el cultivar 'Carmolí', registrando valores de 213,9 mg eq rut 100 g⁻¹ MF a 5 °C y de 650,1 mg eq rut 100 g⁻¹ MF a 10 °C (Tabla 6.15) y un incremento del 263 % en la concentración de antocianinas en el mismo cultivar, con valores de 7,8 mg eq cian3gluc 100 g⁻¹ MF a 5 °C y 28,3 mg eq cian3gluc 100 g⁻¹ MF a 10 °C (Tabla 6.15). Por otra parte, luego de 3 días de almacenamiento en el cultivar 'Carmolí', la concentración de fenoles totales, disminuyó en 722,7 mg EAG* 100 g⁻¹ MF al subir la temperatura de almacenamiento de 5 a 10 °C, lo cual representa una disminución del 39 % (Tabla 6.15). Por otro lado, al comparar una temperatura de almacenamiento de 5 °C con una de 10 °C, la concentración de flavonoides en el cultivar 'Levistro' disminuyó en 182,1 mg eq rut 100 g⁻¹ MF, lo cual representa una disminución del 60 % (Tabla 6.15).

En cuanto al uso de una atmósfera modificada activa, generada al almacenar las lechugas en una bolsa sellada, las lechugas del cultivar 'Levistro' presentaron un incremento del 62 % en la concentración de fenoles totales con respecto a las almacenadas en aire. En este sentido, se obtuvo una concentración de fenoles totales de 1.314,8 mg EAG 100 g⁻¹ MF, cuando las plantas fueron almacenadas en aire y a una concentración de 2.120,6 mg EAG 100 g⁻¹ MF cuando fueron almacenadas en atmosfera modificada (Tabla 6.15). Un efecto opuesto se obtuvo para el cultivar 'Carmolí', donde el almacenamiento con aire presentó un incremento del 40 % en la concentración de fenoles totales en comparación con las almacenadas en atmósfera modificada. Finalmente, el uso de atmósfera modificada activa fue capaz de proteger la CA medida por DPPH para el cultivar 'Levistro', presentando un incremento del 61 % en comparación con las registradas para aire. Por su parte, el uso de una atmósfera modificada, no afectó la CA medida por FRAP o DPPH del cultivar 'Carmolí' (Tabla 6.15).

De manera similar a lo reportado por Lafarga *et al.*, (2020), la concentración de compuestos fenólicos varió significativamente entre las variedades de lechuga evaluadas. Sin embargo, a diferencia de lo reportado por estos autores, quienes mostraron un incremento en la concentración de compuestos fenólicos, luego del mínimo proceso y un periodo de almacenamiento de 7 días, en este ensayo el mínimo procesamiento y almacenamiento por un periodo de 3 días, condujo a una reducción del contenido fenólico en las lechugas.

6.4.4.- Conclusiones

De acuerdo con los resultados obtenidos, 'Levistro' y 'Carmolí' presentaron diferentes respuestas en la concentración de fenoles y flavonoides durante el almacenamiento. El cultivar 'Levistro' presentó un incremento en la concentración de fenoles y flavonoides totales, mientras que 'Carmolí' disminuyó su concentración.

La temperatura de almacenamiento tuvo un efecto significativo en la concentración de compuestos bioactivos en ambos cultivares al tercer día de almacenamiento. Sin embargo, su efecto dependió del tipo de compuesto y variedad de lechuga estudiado.

El uso de una atmósfera modificada activa, tuvo efectos opuestos en los cultivares 'Levistro' y 'Carmolí'. Para el cultivar 'Levistro', se observó un aumento significativo en la concentración de fenoles totales y una mayor capacidad antioxidante medida por DPPH. Mientras que el 'Carmolí', presentó un incremento en la concentración de fenoles totales cuando se almacenó en aire.

Estos resultados destacan la importancia de considerar las condiciones de almacenamiento específicas para cada tipo y cultivar de lechuga con el fin de preservar los compuestos bioactivos y asegurar su llegada al consumidor.

6.4.5.- Bibliografía

Ainsworth, E.A., and Gillespie, K. M., 2007. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent. *Nat. Protoc.* 2, 875– 877. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.102>

Benzie, I.F. and Strain, J.J., 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of ‘antioxidant power’: The FRAP assay. *Anal. Biochem.* 239, 70–76. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>

Blackhall, M., Berry, R., Davies, N., Walls, J. 2018. Optimized extraction of anthocyanins from Reid Fruits’ *Prunus avium* ‘Lapins’ cherries. *Food chem.* 256, 280–285. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.02.137>

Di Rienzo, J.A., Casanoves, F., Balzarini, M.G., Gonzalez, L., Tablada, M., and Robledo, C.W. InfoStat versión., 2017. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. Available at <http://www.infostat.com.ar>

De Corato, U. 2019. Improving the shelf-life and quality of fresh and minimally-processed fruits and vegetables for a modern food industry: A comprehensive critical review from the traditional technologies into the most promising advancements. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 60, 940–975. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1553025>

Du, W.X., Avena-Bustillos, R., Breksa, A., McHugh, T., 2014. UV-B light as a factor affecting total soluble phenolic contents of various whole and fresh-cut specialty crops. *Postharvest Biol. Technol.* 93, 72–82. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2014.02.004>

Galieni, A., Di Mattia, C., De Gregorio, M., Specca, S., Mastrocola, D., Pisante, M., Stagnari, F. 2015. Effects of nutrient deficiency and abiotic environmental stresses on yield, phenolic compounds, and antiradical activity in lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Sci. Hort.* 187, 93–101. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.02.036>

Ghidelli, C., Pérez-Gago. M.B. 2016. Recent advances in modified atmosphere packaging and edible coatings to maintain quality of freshcut fruits and vegetables. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 58: 662–679. <http://dx.doi.org/10.1080/10408398.2016.1211087>

Gupta, S., Prakash, J., 2009. Studies on Indian Green Leafy Vegetables for Their Antioxidant Activity. *Plant Foods Hum. Nutr.* 64, 39–45. <https://doi.org/10.1007/s11130-008-0096-6>

Hawrylak-Nowak, B., Dresler, S., Stasinska-Jakubas, M., Wójciak, M., Sowa, I., Matraszek Gawron, R. 2021. NaCl-Induced Elicitation Alters Physiology and Increases Accumulation of Phenolic Compounds in *Melissa officinalis* L. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 6844. <https://doi.org/10.3390/ijms22136844>.

Kitayama, M.; Tisarum, R.; Theerawitaya, C.; Samphumphung, T.; Takagaki, M.; Kirdmanee, C.; Cha-Um, S. 2019. Regulation on anthocyanins, α -tocopherol and calcium in two water spinach (*Ipomoea aquatica*) cultivars by NaCl salt elicitor. *Sci. Hort.* 249, 390–400. <https://doi.org/10.3390/ijms22136844>.

Lafarga, T., Villaró, S., Rivera, A., Bobo, G., Aguiló-Aguayo, I. 2020. Bioaccessibility of polyphenols and antioxidant capacity of fresh or minimally processed modern or traditional lettuce (*Lactuca sativa* L.) varieties. *J. Food Sci. Technol.* 57, 754–763. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-04108-7>

Luna, M.C., Tudela, J.A., Martínez-Sánchez, A., Allende, A., Marín, A., Gil, M.I. 2012. Long-term deficit and excess of irrigation influences quality and browning related enzymes and phenolic metabolism of fresh-cut iceberg lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Postharvest Biol Technol* 73: 37–45. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2012.05.011>

Martínez-Sánchez, A., Luna, M.C., Selma, M.V., Tudela, J.A., Abad, J., Gil, M.I. 2012. Baby-leaf and multi-leaf of green and red lettuces are suitable raw materials for the fresh-cut industry. *Postharvest Biol Technol* 63: 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2011.07.010>

Meitha, K., Pramesti, Y., Suhandono, S. 2020. Reactive Oxygen Species and Antioxidants in Postharvest Vegetables and Fruits. *Int. J. Food Sci.* 2020, 8817778. <https://doi.org/10.1155/2020/8817778>

Romani, A., Pinelli, P., Galardi, C., Sani, G., Cimato, A., and Heimler, D. 2002. Polyphenols in greenhouse and open-air-grown lettuce. *Food Chem.* 79, 337-342. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00170-X](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00170-X)

Rouphael, Y.; Petropoulos, S.A.; Cardarelli, M.; Colla, G. 2018. Salinity as eustressor for enhancing quality of vegetables. *Sci. Hortic.* 234, 361–369. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.02.048>

Saini, R.K., Shang, X.M., Ko, E. Y., Choi, J.H., Keum, Y.S. 2016. Stability of carotenoids and tocopherols in ready-to-eat baby-leaf lettuce and salad rocket during low-temperature storage. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 67, 489-495. <http://dx.doi.org/10.3109/09637486.2016.1172059>

Tharasena, B., Lawan, S., 2014. Phenolics, flavonoids and antioxidant activity of vegetables as Thai side dish. *APCBEEProcedia* 8, 99–104. <https://doi.org/10.1016/j.apcbee.2014.03.008>

7.- Conclusiones generales

En relación al objetivo de evaluar la evolución de la síntesis de compuestos fenólicos mediante cosechas sucesivas en lechugas tipo Lollo Bionda y Lollo Rosso sometidas a diferentes niveles y tipos de estímulos/estreses abióticos, los resultados revelan respuestas diferenciadas entre los cultivares 'Levistro' y 'Carmolí'. Ante la suplementación con radiación UV-B no se observaron reducciones significativas en el rendimiento de las lechugas. Por otro lado, la concentración de flavonoides y antocianinas totales aumentó significativamente en las lechugas 'Carmolí' en presencia de radiación UV-B. Adicionalmente, al evaluar la presencia de NaCl en la solución nutritiva de lechugas, se observó una reducción significativa en la masa fresca y un aumento en la masa seca, así como también se evidenció un aumento en la concentración de compuestos antioxidantes en ambos cultivares, sugiriendo una respuesta adaptativa al estrés salino. Para el estrés salino, la mayor concentración inicial de antioxidantes en las lechugas rojas, como 'Carmolí', proporcionó protección contra el estrés abiótico causado por la presencia de NaCl y los cortes durante las cosechas sucesivas, mientras que el cultivar 'Levistro', con menor concentración de compuestos antioxidantes recurrió a estrategias como el incremento en la síntesis y acumulación de prolina. En conjunto, estos resultados indican la complejidad de las respuestas de los diferentes cultivares ante distintos estímulos abióticos, lo que denota la necesidad de considerar estrategias de cultivo específicas para cada variedad. Por otro lado, los resultados presentados develaron que el corte realizado por cosechas sucesivas generó un incremento en la concentración de compuestos fenólicos y actividad antioxidante de ambos cultivares, evidenciando que el manejo cultural de las plantas es determinante para obtener lechugas con una alta concentración de compuestos fenólicos.

Con respecto al objetivo de evaluar el rendimiento y calidad funcional de lechugas tipo Lollo Bionda y Lollo Rosso cultivadas bajo diferentes niveles y tipos de estímulos/estreses abióticos, e identificar y determinar la concentración de compuestos fenólicos mediante cromatografía líquida, los resultados revelan que ambos cultivares de lechugas ('Levistro' y 'Carmolí') presentan los mismos compuestos de tipo ácidos fenólicos y flavonoides, sin embargo es importante destacar que la concentración de cada uno de ellos es mayor en el cultivar 'Carmolí', que en 'Levistro' lo cual se correlaciona con la mayor concentración de fenoles y flavonoides totales y con la mayor capacidad antioxidante, registrada en este cultivar de lechugas rojas. Por otro lado, la única diferencia observada entre los cromatogramas de los diferentes cultivares correspondió al peak de antocianinas, compuestos que dan su color característico a las lechugas rojas. En relación a los diferentes tipos de estrés, la suplementación con radiación UV-B generó cambios significativos en la concentración de fenoles y flavonoides totales en ambos cultivares. La dosis de $10,5 \text{ kJ m}^{-2}$ mostró la mayor concentración de estos compuestos, mientras que dosis más elevadas condujeron a una disminución, sugiriendo una posible degradación como mecanismo defensivo contra el exceso de radiación UV-B. Cabe destacar que, en otoño, temporada donde se cultivaron las plantas para responder a este objetivo, las dosis de radiación utilizada generaron daños a nivel foliar, a diferencia de lo observado en primavera donde estos daños no se produjeron. Lo anterior sugiere que lo determinante no es la dosis de radiación UV-B por sí sola, sino que la respuesta a la luz, depende de la interacción con otras longitudes de onda, como las correspondientes a la radiación PAR (400-700

nm). Por otro lado, al considerar la aplicación de NaCl durante el cultivo, tanto en el cultivar 'Levistro' como 'Carmolí' se observó un aumento significativo en la concentración de compuestos fenólicos totales y en la capacidad antioxidante a medida que incrementaba la concentración de NaCl en la solución nutritiva. Cabe destacar que ambos cultivares exhibieron un incremento significativo en la concentración del ácido 5-cafeoilquinico, el cual podría ser utilizado como un indicador de la exposición al estrés por NaCl. La información obtenida mediante la cromatografía líquida proporciona una mayor comprensión de cómo los compuestos químicos en las lechugas responden a los diferentes estímulos y estreses. En conjunto, estos resultados subrayan la diversidad de respuestas de los cultivares ante diferentes estímulos abióticos y destacan la importancia de considerar las características específicas de cada cultivar al implementar prácticas de cultivo para maximizar su calidad funcional.

En relación al objetivo de evaluar el comportamiento, de la concentración de compuestos fenólicos durante el almacenamiento, mediante el uso de estrategias de postcosecha que involucran bajas temperaturas en combinación con una concentración de gases con bajo O₂ y moderado CO₂ en lechugas tipo Lollo Bionda y Lollo Rosso, los resultados proporcionan una visión detallada de las respuestas a estas estrategias postcosecha. En primer lugar, se observa que las concentraciones de fenoles y flavonoides totales alcanzaron sus valores más bajos al momento de la cosecha. Sin embargo, estos valores aumentaron significativamente durante el almacenamiento. Los valores más altos de concentración de fenoles totales se alcanzaron al tercer día de almacenamiento en plantas tratadas con cualquiera de las dosis de radiación UV-B utilizadas. Por otro lado, la aplicación de bajas temperaturas (5 °C) como estrategia postcosecha mostró un efecto significativo en la conservación de la concentración de flavonoides totales y en la capacidad antioxidante, en el cultivar 'Carmolí'. Sin embargo, el cultivar 'Levistro' exhibió un comportamiento opuesto, obteniendo menores valores de concentración a bajas temperaturas. Asimismo, la utilización de atmósfera modificada tuvo un impacto significativo en la concentración de flavonoides totales y la capacidad antioxidante para el cultivar 'Levistro'. Estos resultados destacan la dependencia de los efectos de las bajas temperaturas y las estrategias de atmósfera modificada en función de la variedad de lechuga estudiada. Lo anterior sugiere que las estrategias postcosecha, como bajas temperaturas y atmósfera modificada, pueden influir de manera significativa en la conservación y acumulación de compuestos fenólicos durante el almacenamiento de lechugas, siempre y cuando se considere la variabilidad en la respuesta entre cultivares para implementar estrategias que preserven la calidad funcional de las lechugas.

8.- Agradecimientos

Deseo expresar mi agradecimiento a la Agencia Nacional de Investigación y Desarrollo de Chile (ANID) por concederme la beca de doctorado Número 21150786. Esta beca fue crucial para mi formación académica y para dedicarme de manera integral a este proyecto doctoral.

Asimismo, agradezco al Fondo para la Innovación y la Competitividad (FIC) del gobierno regional de la región de O'Higgins por el respaldo financiero al proyecto titulado "Incremento del valor funcional y la calidad organoléptica de las hortalizas de hoja producidas en la región de O'Higgins mediante la aplicación controlada de estreses ambientales en sistemas de producción forzada y procesamiento mínimo" (IDI Número: 30474703-0), el cual permitió financiar los insumos para el desarrollo de esta tesis doctoral.

Agradezco igualmente al proyecto "Cooperación bilateral México-Chile, Formación de Redes Internacionales 130024" por su apoyo financiero a través de la Agencia nacional de investigación y desarrollo (ANID). Este respaldo me permitió realizar una estancia de investigación en el laboratorio del Dr. Edmundo Mercado de la Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro, México con la cual pude fortalecer mi formación profesional y generar vínculos con investigadores dedicados a la postcosecha de hortalizas.

Agradezco también a la beca de movilidad Erasmus+ entre países asociados y El Campus de Excelencia Internacional Agroalimentario (ceiA3) en el marco del proyecto KA107. Por permitirme realizar una pasantía de investigación en el laboratorio del Dr. Miguel Urrestarazu de la Universidad de Almería, Almería, España. Lugar donde pude compartir con investigadores de destacada trayectoria internacional en el ámbito de los cultivos forzados bajo invernadero y la hidroponía. Pasantía con la cual pude complementar mi investigación doctoral y enriquecer mi formación profesional.

Asimismo, agradezco al proyecto "Novel application of LED lighting in growing system for leaf horticultural products" (Proyecto Redes internacionales Número: 190057) también financiado a través de ANID. Este proyecto me permitió profundizar mi conocimiento en tecnologías de producción en condiciones indoor e iluminación LED e incorporarme al grupo de trabajo liderado por el Dr. Vicente Martínez y compartir con investigadores del Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS) del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), ubicado en Murcia, España.

Finalmente agradecer a la Dra. María Asunción Amorós por su colaboración e instrucción en la escritura de los artículos científicos y en especial a mi profesor tutor el Dr. Víctor Escalona por todas las oportunidades brindadas durante este proceso y permitirme desarrollar esta tesis doctoral. Agradezco a todo el equipo del Centro de Estudios Postcosecha (CEPOC) de la Universidad de Chile y a todos a quienes creyeron en mí, me brindaron su apoyo incondicional e hicieron posible sobreponerme a las dificultades para llevar a término este proyecto, ¡muchas gracias!

Mónica Flores R.