

Rápida respuesta de compuestos bioactivos de brócoli ante tratamientos de radiación UV-B

Darré M.¹, Ortiz L. C.¹, Valerga L.¹, Chaves A.¹, Vicente A.^{1,2}, Lemoine M. L.^{1,2}, Concellón A.¹

¹CIDCA-Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecología de Alimentos. Facultad Cs. Exactas-UNLP. CCT La Plata-CONICET. Calle 47 y 116 S/N, La Plata, Argentina.

²LIPA-Laboratorio de Investigación en Productos Agroindustriales, Fac. Cs Agrarias y Forestales-UNLP. Calle 60 y 119 S/N, La Plata, Argentina.

Dirección de e-mail: magalidarre_87@hotmail.com

RESUMEN

Los consumidores se concientizaron de la importancia del consumo de brócoli por su contenido de compuestos beneficiosos para la salud. La radiación UV-B puede emplearse para lograr la acumulación de estos compuestos. El objetivo fue evaluar el efecto de la aplicación de distintas dosis e intensidades de radiación UV-B, sobre los compuestos bioactivos de brócoli mínimamente procesado a tiempos cortos post-tratamiento. Las inflorescencias se irradiaron empleando dosis de 2 y 12 kJ/m² a intensidades baja (3,2 W/m²) y alta (5,0 W/m²). Los controles no fueron irradiados. Se determinó el color, la capacidad antioxidante, contenido de fenoles totales y glucosinolatos a 0, 2, 6 y 18 h post-tratamiento. Los brócolis tratados con UV-B mantuvieron el color y no mostraron variación para Hue, L* y b*. Se observó una disminución inicial de los compuestos fenólicos y capacidad antioxidante para luego aumentar hasta alcanzar el máximo valor a las 6 h. Los tratados con 2 kJ/m² y la mayor intensidad acumularon un 30% más de antioxidantes que los controles. Los glucosinolatos alifáticos presentaron mayor respuesta a la exposición UV-B. Los resultados muestran que tratamientos de luz UV-B de alta intensidad logran una rápida respuesta aumentando los compuestos bioactivos de brócoli mínimamente procesado.

Palabras clave: *Brassica oleracea* L., capacidad antioxidante, fenoles totales, glucosinolatos, congelado.

ABSTRACT

Consumers became aware of the importance of eating broccoli for its content of compounds beneficial to health. UV-B can be used to achieve the accumulation of these compounds. The objective was to evaluate the effect of the application of different doses and intensities of UV-B radiation on minimally processed broccoli to short post-treatment times on bioactive compounds. The inflorescences were irradiated using doses of 2 and 12 kJ/m² at low (3.2 W/m²) and high (5.0 W/m²) intensities. The controls were not irradiated. Color, antioxidant capacity, total phenolic content and glucosinolates to 0, 2, 6 and 18 h post-treatment was determined. Broccoli treated with UV-B kept the color and showed no variation for Hue, L* and b*. An initial decrease of antioxidant capacity and phenolics and a subsequent recovery was observed reaching a maximum at 6 h. Those treated with 2 kJ / m² and higher intensity accumulated 30% more antioxidants than controls. Aliphatic glucosinolates had a higher response to UV-B exposure. The results show that treatment of UV-B high intensity achieve a quick response by increasing minimally processed broccoli bioactive compounds.

Keywords: *Brassica oleracea* L., antioxidant capacity, phenolic content, glucosinolates, freezing.

INTRODUCCIÓN

En los últimos años, los consumidores se concientizaron de la importancia de consumir vegetales de la familia Brassicaceae ya que estos vegetales poseen alto contenido de vitaminas (C y E) y compuestos bioactivos (carotenoides, flavonoides, glucosinolatos). Se recomienda su consumo en fresco como una fuente para aumentar la ingesta diaria de sustancias promotoras de la salud (Schreiner 2009).

La aplicación de radiación UV es una tecnológica limpia, seca y de bajo costo (Civello et al. 2006). Pueden diferenciarse las radiaciones UV-C (200 a 280 nm), UV-B (280 a 320 nm) y UV-A (320 a 400 nm). Diversos estudios han observado que la exposición a los distintos tipos de luz UV causa respuestas diferentes en frutas y vegetales. La radiación UV-C es la más conocida y se emplea por su gran efecto germicida. Se conoce que la radiación UV-B, en bajos niveles, es un regulador importante del metabolismo secundario de las plantas



produciendo la acumulación entre otros, de compuestos fenólicos, carotenoides y glucosinolatos (Schreiner et al. 2009) por lo que se ha empleado como tecnología emergente en postcosecha de vegetales y frutas, incrementando el contenido de compuestos bioactivos, mejorando la calidad nutracéutica. (Castagna et al. 2014, Eichholz et al. 2011, Avena-Bustillos et al. 2012, Hagen et al. 2007).

No ha sido reportado en brócoli la influencia de la radiación UV-B sobre el comportamiento de los antioxidantes en tiempos cortos post irradiación, trabajos previos mostraron que la radiación UV-B retrasó la degradación de clorofila en inflorescencias tratadas con 8,8 y 13,1 kJ/m² almacenadas a 15°C (Aiamla-or et al. 2010). El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la aplicación de distintas dosis e intensidades de radiación UV-B, sobre los compuestos bioactivos de brócoli mínimamente procesado a tiempos cortos post-tratamiento.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal y almacenamiento

Se trabajó con cabezas de brócoli (*Brassica oleracea* L.) cortadas en ramilletes y colocadas en bandejas de plástico, irradiadas con luz UV-B y luego recubiertas con film PVC perforado, almacenadas a 20°C durante 0, 2, 6, 18 h. Los respectivos controles no fueron irradiados. Se realizaron 4 repeticiones (bandejas) para cada tratamiento en dos cosechas diferentes.

Tratamiento UV-B

Se empleó un banco de lámparas UV-B conteniendo 4 tubos (QFS-40 Philips) con encendido independiente y un estante de altura regulable para las muestras. Se ensayaron intensidades: I) Baja (3,2 W/m², 2 lámparas, 30 cm) con dosis de 2 kJ/m² (**B2**) y 12 kJ/m² (**B12**) y II) Alta (5 W/m², 4 lámparas, 15 cm) con dosis de 2 kJ/m² (**A2**) y 12 kJ/m² (**A12**) que fueron medidas con un radiómetro (UVITEC, RX-003, France), los tiempos de exposición de cada tratamiento se muestran en la **Tabla 1**.

Una vez que se obtuvo la mejor condición para la obtención de la capacidad antioxidante más alta (6 h), las muestras de brócoli se almacenaron en un congelador comercial a -18°C durante 30 días para determinar la estabilidad de los compuestos bioactivos inducidos después del almacenamiento congelado. Pasados los 30 días se evaluó la capacidad antioxidante.

Los tiempos necesarios para alcanzar las distintas dosis se detallan en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Tiempos de exposición de luz UV-B a dosis 2 y 12 kJ/m² e intensidades bajas (3,2 W/m², 2 lámparas, 30 cm) y alta (5 W/m², 4 lámparas, 15 cm) en brócoli mínimamente procesado.

Intensidad (W/m ²)	Tiempos de exposición (min)/Dosis 2 (kJ/m ²)	Tiempos de exposición (min)/Dosis 12 (kJ/m ²)
3,2	11	67
5,0	7	43

Color superficial

Se utilizó un colorímetro (Minolta, modelo CR-400, Japón) obteniendo los valores de a*, b* y L*. Se calculó el ángulo Hue como arco tangente de b*/a*. Se realizaron 20 medidas a cada bandeja para cada tratamiento y tiempo de almacenamiento.

Compuestos fenólicos

Se pesó aproximadamente 1,2 g del triturado y se agregó 10 mL de etanol (96% v/v), se agitó en vortex durante 30 segundos. Luego, se centrifugó a 13.000 x g durante 10 minutos a 4°C y se separó el sobrenadante para realizar los análisis posteriores.

El contenido de compuestos fenólicos totales se determinó de acuerdo a Singleton et al. (1999), empleando el reactivo de Folin-Ciocalteu. Se tomaron 50 µL de reactivo (1:1 v/v en agua) y se agregaron 100 µL de extracto etanólico y 750 µL de agua. Luego de 3 minutos de reacción a temperatura ambiente se añadieron 100 µL de Na₂CO₃ 20% (m/v) en NaOH 0,1 M y 1.000 µL de agua destilada. La mezcla de reacción se agitó en vortex y se incubó durante 90 min a temperatura ambiente. Finalmente se midió la absorbancia a 760 nm en espectrofotómetro (HITACHI U-1900, país). El contenido de compuestos fenólicos se calculó utilizando ácido clorogénico (CGA) como estándar. Se prepararon dos extractos para cada tratamiento y tiempo de almacenamiento, y cada uno se midió por triplicado. Los resultados se expresaron como mg CGA kg⁻¹.



Capacidad Antioxidante contra el radical ABTS^{•+}

La determinación fue realizada de acuerdo a Arnao et al. (2001). Aproximadamente a 1,2 g de tejido congelado en N₂ líquido y molido se le adicionaron 5 mL de etanol, se agitó durante 30 segundos y se dejó en reposo por 30 minutos. Luego se centrifugó a 15.000 × g por 10 minutos a 4°C. El sobrenadante se utilizó para las determinaciones. A 1 mL de solución del radical ABTS^{•+} (7 mM de ABTS con 2,45 mM K₂S₂O₈, absorbancia 0.700 +/- 0.05 a 734 nm) se le adicionaron 10 µL del extracto. La mezcla se dejó reaccionar 6 minutos y se midió la absorbancia a 734 nm. Se utilizó Trolox como patrón y los resultados se expresaron como Capacidad Antioxidante Equivalente a Trolox (TEAC) en mg kg⁻¹. Se realizaron tres replicados por cada tratamiento y tiempo de almacenamiento.

Glucosinolatos (GSs)

Se extrajeron y cuantificaron como describen Cargnel et al. (2014) usando tejido previamente liofilizado y sinigrin (2-propenil-glucosinolatos, Sigma-Aldrich, EE.UU.) como estándar. Los desulfoglucosinolatos se analizaron por HPLC (Knauer Euroline país) empleando una columna Restek Pinnacle II C18 (5m, 4.6 µ, 150 mm) con disolventes A (agua) y B (20% de acetonitrilo), se eluyó con un gradiente de 1% de B a 0 minutos, 10% B en 10 minutos, 75% B en 22 a 24 minutos, con un tiempo de equilibrado de 10 minutos y una velocidad de flujo de 1 mL/ min. El volumen de inyección fue de 20µL, y la elución se controló con un detector de red de diodos a 229 nm. Para calcular las concentraciones molares de GSs individuales, se utilizaron factores de respuesta relativos para corregir la diferencia de absorbancia entre el patrón interno y otros compuestos.

Análisis estadístico

Los datos se analizarán por medio de un ANOVA y las medias se compararon con el test LSD de Fisher a un nivel de significancia de $\alpha = 0,05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El color no fue afectado por los tratamientos en las 18 horas siguientes a 20°C, no observándose diferencias significativas entre intensidades y dosis para los parámetros Hue y L* respecto del control (**Figura 1A y 1B**), lo que es de fundamental importancia, dado que la calidad visual, para los consumidores, está dada principalmente por estos parámetros. Aiamla-or (2010) observó en brócoli tratado con una dosis de 8.8 kJ/m² de UV-B un retraso en la degradación de clorofilas y mayor valor del ángulo Hue luego de 6 días de almacenamiento a 15°C.

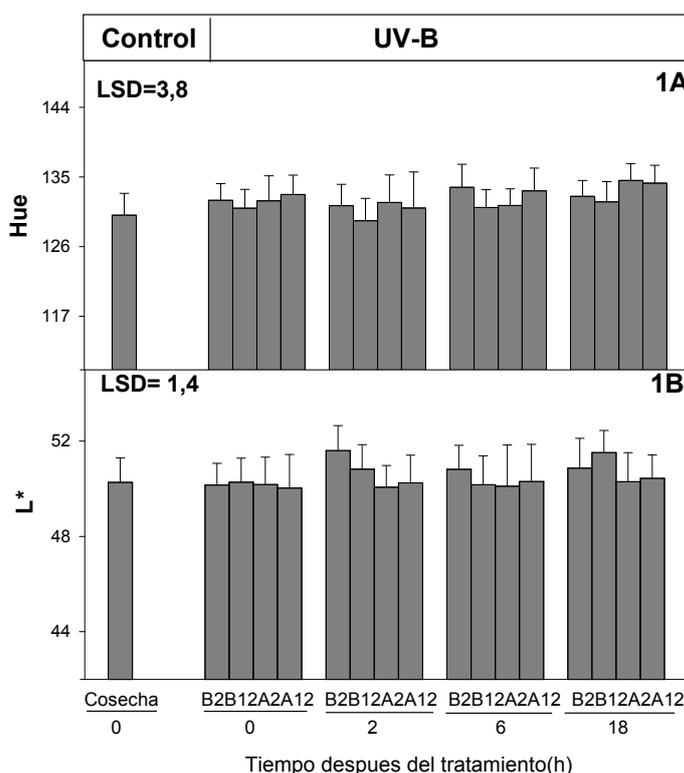
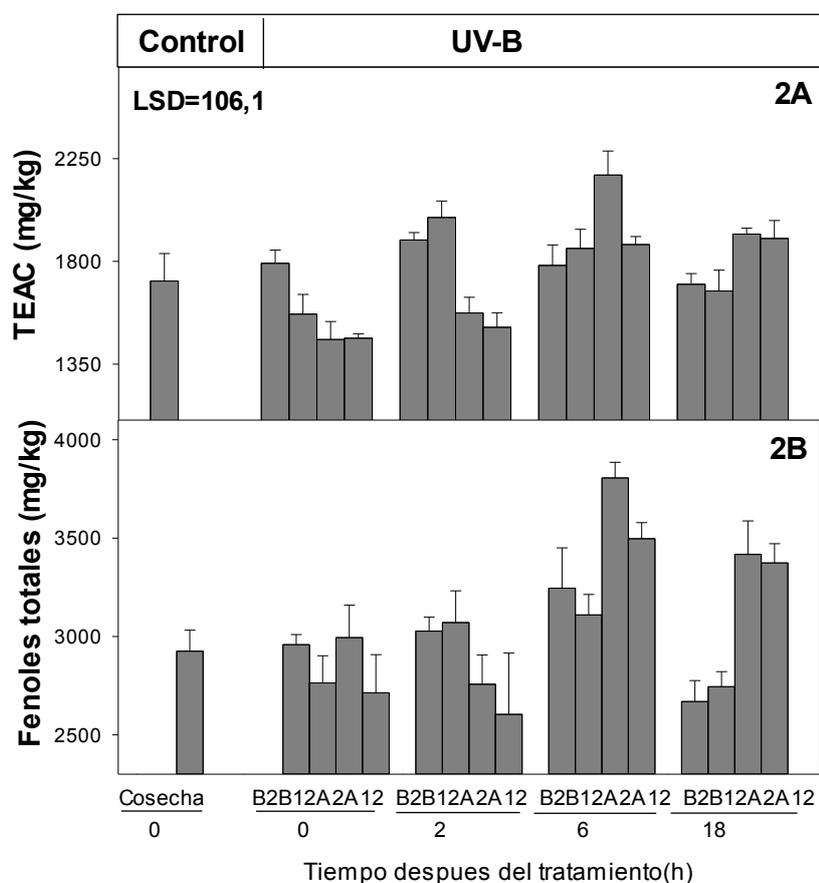


Figura 1. Hue (1A) y L*(1B) de brócoli mínimamente procesado control y tratado con dosis de 2 y 12 kJ/m² a las intensidades baja (B) y alta (A) de luz UV-B almacenado a 20°C por 0, 2, 6, 18 h.**Figura 2.** Capacidad antioxidante (2A) y contenido de compuestos fenólicos (2B) de brócoli mínimamente procesado control y tratado con dosis de 2 y 12 kJ/m² a las intensidades baja (B) y alta (A) de luz UV-B almacenado a 20°C por 0, 2, 6, 18 h.

Respecto a la capacidad antioxidante a tiempo 0 h se observó una rápida caída luego de la irradiación (**Figura 2A**) posteriormente hubo una recuperación, alcanzando un máximo a las 6 h post-tratamiento para todas las dosis e intensidades probadas, siendo los brócolis tratados con dosis de 2 kJ/m² y 12 kJ/m² y la mayor intensidad (5 W/m²) los que mostraron las variaciones más notorias, acumulando hasta un 30% más de antioxidantes respecto de los controles al inicio de la cosecha. Los compuestos fenólicos tuvieron un comportamiento similar (**Figura 2B**) a lo observado en TEAC, sugiriendo que este es el principal grupo de antioxidantes que se incrementa con el tratamiento.

Trabajos previos han informado que la radiación UV puede inducir enzimas clave en la vía de los fenilpropanoides tales como fenilalanina amonio liasa y chalconasintasa (Pombo et al. 2011). Tratamientos UV-B en espárragos llevaron a un aumento de la PAL dentro de las 2 h post-tratamiento (Eichholz et al. 2011). La falta de correlación completa entre fenólicos y TEAC indican que la radiación UV-B podría estar modulando otros grupos antioxidantes también.

Si bien se conoce que la radiación UV-B puede alterar el perfil de metabolitos secundarios de ciertas frutas (manzana, arándanos y vid) (Hagen et al. 2007; Eichholz et al. 2011;) y vegetales (tomate, zanahoria) (Castagna et al. 2013; Avena-Bustillos et al. 2012) los resultados de este trabajo indican que la obtención de compuestos fenólicos y antioxidantes de brócoli mediante tratamientos UV-B son factibles, en tiempos cortos y para alta intensidad de exposición.



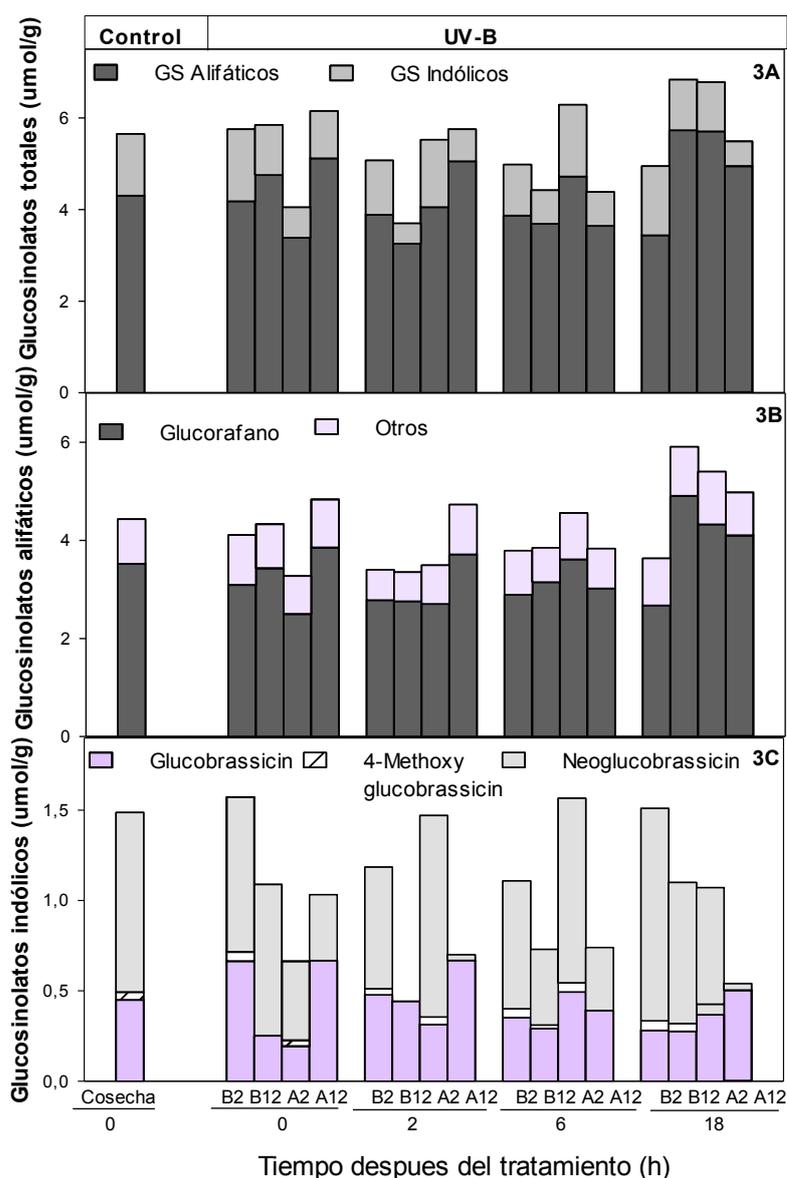


Figura 3. Contenido de glucosinolatos totales (3A), alifáticos (3B) e indólicos (3C) de brócoli mínimamente procesado control y tratado con dosis de 2 y 12 kJ/m^2 a las intensidades baja y alta de luz UV-B almacenado a 20°C por 0, 2, 6, 18 h.

Los glucosinolatos (GSs) son uno de los fitoquímicos más relevantes en el brócoli y las demás especies de Brassicaceas. Se ha informado que los niveles y tipos de GSs dependen del cultivar considerado (Bhandari y Kwak, 2015). En este trabajo la cantidad de los glucosinolatos alifáticos fue tres veces mayor que la de los indólicos (alifáticos e indólicos, 70 y 30%, respectivamente) al momento de la cosecha, aunque sólo recuperaron los niveles iniciales luego de 18h de retraso (Figura 3A).

Algunos estudios reportaron un aumento de la acumulación de GSs en respuesta al estrés abiótico (Variyar et al. 2014). En el caso de radiación UV las respuestas dependen mucho de las condiciones de irradiación. Wang et al. (2011) encontraron contenidos más altos de GSs en hojas de *Arabidopsis thaliana* después de 1 h de exposición a rayos UV-B, a pesar de una disminución significativa, sobre todo de GSs indólicos, después de 12 h de exposición a la radiación UV-B. En este trabajo, para la intensidad alta y dosis de 2 kJ/m^2 (A2) se redujo el contenido de GSs después de 2 h aunque tuvo un aumento posterior. Los valores más altos en los niveles de GSs se lograron después de 18 h del tratamiento UV-B (Figura 3B y 3C). El glucosinolato alifático glucorafanin que es el principal compuesto de importancia en el brócoli por reducir el riesgo de



cáncer (Cieslik, et al.2007) mostró la mayor inducción en respuesta a la exposición UV-B. Mewis et al. (2012) también encontraron un incremento preferencial de GSs alifáticos en brotes de brócoli irradiados con UV-B (0,3 kJ/m²).

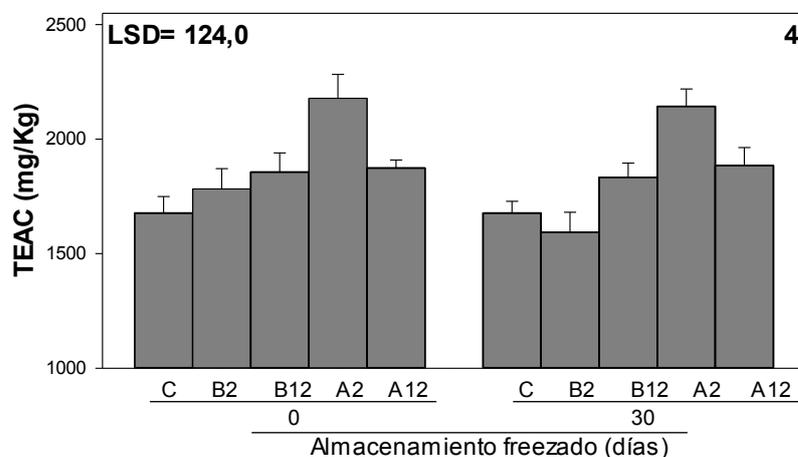


Figura 4. Capacidad antioxidante de brócoli mínimamente procesado control (C) y tratado con dosis de 2 y 12 kJ/m² a las intensidades baja y alta de luz UV-B luego de 6h pos tratamiento almacenado a -18°C por 30 días. Las barras de error representan la desviación estándar de la media.

En un segundo ensayo, muestras tratadas con las mismas dosis e intensidades de UV-B y congeladas luego de 6 h post-tratamiento, se almacenaron en freezer (-20°C) por 30 días simulando un procesamiento del tipo "congelado". Luego de 30 días, los brócolis controles y tratados (**Figura 4**) mantuvieron los niveles relativos de capacidad antioxidante logrados al inicio del almacenamiento.

CONCLUSIONES

Los resultados muestran que la aplicación de tratamientos de luz UV-B de alta intensidad logró una rápida respuesta aumentando los compuestos bioactivos de brócoli mínimamente procesados luego de 6 h post-tratamiento y que dicho aumento se mantuvo luego de 30 días de congelado, lo que permite agregar valor y además, generar nuevas oportunidades para los productores y procesadores de alimentos.

BIBLIOGRAFÍA

- Aiamla-or S, Yamauchi N, Takino S, Shigyo M. 2010. Effect of UV-A and UV-B irradiation on broccoli (*Brassica oleracea* L. Italica Group) floret yellowing during storage. *Postharvest Biology and Technology*, 54: 177-179.
- Arnao MB, Cano A, Acosta M. 2001. The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. *Food Chemistry*, 73: 239-244.
- Avena-Bustillos RJ, Du W, Woods R., Olson D, Breksa III AP, McHugh TH. 2012. Ultraviolet-B light treatment increases antioxidant capacity of carrot products. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92: 2341-2348.
- Bhandari SR y Kwak J. 2015. Chemical composition and antioxidant activity in different tissues of Brassica vegetables. *Molecules*, 20(1): 1228-1243.
- Cargnel MD, Demkura PV, Ballaré CL. 2014. Linking phytochrome to plant immunity: low red: far-red ratios increase *Arabidopsis* susceptibility to *Botrytis cinerea* by reducing the biosynthesis of indolic glucosinolates and camalexin. *New Phytologist*, 204: 342-354.
- Castagna A, Dall'Asta Ch, Chiavaro E, Galaverna G, Ranieri A. 2014. Effect of post-harvest UV-B irradiation on polyphenol profile and antioxidant activity in flesh and peel of tomato fruits. *Food Bioprocess Technologies*, 7: 2241-2250.



- Civello PM, Vicente AR, Martínez GA. 2006. UV-C technology to control postharvest diseases of fruits and vegetables. En: Troncoso-Rojas R, Tiznado-Hernández M.E y González-León A. (Eds), *Recent Advances in Alternative Postharvest Technologies to Control Fungal Diseases in Fruits & Vegetables*, pp: 71-102.
- Cieslik E, Leszczynska T, Filipiak-Florkiewicz A, Sikora E, Pisulewski PM. 2007. Effects of some technological processes on glucosinolate contents in cruciferous vegetable. *Food Chemistry*, 105: 976–981.
- Eichholz I, Rohn S, Gamm A, Besk N, Herppich WB, Kroh LW, Ulrichs C, Huyskens-Keil S. 2011. UV-B-mediated flavonoid synthesis in white asparagus (*Asparagus officinalis*L.): effect of spear development and irradiation dose on the activity of associated enzymes. *Food Research International*, 48: 196-201.
- Hagen SF, Borge GI, Bengtsson GB, Bilger W, Berge A, Haffner K, Asbjørn Solhaug K. 2007. Phenolic contents and other health and sensory related properties of apple fruit (*Malus domestica* Borkh., cv. Aroma): Effect of postharvest UV-B irradiation. *Postharvest Biology and Technology*, 45: 1-10.
- Lemoine ML, Civello PM, Chaves AR, Martínez GA. 2008. Effect of combined treatment with hot air and UV-C on senescence and quality parameters of minimally processed broccoli (*Brassica oleracea*L. var. *Italica*). *Postharvest Biology and Technology*, 48(1): 15-21.
- Lemoine ML, Civello PM, Martínez GA, Chaves AR. 2007. Influence of postharvest UV-C treatment on refrigerated storage of minimally processed broccoli (*Brassica oleracea* var. *Italica*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87: 1132-1139.
- Lorenzen CJ, Jeffrey SW. 1980. Determination of chlorophyll in seawater. *Unesco Technical Papers in Marine Science*, 35: 20.
- Mewis I, Schreiner M, Nguyen CN, Krumbein A, Ulrichs C, Lohse M, Zrenner R. 2012. UV-B irradiation changes specifically the secondary metabolite profile in broccoli sprouts: induced signaling overlaps with defense response to biotic stressors. *Plant Cell Physiology*, 53: 1546-1560.
- Pombo MA, Martínez GA, Civello PM. 2011. Cloning of FaPAL6 gene from strawberry fruit and characterization of its expression and enzymatic activity in two cultivars with different anthocyanin accumulation. *Plant Science*, 181: 111-118.
- Schreiner M, Krumbeina A, Mewis I, Ulrichs C, Huyskens-Keil S. 2009. Short-term and moderate UV-B radiation effects on secondary plant metabolism in different organs of nasturtium (*Tropaeolummajus*L.). *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 10: 93-96.
- Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos R.M. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299: 152-178.
- Variyar PS, Banerjee A, Akkarakaran J, Suprasanna P. 2014. Chapter 12: Role of glucosinolates in plant stress tolerance, In P. Ahmad and S. Rassol (Eds.) *Emerging Technologies and Management of Crop Stress Tolerance* San Diego: Academic Press, pp: 271-291
- Wang Y, Xu W, Yan X, Wang Y. 2011. Glucosinolate content and related gene expression in response to enhanced UV-B radiation in *Arabidopsis*. *African Journal Biotechnology*, 10: 6481-6491.

