

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE CARTAGENA

**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA
AGRONÓMICA**

**MÁSTER EN TÉCNICAS AVANZADAS EN INVESTIGACIÓN
Y DESARROLLO AGRARIO Y ALIMENTARIO**



TESIS FIN DE MASTER

**EFEECTO DEL AGUA ELECTROLIZADA SOBRE
EL SISTEMA ANTIOXIDANTE Y LA ENZIMA
MIROSINASA EN BRÓCOLI MÍNIMAMENTE
PROCESADO**

**AUTORA: MARÍA ÁNGELES NÚÑEZ SÁNCHEZ
LICENCIADA EN BIOQUÍMICA**

DIRECTOR: PROF. DR. FRANCISCO ARTÉS CALERO

REFERENCIAS DE LA TESIS FIN DE MASTER

IDENTIFICACIONES

Autora: María Ángeles Núñez Sánchez

Título: Efecto del agua electrolizada sobre el sistema antioxidante y la enzima mirosinasa en brócoli mínimamente procesado

Title: Effect of electrolyzed water on the antioxidant system and the myrosinase enzyme in minimally processed broccoli

Director: Francisco Artés Calero

Año: 2012

Calificación:

Titulación: Máster en Técnicas Avanzadas en Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario

PALABRAS CLAVE

Tipo de trabajo: Experimental

Tipo de industria: Procesado mínimo en fresco

Otras palabras específicas: *Brassica oleracea* Grupo *Italica*, *Brassica oleracea* Grupo *Italica* x Grupo Alboglabra; Sistema antioxidante; *ascorbato peroxidasa*, *catalasa*, *guaiacol peroxidasa*, *superóxido dismutasa*, *mirosinasa*.

Keywords: *Brassica oleracea* *Italica* Group, *Brassica oleracea* *Italica* Group x Alboglabra Group; antioxidant system, ascorbate peroxidase, catalase, guaiacol peroxidase, superoxide dismutase, myrosinase.

OTROS DATOS

Nº de citas bibliográficas: 40

Nº de ilustraciones: 23

Nº de tablas: 5

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a todas aquellas personas que me han ayudado en la realización del presente trabajo, en especial al Prof. Dr. D. Francisco Artés Calero, director del mismo, por la oportunidad que me ha ofrecido este año pudiendo formar parte de su equipo de investigación.

También quisiera agradecer a la empresa SACOJE Soc. Cooperativa Agrícola (Lorca, Murcia) por proporcionarnos el material vegetal empleado en los ensayos realizados.

RESUMEN

En los últimos años ha aumentado mucho el consumo de productos vegetales mínimamente procesados en fresco (MPF) debido al actual estilo de vida, por lo que el estudio de su comportamiento en la supervivencia comercial resulta de gran interés.

En la necesaria desinfección de los productos vegetales para el consumo humano, se ha demostrado que el NaOCl, aunque sea muy eficaz y barato, supone un riesgo para la salud humana así como para el medio ambiente. Por ello se están investigando alternativas seguras para la salud y ambientalmente sostenibles. A este respecto, el agua electrolizada neutra (NEW) se está mostrando como uno de los desinfectantes que más interés despierta para la industria de vegetales MPF por su eficacia e inocuidad.

Se está conociendo bastante acerca del efecto del NEW sobre los microorganismos, pero apenas existe información sobre cómo influye en los sistemas enzimáticos de los productos MPF tratados. En este trabajo se estudia el efecto del NEW con 100 ppm de Cl⁻, comparado con el de un testigo de NaOCl, en dos tipos varietales de brócoli MPF, uno convencional (*Brassica oleracea*, grupo Italica) var. Parthenon y otro recientemente introducido en el mercado, el híbrido (*Brassica oleracea*, grupo Alboglabra) llamado Bimi, Kai-lan o Tenderstem, sobre el sistema antioxidante y la actividad mirosinasa. Con ello se ha pretendido conocer también la influencia de la matriz vegetal. Se estudiaron las actividades enzimáticas ascorbato peroxidasa (APX), catalasa (CAT), guayacol peroxidasa (GPX), superóxido dismutasa (SOD) y mirosinasa (Myr), a lo largo de la vida comercial de ambos cvs. de brócoli MPF.

Los resultados han demostrado que, aunque existe una tendencia a que la actividad antioxidante se vea algo aumentada en ambos cvs. de brócoli tratados con NEW, no hay diferencias significativas respecto del NaOCl. Ello, unido a su eficacia como desinfectante permiten considerar al NEW como una posible alternativa al NaOCl.

ABSTRACT

In recent years consumption of minimally fresh processed (MFP) vegetables has greatly increased due to current lifestyle. For that reason, the study of their behavior in the commercial survival is of great interest.

In the need of disinfection of plant products for human consumption, although NaOCl has shown to be very effective and inexpensive, it supposes a risk to human health and to the environment. Thus, safe alternatives for health and environmentally sustainable, are being researched. In this regard, neutral electrolyzed water (NEW) is proving to be one of the disinfectants that arouse most interest for MFP vegetable industry due to its efficacy and safety. The effect of electrolyzed on microorganism is well known, but there is little information on how it affects the enzyme systems of MFP products. This paper studies the effect of NEW 100 ppm Cl⁻, compared to a witness of NaOCl on two varieties of broccoli MFP, conventional (*Brassica oleracea*, Italica group) var. Parthenon and the recently introduced in the market, the hybrid (*Brassica oleracea*, Alboglabra group) called Bimi, Kai-lan or Tenderstem on the antioxidant system and myrosinase activity.

As well, influence of vegetable matrix, has been tried to be sought. Enzyme activities were studied, ascorbate peroxidase (APX), catalase (CAT), guaiacol peroxidase (GPX), superoxide dismutase (SOD) and myrosinase (MYR), along commercial life of both cvs. MPF broccolis.

The results have shown that, although there is a tendency for the antioxidant activity to increase in both cvs. NEW treated broccoli, no significant differences were observed when compared with those treated with NaOCl. This, combined with its effectiveness as a disinfectant, NEW could be considered as a possible alternative to NaOCl.

INDICES

Índice

1. INTRODUCCIÓN.....	2
1.1 USO DE NaOCL: PROBLEMÁTICA Y ALTERNATIVAS	2
1.2 SISTEMA ANTIOXIDANTE: RESPUESTA AL ESTRÉS OXIDATIVO	4
1.2.1 Ascorbato Peroxidasa (APX) (E.C.1.11.1.11).....	4
1.2.2 Catalasa (CAT) (E.C.1.11.1.6).....	6
1.2.3 Guayacol Peroxidasa (GPX) (E.C.1.11.1.7)	7
1.2.4 Superóxido Dismutasa (SOD) (E.C.1.15.1.1).....	8
1.3 MIROSINASA (MYR) Y GLUCOSINOLATOS.....	9
2. OBJETIVOS.....	14
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
3.1 MATERIAL VEGETAL	16
3.1.1 Preparación del material vegetal.....	16
3.1.2 Tratamiento higienizantes aplicados al material vegetal.....	16
3.1.3 Conservación y preparación de las muestras.....	17
3.2 PROCESO DE EXTRACCIÓN ENZIMÁTICA	17
3.2.1 CAT, GPX y APX.....	17
3.2.2 SOD	18
3.2.3 Myr	18
3.3 MEDIDA DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.....	18
3.3.1 APX.....	18
3.3.2 CAT.....	20
3.3.3 GPX	20
3.3.4 SOD	20
3.3.5 Myr	21
3.4 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA EN LAS MUESTRAS	22
3.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.	23
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	25
4.1 SISTEMA ANTIOXIDANTE.....	25
4.1.1 APX.....	25
4.1.2 CAT.....	27
4.1.3 GPX	29
4.1.4 SOD	31
4.2 Actividad mirosinasa.....	32
5. CONCLUSIONES.....	36

Índice de figuras

Figura 1. Esquema del generador de agua electrolizada y compuestos producidos.....	3
Figura 2. Ascorbato peroxidasa.....	5
Figura 3. Reacción catalizada por la APX (1.11.1.11).....	5
Figura 4. Catalasa.....	6
Figura 5. Reacción a bajas concentraciones de H ₂ O ₂	7
Figura 6. Reacción catalizada por la CAT (1.11.1.6).....	7
Figura 7. Guaiacol Peroxidasa (GPX) (E.C.1.11.1.7)	7
Figura 8. Reacción catalizada por la GPX (1.11.1.7).....	8
Figura 9. Superóxido dismutasa (E.C.1.15.1.1)	8
Figura 10. Reacción catalizada por la SOD	9
Figura 11. Localizaciones SOD	9
Figura 12. Estructura general de los glucosinolatos.....	10
Figura 13. Mirosinasa (E.C.3.2.1.147).....	11
Figura 14. Degradación de glucosinolatos por Myr	11
Figura 15. Equipo ENVIROLYTE EL 400 para la generación de agua electrolizada.....	17
Figura 16. Espectrofotómetro TECAN-InfiniteM200.....	19
Figura 17. Recta de calibración de sinigrina	22
Figura 18. Curvas patrón BSA	23
Figura 19. Evolución de la actividad APX durante la vida comercial del brócoli a) Bimi y b) Parthenon tratados con NaOCl (Cl) y NEW.	26
Figura 20. Evolución de la actividad CAT durante la vida comercial del brócoli a) Bimi y b) Parthenon tratados con NaOCl (Cl) y NEW.	28
Figura 21. Evolución de la actividad GPX durante la vida comercial del brócoli a) Bimi y b) Parthenon tratados con NaOCl (Cl) y NEW.	30
Figura 22. Evolución de la actividad SOD durante la vida comercial del brócoli a) Bimi y b) Parthenon tratados con NaOCl (Cl) y NEW.	32
Figura 23. Evolución de la actividad Myr durante la vida comercial del brócoli a) Bimi y b) Parthenon tratados con NaOCl (Cl) y NEW.	33

Índice de tablas

Tabla 1. Cambios en la actividad APX.....	25
Tabla 2. Cambios en la actividad CAT	28
Tabla 3. Evolución de la Actividad GPX	30
Tabla 4. Evolución de la actividad SOD	31
Tabla 5. Evolución de la actividad Myr	33

Lista de abreviaturas

NaOCl: hipoclorito sódico

NEW: Agua electrolizada neutra

APX: Ascorbato peroxidasa

CAT: Catalasa

GPX: Guayacol peroxidasa

SOD: Superóxido dismutasa

Myr: Mirosinasa

Abs: Absorbancia

Introducción

1. INTRODUCCIÓN

Debido al ritmo de vida actual, se está produciendo un cambio gradual en los hábitos alimentarios en las poblaciones de los países más desarrollados. Esto ha traído como consecuencia un aumento en la demanda de productos vegetales naturales, frescos, saludables y dispuestos para consumir, como los mínimamente procesados en fresco (MPF), denominados comercialmente de la “Cuarta gama” de la alimentación (Artés-Calero et al. 2009).

Las plantas de la familia de las *Brassicaceae*, tienen una gran importancia a nivel mundial ya que además de la gran aceptación debido a su sabor, se consideran una fuente muy importante de compuestos fitoquímicos saludables (Latté et al., 2011). La familia de las *Brassicaceae* engloba hortalizas de gran importancia económica como el brócoli, la coliflor, la col de Bruselas o la col verde, entre otras. Además de sus ya conocidos beneficios por su contenido en fibra, vitaminas y minerales, han demostrado ser una excelente fuente de antioxidantes gracias a su contenido en compuestos fenólicos y glucosinolatos. Existen evidencias científicas de que estos compuestos tienen propiedades anticancerígenas y que previenen enfermedades cardiovasculares y degenerativas, de ahí que se hayan sido objeto de numerosos estudios en las últimas décadas (Björkman et al. 2011). Por ello, los organismos competentes en materia de salud vienen recomendando el consumo de estas hortalizas desde la década de los 80 (Nestle, 1998).

1.1 Uso de NaOCl: Problemática y alternativas

En la preparación de productos MPF, una de las etapas más importantes es el proceso de lavado del producto. El objetivo de esta operación es eliminar, o al menos reducir hasta valores seguros el número de microorganismos, ya sean patogénicos como causantes de deterioro (Allende et al., 2004; Artés et al., 2005).

Actualmente el hipoclorito sódico (NaOCl) es el desinfectante más empleado en la industria agroalimentaria, ya que tiene un gran poder desinfectante, es económico y fácil de usar. En los últimos años se ha demostrado que este método de desinfección supone un peligro para la salud humana así como para el medio ambiente (Ölmez y

Kretzschmar 2009). Cuando el NaClO interacciona con compuestos orgánicos, se liberan productos como el monocloropropanodiol, las clorohidrofuranonas y los trihalometanos, que suponen un alto riesgo para la salud ya que se ha demostrado que aumentan el riesgo de diversos cánceres (Silveira et al. 2008). Por ello se ha prohibido su uso en varios países de la Unión Europea y la búsqueda de alternativas se ha convertido en uno de los mayores retos para la industria de productos MPF. Muchos grupos de investigación estudian productos que ofrezcan una desinfección mayor o similar al NaOCl pero que sean seguros para el consumidor, no afecte las propiedades organolépticas del producto, no incremente los costes y respete al medio ambiente.

Una de las alternativas que está logrando mayor aceptación debido a su alto poder desinfectante y a su inocuidad para la salud es el agua electrolizada, ya que no es corrosiva para la piel, membranas mucosas o materiales orgánicos (Artés et al., 2009). Se produce pasando una solución salina por una célula electrolítica (Figura 1) donde el ánodo y el cátodo están separados por una membrana de manera que al aplicar un voltaje continuo, los iones cargados negativamente (Cl^- , OH^-), se dirigen hacia el ánodo, donde libera electrones produciéndose O_2 , ion hipoclorito (ClO^-), ácido hipocloroso (HClO) y ácido hidroclórico (HCl), y los iones cargados positivamente van al cátodo, donde se produce hidrógeno (H_2) e hidróxido sódico (NaOH) (Huang et al. 2008).

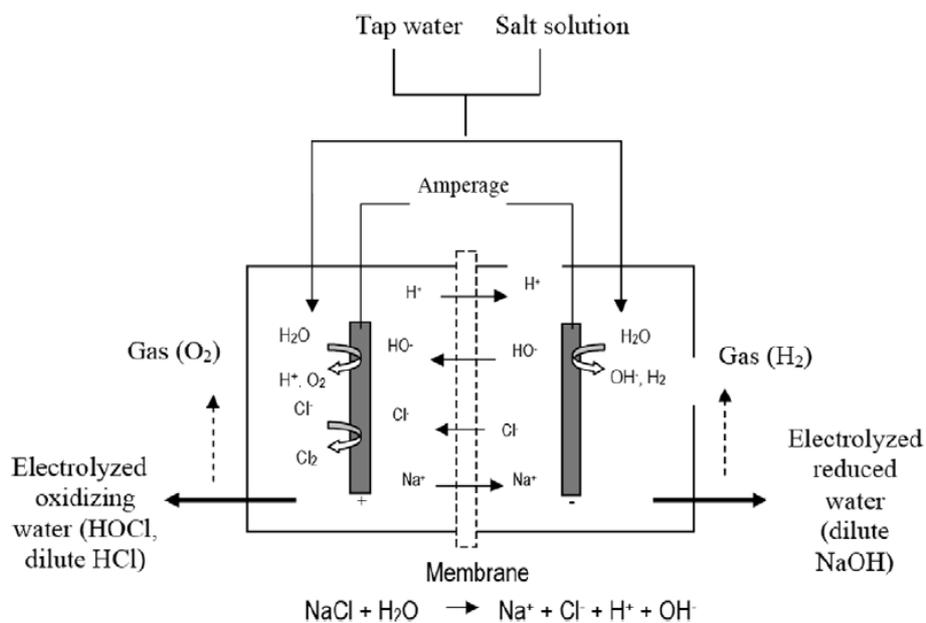


Figura 1. Esquema del generador de agua electrolizada y compuestos producidos (Huang et al. 2008)

Aquí se producen dos tipos de agua electrolizada, una ácida (AEW) con un pH bajo (2-4) y otra neutra (NEW) con un pH entorno a 8.

En los últimos años esta alternativa al NaClO ha despertado gran interés ya que, además de su alto poder desinfectante, es un higienizante seguro ya que al interactuar con materia orgánica, se transforma en agua (Tomás-Callejas et al. 2011).

1.2 Sistema antioxidante: Respuesta al estrés oxidativo

Cada día hay una mayor concienciación de la importancia de la seguridad alimentaria, lo que se traduce en una necesidad de usar tratamientos que no provoquen una pérdida de calidad del producto y que alarguen o al menos mantengan la vida comercial de los productos MPF (Zhang et al. 2009).

Durante la elaboración de los productos MPF, los órganos vegetales sufren daños, sobre todo mecánicos, que se traducen en un aumento del estrés oxidativo. Cuando este estrés aumenta, se producen en la célula las llamadas especies reactivas de oxígeno (ROS) como el superóxido ($\bullet\text{O}_2^-$), el hidroxilo ($\bullet\text{OH}$) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) que, si no son eliminadas rápidamente, provocan daños celulares que pueden llegar a ser irreversibles. Para ello, las plantas disponen de un sistema, enzimático y no enzimático que, actuando de manera conjunta, eliminan eficazmente estas ROS. Los principales sistemas antioxidantes enzimáticos en plantas son la ascorbato peroxidasa (APX), la catalasa (CAT), la glutatión peroxidasa (GPX) y la superóxido dismutasa (SOD) (Miranda-Ham y Castro-Concha, 2009).

1.2.1 Ascorbato Peroxidasa (APX) (E.C.1.11.1.11)

La ascorbato peroxidasa (APX) es un enzima que forma parte del sistema antioxidante, que interviene en el control de las concentraciones de H_2O_2 dentro de las células (Figura 2).

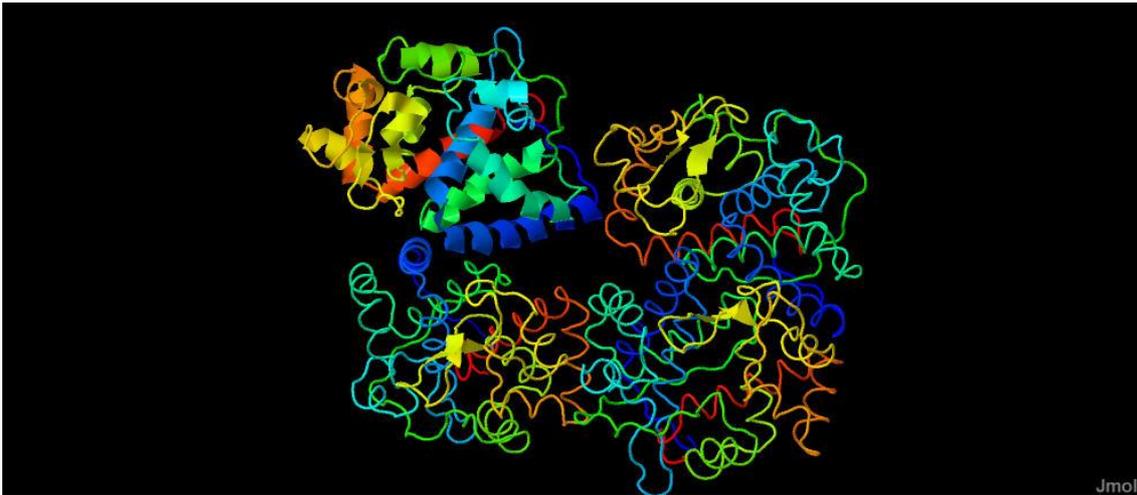


Figura 2. Ascorbato peroxidasa

Para ello, la APX cataliza la reducción del H₂O₂ oxidando una molécula de ascorbato, el cual actúa como dador de electrones siguiendo la reacción:

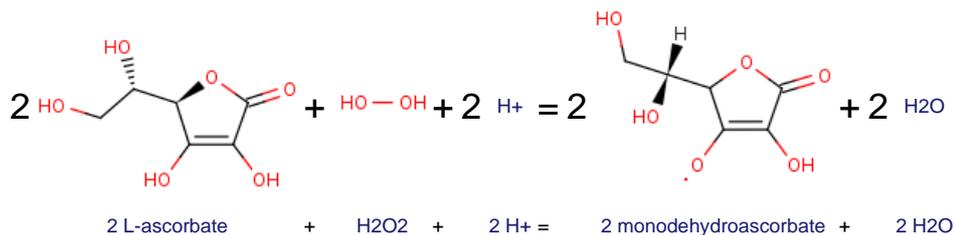


Figura 3. Reacción catalizada por la APX (1.11.1.11)

La APX pertenece a una superfamilia de peroxidases de la clase I y presenta varias isoformas con un sitio activo muy conservado que varían entre sí por el peso molecular, pH óptimo, estabilidad, especificidad por el sustrato, localización y nivel de respuesta a diferentes condiciones de estrés (Dąbrowska et al. 2007).

Son hemoproteínas, es decir, contienen un grupo hemo donde el hierro juega un papel importante en el sitio catalítico. Presentan una alta afinidad por el ascorbato, de hecho, a bajas concentraciones de dicho sustrato, la APX pierde estabilidad y su actividad disminuye (Dąbrowska et al. 2007).

1.2.2 Catalasa (CAT) (E.C.1.11.1.6)

Se trata de una enzima que se encuentra en la mayoría de los organismos vivos que crecen en presencia de O_2 y es una de las de mayor poder catalizador que se conocen.

La catalasa (CAT) (E.C.1.11.1.6) es una enzima que interviene en el sistema antioxidante, siendo su función principal evitar la acumulación de niveles tóxicos de H_2O_2 que se forman durante los procesos metabólicos (Figura 4).

Se trata de una hemoproteína, que se presenta en forma de tetrámero (conformado por 4 cadenas polipeptídicas de más de 500 aminoácidos cada una) y que presenta en cada monómero un grupo Fe (III) en su centro catalítico, NADPH o un dominio de tipo flavodoxina para prevenir la acumulación de una forma inactivada de Fe (IV) (Perltreves y Perl, 2002).

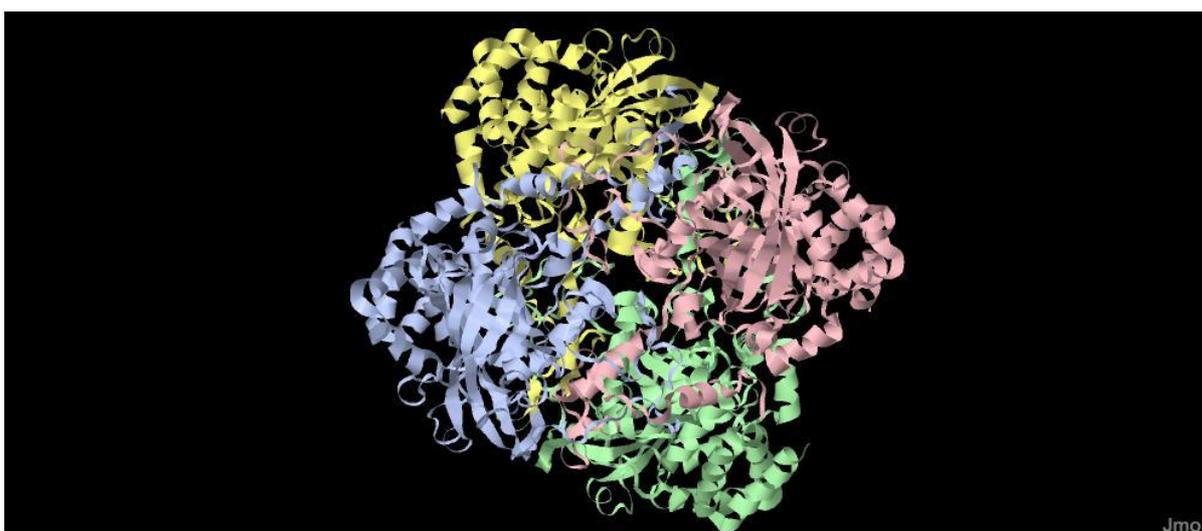


Figura 4. Catalasa

Se encuentra localizada en los peroxisomas, estructuras donde se produce la reacción de eliminación de H_2O_2 procedente del ciclo fotorrespiratorio.

La reacción llevada a cabo por la catalasa es una de las más rápidas conocidas en la naturaleza. Presenta una doble función ya que dependiendo de las concentración de H_2O_2 presente, los donadores de H_2 varían, siendo a bajas concentraciones compuestos como el etanol o compuesto fenólicos (Figura 5); y a altas concentraciones es el propio

H₂O₂ el que actúa tanto como donador como aceptor de moléculas de H₂ (Figura 6) (Scandalios et al.1997).

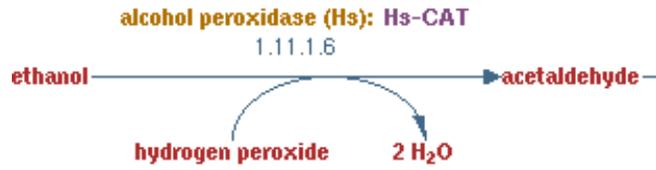


Figura 5. Reacción a bajas concentraciones de H₂O₂

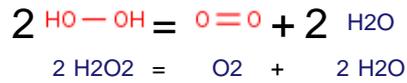


Figura 6. Reacción catalizada por la CAT (1.11.1.6)

1.2.3 Guaiacol Peroxidasa (GPX) (E.C.1.11.1.7)

La guaiacol peroxidasa (GPX) es una enzima oxidoreductasa que cataliza la detoxificación del H₂O₂ en los organismos vivos (Figura 7).

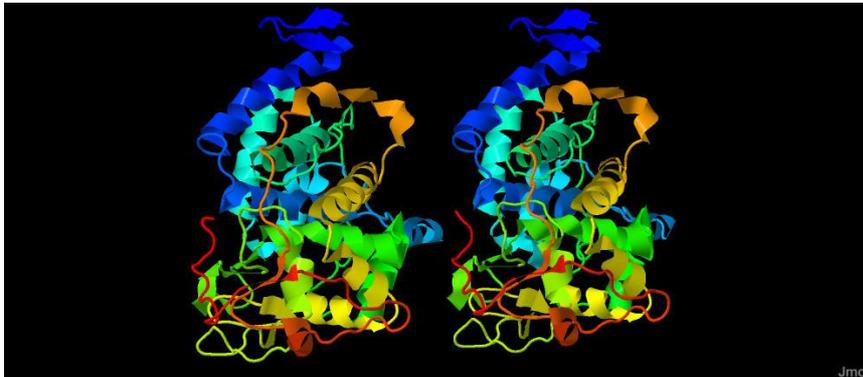


Figura 7. Guaiacol Peroxidasa (GPX) (E.C.1.11.1.7)

Cataliza una reacción en la que sustrae un átomo de H₂ de una molécula de guaiacol para cedérsela a una molécula de peróxido H₂O₂ produciendo tetraguaiacol y O₂ y H₂O (Figura 8).

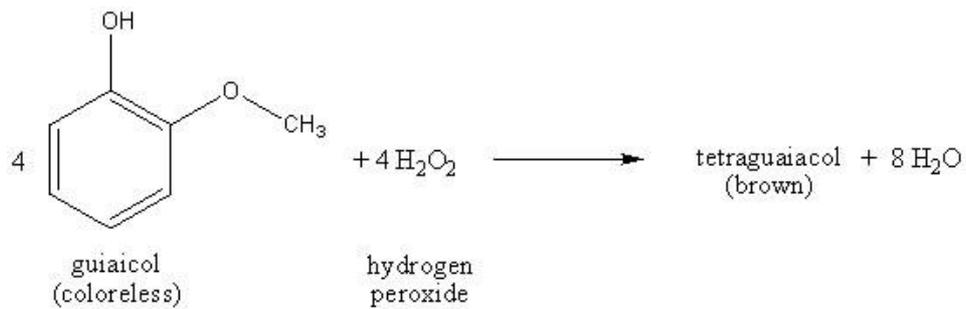


Figura 8. Reacción catalizada por la GPX (1.11.1.7)

Se trata de un importante grupo de peroxidasas que se encuentran localizadas en el citoplasma y en el apoplasto e intervienen en diferentes procesos relacionados con el crecimiento y el desarrollo (Tayefi-Nasrabadi et al. 2011).

1.2.4 Superóxido Dismutasa (SOD) (E.C.1.15.1.1)

La superóxido dismutasa (SOD) (Figura 9) constituye la primera línea de defensa frente a las ROS. La SOD dismuta el anión superóxido (O_2^-), donde transfiere un electrón de una molécula de superóxido a otra, produciendo O_2 y H_2O_2 que tiene que ser a su vez degradado por otras enzimas del sistema oxidativo (Figura 10).

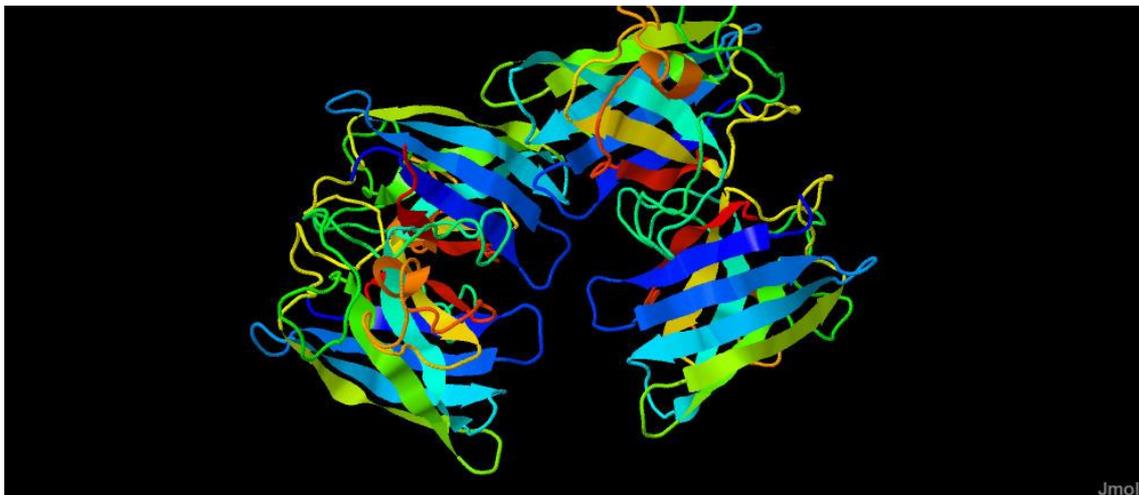


Figura 9. Superóxido dismutasa (E.C.1.15.1.1)

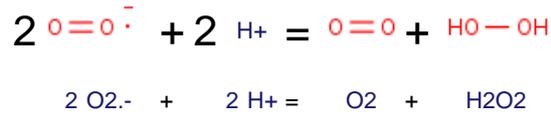


Figura 10. Reacción catalizada por la SOD

Cuando el estrés oxidativo aumenta, se produce a su vez un aumento de los niveles de SOD. Existen diferentes isoformas de SOD que se encuentran localizados en diferentes compartimentos en las células de las plantas. Existen tres tipos de SOD según el metal que intervenga como cofactor, las Fe SOD, localizada en los cloroplastos; la Mn(III) SOD conformada por un homodímero, que presenta un átomo de Mn en cada subunidad y principalmente se localiza en mitocondrias y peroxisomas y por último la Cu/Zn SOD que se encuentran localizadas en cloroplastos, citosol y excepcionalmente en el espacio extracelular (Figura 11) (Alscher et al., 2002).

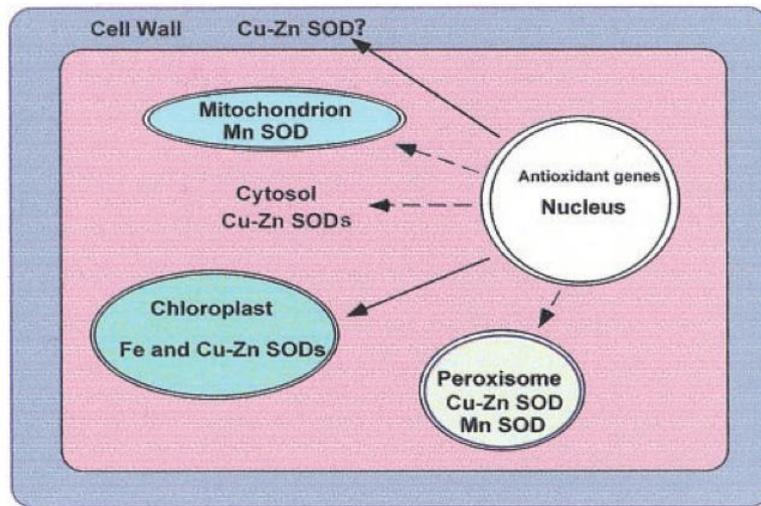


Figura 11. Localizaciones SOD (Alscher et al., 2002)

1.3 Mirosinasa (Myr) y glucosinolatos

Los compuestos fitoquímicos más importantes presentes en el brócoli son los glucosinolatos (β -tioglucósidos), habiendo sido identificados alrededor de 120 agliconas diferentes que aparecen en la familia de las *Brassicaceae*. Se trata de metabolitos secundarios derivados de amino ácidos y cuya síntesis se da como una respuesta frente a situaciones de estrés. Las primeras observaciones sobre las propiedades de los

glucosinolatos se llevaron a cabo a principios del Siglo XVII como resultado de un estudio sobre el sabor de la mostaza. La estructura de estos compuestos la propusieron Etilinger y Lundeen en 1956 (Figura 12) y describieron la primera ruta de síntesis de estos compuestos (Cartea y Velasco 2007). Se trata de S-glicósidos, formados por β -D-tioglucosa (glicona) y una oxima sulfatada (aglicona) con una cadena lateral variable. Dependiendo del tipo de cadena lateral, se definen tres tipos de glucosinolatos, alifáticos, aromáticos e indólicos.

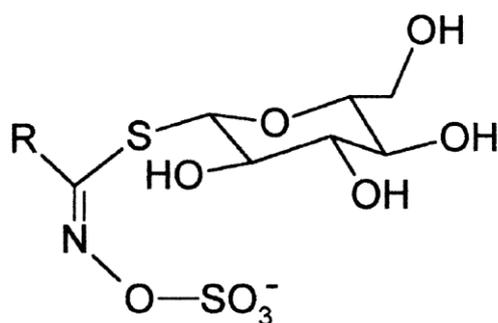


Figura 12. Estructura general de los glucosinolatos (Chen y Andreasson 2001)

Cuando los glucosinolatos entran en contacto con las β -glucosidasas (mirosinasas) debido a una ruptura celular (mecánica o química) se hidrolizan generando una mezcla de agliconas, glucosa y sulfato. La aglicona, es inestable por lo que sufre un cambio de forma que da como consecuencia isotiocianatos, tiocianatos, indoles, nitrilos, epitionitrilos, etc. dependiendo de la estructura del glucosinolato y de la reacción que tenga lugar (Jahangir et al. 2009; Latté y Lampen 2011; Cartea y Velasco 2008)

La mirosinasa (Myr) es una β -tioglucosilasa responsable de hidrolizar los glucosinolatos y que se cree que intervienen en mecanismos de defensa celular (Figura 13) (Bones y Rossiter, 2006). En la célula intacta, los glucosinolatos y la Myr se encuentran en compartimentos diferentes de manera que para entrar en contacto ha de producirse una rotura celular (Jones et al. 2006).

Los glucosinolatos son metabolitos secundarios derivados de aminoácidos y cuya síntesis se da como una respuesta frente al estrés y que presentan propiedades beneficiosas para la salud humana (Cartea y Velasco 2008).

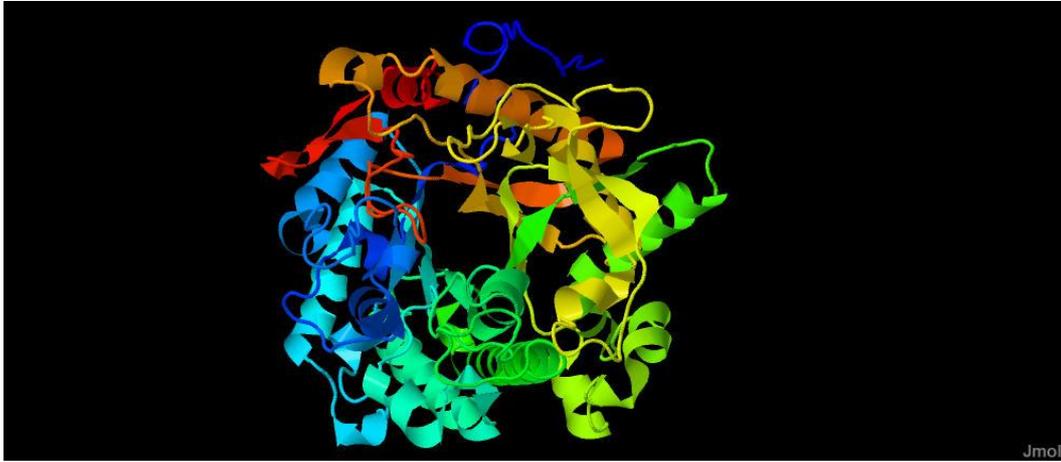


Figura 13. Mirosinasa (E.C.3.2.1.147)

Cuando la Myr entra en contacto con los glucosinolatos debido a una ruptura celular, se produce una hidrólisis de dichos compuestos generando una mezcla de agliconas, glucosa y sulfato según la reacción:

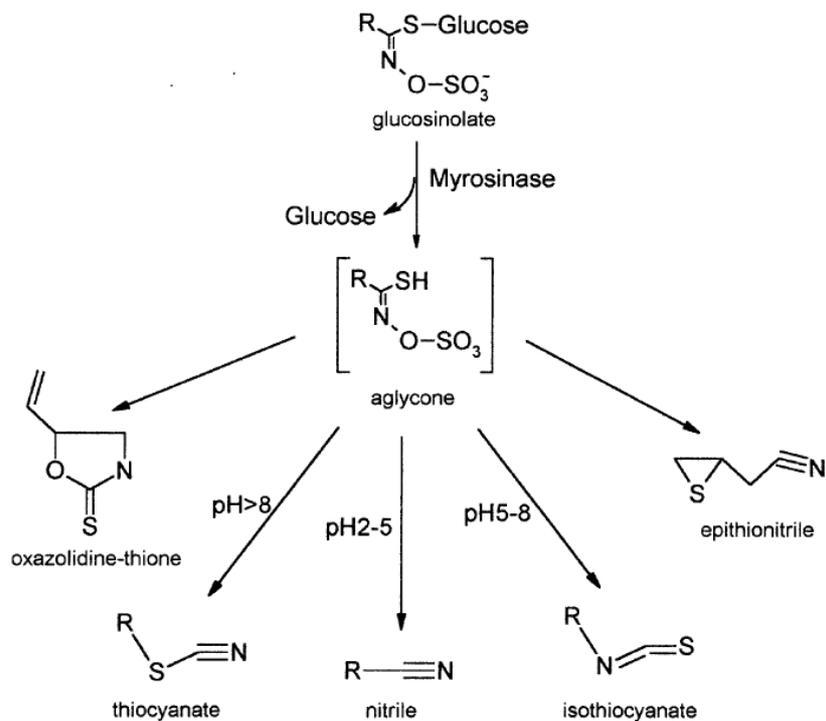


Figura 14. Degradación de glucosinolatos por Myr (Chen y Andreasson, 2001).

La estructura de la Myr es la de un dímero cuyas subunidades se encuentran unidas por un puente disulfuro y que contienen asociadas a su estructura un alto número de carbohidratos (principalmente manosas), grupos tiol y un átomo de Zn (Pinto de Castelo-Branco, 2010).

Objetivos

2. Objetivos

El principal objetivo del presente trabajo ha sido evaluar el efecto que tiene un tratamiento desinfectante con agua electrolizada neutra (NEW) frente al del tratamiento tradicional con NaOCl, sobre el sistema antioxidante enzimático y sobre la actividad Myr en brócoli de los cvs. Parthenon (convencional) y Bimi (híbrido) MPF.

Se pretendió con ello conocer la viabilidad en éste aspecto del tratamiento con NEW como alternativa al NaOCl habitualmente utilizado por la industria de productos vegetales MPF.

Materiales y métodos

3. Materiales y métodos

3.1 Material vegetal

El material vegetal empleado ha sido brócoli Bimi, (*Brassica oleracea* Grupo Itálica x Grupo Alboglabra) y Parthenon (*Brassica oleracea* grupo Itálica). Fue proporcionado por SACOJE Soc. Cooperativa Agrícola (Lorca, Murcia). La recolección fue manual, se dispuso en recipientes con hielo en escamas y se transportó unos 50 Km hasta la Planta Piloto del Grupo de Postrecolección y Refrigeración de la Universidad Politécnica de Cartagena, donde se conservó a 0/1 °C en oscuridad y con una HR del 95%.

3.1.1 Preparación del material vegetal

El producto fue mínimamente procesado a 8°C en la antecámara de la Planta Piloto, previamente desinfectada. Para el cv. Bimi, se seleccionaron las piezas que presentaban un tamaño de tallo de entre 15 y 18cm, sin amarilleamiento o daño visible y desprovistas de hojas.

En el procesado del cv. *Parthenon*, las cabezas se separaron en floretes que no presentaban daños ni amarilleamiento.

Antes de aplicar los tratamientos desinfectantes se lavó el producto con agua de la red a 5°C durante 1 min con el fin de eliminar restos de materia orgánica y de tierra procedente del campo.

3.1.2 Tratamiento higienizantes aplicados al material vegetal

Se le aplicaron dos tratamientos a cada cv. de brócoli. El primero consistió en un lavado del producto en una solución de 100 µL L⁻¹ de NaOCl acidificada con ácido cítrico (pH= 6,5 ± 0,1) durante 2 min a 5°C. Tras ello se enjuagó el producto con agua de la red durante 1 min a 5°C y tras esto se dejó escurrir en una cesta perforada durante 1 min.

Para el segundo tratamiento se llevó a cabo una desinfección con NEW con 100ppm de cloro libre (Envirolyte EL 400) pH= 7 ± 0,1 y ORP= 900 mV (Figura 15). El resto del proceso fue igual que el llevado a cabo para el lavado con NaOCl.



Figura 15. Equipo ENVIROLYTE EL 400 para la generación de agua electrolizada

3.1.3 Conservación y preparación de las muestras

Una vez tratadas las muestras, se distribuyeron en cestas o tarrinas de polipropileno (PP) de aproximadamente 200g cada una, que se termosellaron por la parte superior con un film de PP biorientado (BOPP) y se almacenaron a 5°C.

Se tomaron muestras a los días 0 (tiempo inicial), 5, 9, 14 y 19. Las muestras se congelaron en N₂ líquido, se molieron con un molino (IKA, A11 Basic 230V, China), se distribuyeron en tubos de centrifuga de 50mL previamente cubiertos con papel de aluminio y se conservaron a -60°C hasta la realización de los análisis.

3.2 Proceso de extracción enzimática

3.2.1 CAT, GPX y APX

Se pesaron 2,5 g de muestra material en tubos de centrifuga de de 50 mL a los que se le adicionaron 0,2 g de polivinilpirrolidona (ACROS) e inmediatamente se añadieron 5 mL de buffer de extracción compuesto por tampón fosfato potásico (TPK) 50mM pH 7,8 con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 0,1mM (PM: 442,56; Fluka), L-cisteína 5 mM (PM: 157,61; Sigma-Aldrich), Triton X-100 0,2% (PM: 646,85; ACROS) y 10 µL de fenilmetil sulfonil fluoruro (PM:174,19, Sigma-Aldrich) por cada mL de buffer de extracción.

Se homogeneizó con un dispersor (ULTRATURRAX T-18 basic, IKA, China) manteniendo los tubos en baño de hielo evitando así el calentamiento de la muestra. Tras la homogeneización se limpió el dispersor con 5 mL de buffer de extracción. Entre

una muestra y otra se limpió el dispersor, primero con agua destilada para eliminar los restos de muestra y luego con tampón de extracción frío.

Una vez se tuvieron todas las muestras se centrifugaron a 14.000 rpm a 4°C durante 15 min y una vez centrifugado se filtró el sobrenadante a través de un filtro de nylon, se distribuyó en eppendorf de 1,5mL y se almacenó a -80°C hasta su utilización.

3.2.2 SOD

Para la extracción enzimática de la SOD se empleó el método propuesto por Kang y Saltveit (2001), con ligeras modificaciones. Se pesaron 2,5 g de muestra en tubos Falcon de 50 mL y se le añadieron 5 mL de buffer de extracción Tris-HCL 50 mM pH 7,5 (PM: 157,56; Promega), con MgCl₂ 3 mM (PM: 203,31; IBERLAB) y EDTA 1 mM. Se homogeneizaron con el dispersor y se emplearon otros 5 mL para limpiarlo. Una vez homogeneizado se centrifugó a 25.000g durante 20 min a 4 °C. El sobrenadante se transfirió a tubos limpios protegidos de la luz y se usó para determinar la actividad SOD.

3.2.3 Myr

Para la extracción enzimática de la Myr se homogenizaron 2,5 g de muestra congelada con 10 mL de tampón fosfato sódico (TPNa) 100 mM pH 6,5. Se pasaron las muestras por el dispersor y una vez homogeneizados se repartieron en tubos eppendorf de 1,5 mL y se centrifugaron a 15000 g durante 20 min a 4°C. El sobrenadante se empleó como extracto enzimático.

3.3 MEDIDA DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA

3.3.1 Medida de la actividad APX

Se prepararon 50 mL de buffer de reacción TPK 50mM pH 7,0 con EDTA 0,1mM, ascorbato 0,5 mM (PM: 176,12; Sigma-Aldrich) y H₂O₂ 1,54mM (33% v/v; Panreac).

En una placa de 96 pocillos se añadieron 15,8 µL de extracto enzimático en el fondo de cada pocillo (cada muestra por duplicado) a los que se le añadieron, mediante el uso de

una pipeta multicanal, 30 μL del buffer de reacción. Se preparó un blanco con agua miliQ en vez de con extracto enzimático.

Se midió la actividad enzimática a 290nm cada 30 segundos en un espectrofotómetro TECAN-Infinite M200 (Figura 16) hasta que la absorbancia se mantuvo constante. Los cálculos se realizaron teniendo en cuenta el descenso en la absorbancia.



Figura 16. Espectrofotómetro TECAN-InfiniteM200

La actividad enzimática se calculó en unidades de actividad (U) por mL de extracto, siendo una unidad la cantidad de enzima necesaria para transformar 1 μmol de producto por min, por tanto:

$$U/\text{mL} = \mu\text{mol}/\text{min} \times \text{mL}$$

$$U/\text{mL} = [(\Delta\text{Abs}/\text{min})/(\epsilon \times b)] \times \text{DF1}$$

Siendo

$\Delta\text{Abs}/\text{min}$ = m (incremento de la absorbancia en el tiempo);

ϵ = coeficiente de extinción molar en $\text{mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ (valor constante para cada enzima en función del sustrato). En el caso de la APX y para el ácido ascórbico es $2,8\text{mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ (Zhao y Blumwald, 1998)

b = la densidad óptica de la cubeta utilizada

DF1 = factor de dilución correspondiente a el Volumen total/ Volumen del extracto

La actividad enzimática se expresó por unidades de actividad enzimática (UA) por mg de proteína.

3.3.2 Medida de la actividad CAT

Se prepararon 50 mL de buffer de reacción tampón fosfato potásico 50 mM pH 7 con H₂O₂ 10,6mM. En cada pocillo se añadieron 10 µL del extracto enzimático y 290 µL de buffer de reacción y se midió la absorbancia a 240 nm durante 5 min ($\epsilon = 39,58 \text{ mM}^{-1} \text{ xcm}^{-1}$ para la CAT y el H₂O₂). Se tomó el incremento de la absorbancia de la parte lineal. Para determinar la velocidad de reacción de la oxidación no enzimática del H₂O₂ se realizó una medida con sólo el buffer de reacción. La actividad se expresó por UA/mg de proteína de acuerdo con la fórmula usada anteriormente.

3.3.3 Medida de la actividad GPX

Para medir la actividad GPX se siguió el protocolo descrito por Lemoine et al. (2010) con modificaciones. Con esta técnica se determinó la actividad POX por la formación de un cromógeno que tiene absorbancia a una longitud de onda de 470 nm.

Se prepararon 50 mL de buffer de reacción TPK 50 mM pH 7 con H₂O₂ 10 mM y 20 mM de guayacol (PM: 124,14; Merck). En cada pocillo se añadieron 5 µL del extracto enzimático y 195 µL de buffer de reacción y se determinó la absorbancia a 240 nm durante 3 minutos ($\epsilon = 26,6 \text{ mM}^{-1} \text{ xcm}^{-1}$ para la POX y el guayacol).

Se determinó la actividad enzimática tomando el incremento de la absorbancia una vez alcanzado la linealidad. La actividad se expresó en UA/mg de proteína empleando las ecuaciones descritas anteriormente.

3.3.4 Medida de la actividad SOD

La determinación de la actividad SOD se llevó a cabo mediante una técnica indirecta en la que se midió la capacidad de inhibir la reducción fotoquímica del azul nitrotetrazolium (NBT) mediante el método descrito por Dhindsa et al. (1981) con

ligeras modificaciones. Se prepararon 100 mL de un buffer de reacción conteniendo tampón fosfato 50 mM pH 7,8, metionina 13 mM (PM: 149,21; Sigma-Aldrich), NBT 75 μ M (PM: 817,7; Sigma-Aldrich), riboflavina 2 μ M (PM: 376,37, Sigma-Aldrich) y EDTA 0,1 M.

Se prepararon dos placas idénticas y en cada pocillo se colocaron 6 μ L de extracto enzimático a los que se añadieron 351 μ L del mix de reacción. Una de las placas se empleó como control y se mantuvo durante 15 min en oscuridad. La otra placa se colocó bajo dos lámparas de 15 W a una distancia de 30 cm y se mantuvo durante 15 min. Transcurrido ese tiempo se midió la absorbancia a 560 nm.

Las placas no radiadas no produjeron color y se emplearon como control.

Una actividad enzimática se determinó como la cantidad de enzima que inhibió el 50% de la fotorreducción de NBT por mg de proteína empleando las fórmulas:

$$\% \text{inhibición} = [(\Delta \text{Abs control} - \Delta \text{Abs muestra}) \times 100] / \Delta \text{Abs control}$$

$$\text{U/mL} = (\% \text{Inhibición} / 50 \times V_{\text{extracto}}) \times \text{DF}$$

Siendo V_{extracto} el volumen del extracto enzimático utilizado en el ensayo en mL y DF el factor de dilución empleado.

3.3.5 Medida de la actividad Myr

La determinación de la actividad Myr se realizó mediante el método indirecto propuesto por Guo et al. (2011) con algunas modificaciones.

Se prepararon 20mL de una solución 100 mM de tampón TPNa con 1mM de sinigrina (PM: 397,46; Sigma-Aldrich). Este buffer de reacción se mantuvo durante 5 min a 37°C y tras ese tiempo se añadió en un tubo de 15 mL 300 μ L del buffer de reacción y 60 μ L de extracto enzimático. El blanco se realizó añadiendo el buffer de reacción, pero sustituyendo el extracto por agua.

Estos tubos se incubaron durante 15 min a 37 °C, y tras ese tiempo se paró la reacción introduciéndolos en un baño de aceite a 100 °C durante 5 min. Las muestras se

diluyeron en 900 μL de metanol (PM: 32,04; PROLABO) y se midió la concentración de sinigrina a 227 nm.

Para el cálculo de la actividad enzimática se realizó una curva patrón de sinigrina (Figura 17). Una unidad de mirosinasa corresponde a 1 nM de sinigrina transformada por minutos. La actividad se expresa en UA/mg de proteína.

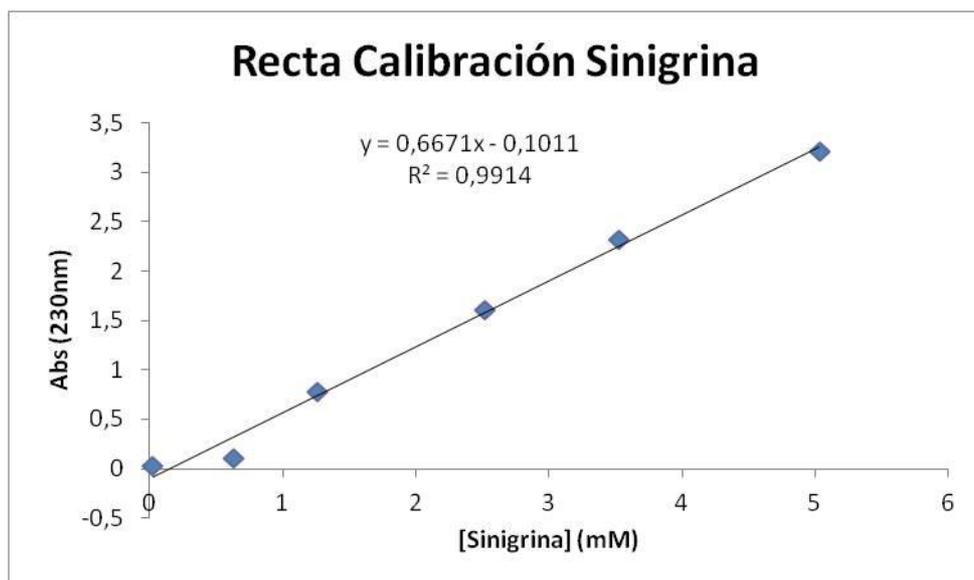


Figura 17. Recta calibración de sinigrina

3.4 Determinación de la concentración de proteína en las muestras

La determinación de la concentración de proteínas en las muestras se realizó mediante el método de Bradford (Bradford ,1976).

En una placa de 96 pocillos se colocaron 5 μL de extracto y se le añadieron 250 μL de reactivo de Bradford (Sigma-Aldrich) y se dejó reaccionar durante 30 min (el tiempo ha de ser superior a 5 min pero nunca sobrepasar los 60 min). Se midió la absorbancia a 595 nm.

Para determinar la concentración de proteína se realizó una curva estándar para cada enzima con albúmina de suero bovino disuelta en el buffer de extracción correspondiente a cada enzima (Figura 18).

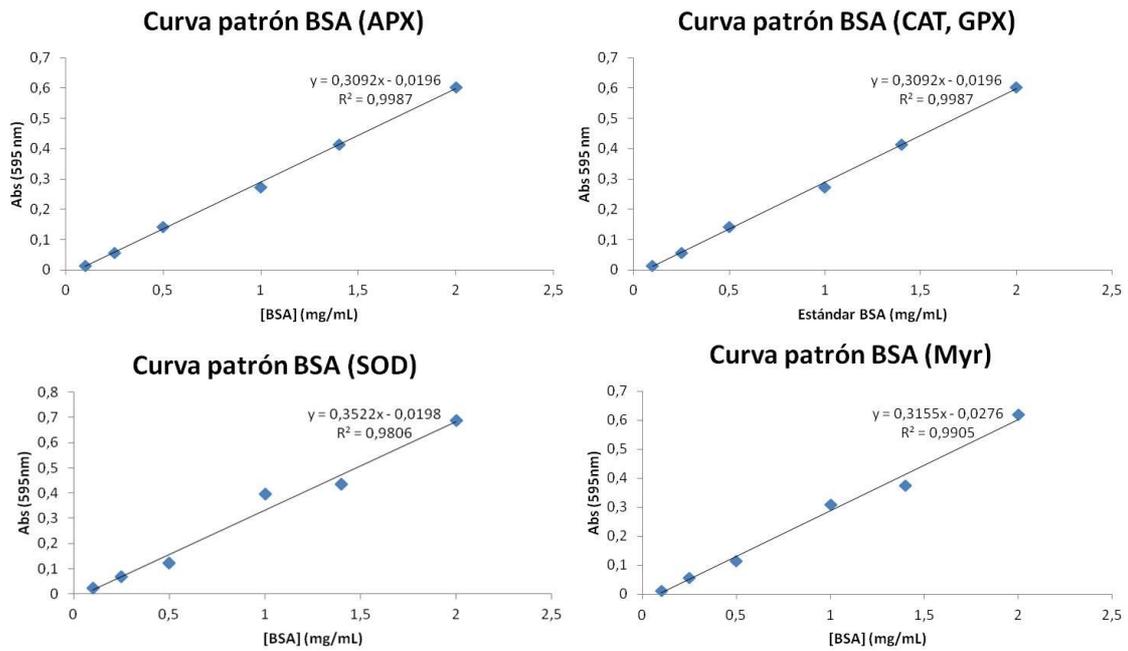


Figura 18. Curvas patrón BSA

3.5 Análisis estadístico.

Los análisis estadísticos se realizaron con el paquete informático STATGRAPHICS (versión 16.1.15). Los datos se analizaron usando un análisis de varianza (ANOVA) y las medias se compararon usando el método de la diferencia mínima significativa (LSD) con un nivel de significación de $p < 0,05$.

Resultados y discusión

4. Resultados y discusión

4.1 Sistema antioxidante

Hasta la fecha, no existen estudios que conozcamos sobre cómo afectan diferentes tratamientos desinfectantes postcosecha al sistema antioxidante en el cv. Bimi y son muy escasos los existentes sobre el brócoli convencional.

En el presente trabajo se analizó la actividad de las enzimas del sistema antioxidante a lo largo de toda la vida comercial de ambos cvs. de brócoli, a partir de muestras tomadas en los días 0, 5, 9, 14 y 19.

4.1.1 APX

De los resultados obtenidos en este trabajo sobre el cv. Bimi, durante los 9 primeros días de conservación no se observaron diferencias significativas entre los dos tratamientos desinfectantes (Figura 19a). A partir del día 14, la actividad APX del producto tratado con NaOCl sufrió una caída hasta valores inferiores a 1 UA/mg de proteína. Esto no es habitual ya que la actividad APX, así como la de las enzimas que intervienen en el estrés oxidativo, tienden a aumentar con el inicio de la senescencia. Por tanto, este descenso pudo deberse a un error de manejo de las muestras durante la extracción o en la medida de la actividad, lo que deberá estudiarse en futuros ensayos.

Tabla 1. Cambios en la actividad APX

	Día procesado	Tras 5 días a 5°C	Tras 9 días a 5°C	Tras 14 días a 5°C	Tras 19 días a 5°C
Bimi (UA/mg proteína)					
Cl	1,425±0,097	1,481±0,475	2,395±0,735	0,675±0,139	0,164±0,097
NEW 100	1,453±0,280	1,462±0,351	1,855±0,213	2,212±0,494	2,160±0,165
Parthenon (UA/mg proteína)					
Cl	1,564±0,038	1,459±0,308	3,615±0,416	2,513±0,416	2,454±0,213
NEW 100	1,669±0,365	2,315±0,334	2,121±0,156	2,850±0,393	3,238±0,284

En el cv. Parthenon (Figura 19b) a tiempo 0 no se observaron diferencias significativas en la actividad APX entre ambos tratamientos desinfectantes, aunque sí sucedieron en los días 5, 9 y 19. En ambos se observó un aumento de la actividad con el tiempo, aunque en las muestras tratadas con NaOCl hubo un máximo que tras el día 14 se estabilizó. Este aumento de la actividad APX con el tiempo concuerda con los

resultados de Lemoine et al. (2010) donde sometieron brócoli a un tratamiento de luz UV-C y observaron que la actividad APX era mayor en el tratado que en el testigo.

La APX, junto con la GPX son las principales enzimas responsables de la eliminación de H_2O_2 en la célula. La APX es una enzima del sistema antioxidante de las plantas que cataliza la reducción del H_2O_2 mediante la oxidación del ascorbato. Su actividad está asociada al estrés oxidativo así como a la senescencia, ya que durante esta se disparan los niveles de APX, lo que contribuye a la integridad celular (Lemoine et al. 2010).

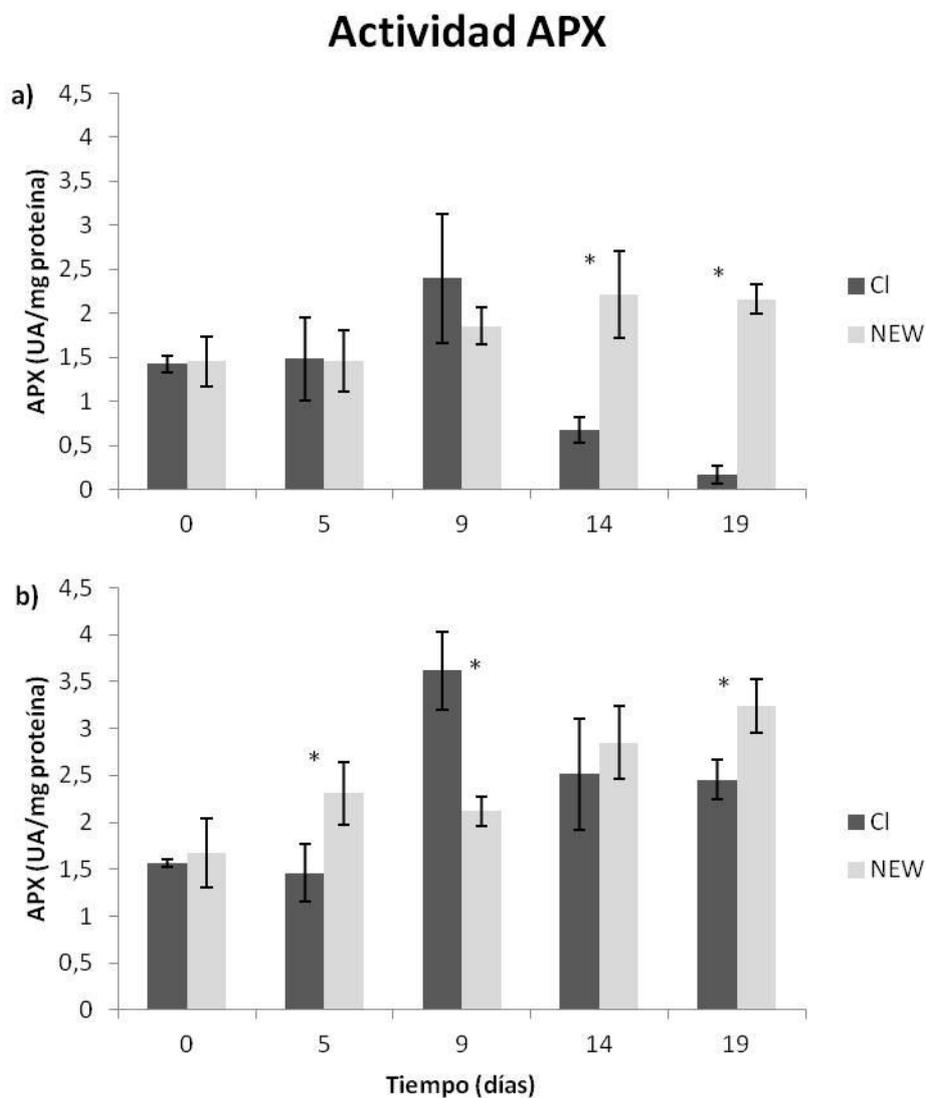


Figura 19. Evolución de la actividad APX durante la vida comercial del brócoli a) Bimi y b) Parthenon tratados con NaOCl (Cl) y NEW.

* Significa que hubieron diferencias significativas respecto al control a) $LSD_{0.05}=0.62$; b) $LSD_{0.05}=0.58$.

4.1.2 CAT

En el cv. Bimi no se observaron diferencias significativas en la actividad CAT entre los dos tratamientos desinfectantes a lo largo de la vida comercial (Figura 20a) y que en ambos casos hubo un ligero descenso gradual. En el producto tratado con NaOCl se observó que la máxima actividad CAT ocurrió justo después del procesado, momento a partir del cual disminuyó, llegando a valores mínimos el día 14. El brócoli tratado con NEW presentó la máxima actividad CAT el día 5 disminuyendo hasta un mínimo en el día 19.

Durante la vida comercial del cv. Parthenon (Figura 20b), no se observaron diferencias significativas en la actividad CAT entre ambos tratamientos desinfectantes salvo en el día 9 donde la del producto tratado NaOCl registró los valores mínimos. A partir de ese momento aumentó hasta el final de la vida comercial. En el NEW el máximo aumento de la actividad CAT se observó el día 5, momento a partir del cual disminuyó.

Por tanto, la actividad CAT mostró una ligera disminución en el Bimi, mientras se mantuvo prácticamente estable en el cv. Parthenon.

Estos resultados difieren en parte de los encontrados en la bibliografía donde en la mayoría de casos la actividad CAT aumenta con el tiempo de vida comercial. Starzyńska et al. (2003) estudiaron la evolución de las enzimas del sistema antioxidante en brócoli convencional y comprobaron que a 5°C la actividad CAT aumentó a partir del día 10 de almacenamiento. Por su parte, Tomás-Callejas et al. (2011) demostraron en hojas de Mizuna MPF tratada con NEW 100 ppm que la actividad CAT aumentaba considerablemente tras cuatro días. Por el contrario, Sala y Lafuente (2004), reportaron un descenso en la actividad CAT en naranja Navelina almacenada 21 días a 22°C, atribuible a que existía un equilibrio entre las enzimas del sistema antioxidante en la respuesta al estrés oxidativo.

Tabla 2. Cambios en la actividad CAT

	Día procesado	Tras 5 días a 5°C	Tras 9 días a 5°C	Tras 14 días a 5°C	Tras 19 días a 5°C
Bimi (UA/mg proteína)					
CI	1,204±0,349	0,887±0,041	0,553±0,094	0,519±0,024	0,811±0,434
NEW 100	1,103±0,495	1,151±0,191	0,765±0,142	0,754±0,254	0,616±0,161
Parthenon (UA/mg proteína)					
CI	1,374±0,265	1,071±0,466	0,772±0,116	1,316±0,433	1,281±0,474
NEW 100	1,370±0,058	1,739±0,367	1,152±0,183	1,297±0,159	1,338±0,164

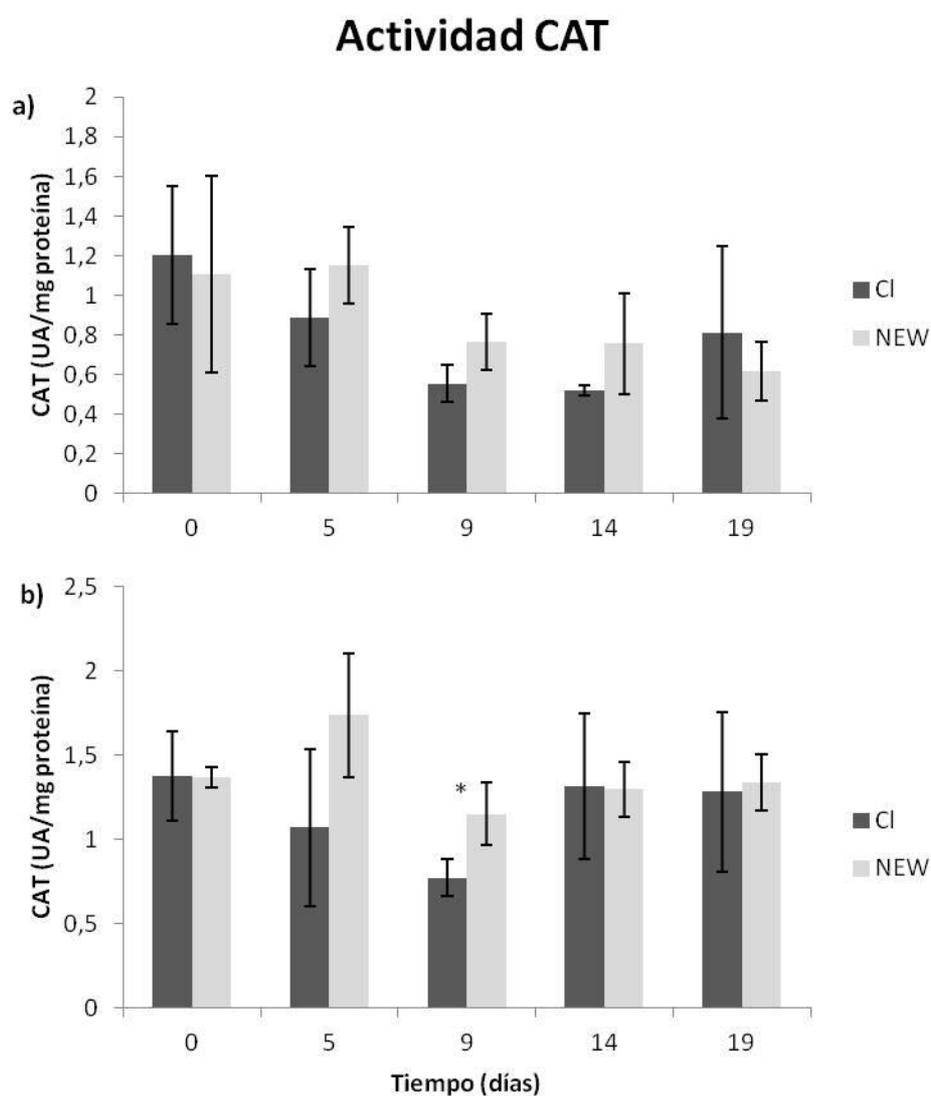


Figura 20. Evolución de la actividad CAT durante la vida comercial del brócoli a) Bimi y b) Parthenon tratados con NaOCl (CI) y NEW.

* Significa que hubieron diferencias significativas respecto al control a) $LSD_{0,05}=0.46$; b) $LSD_{0,05}=0.52$.

4.1.3 GPX

La GPX representa la actividad peroxidasa de las plantas frente al estrés oxidativo (Noreen y Ashraf, 2009). Según los resultados obtenidos, se observó una gran diferencia en la actividad GPX entre los tratamientos desinfectantes aplicados al cv. Bimi (Figura 21a). El producto tratado con NaOCl mostró un aumento tras aplicar el tratamiento y disminuyó tras 5 días de almacenamiento a 5°C. A partir del noveno día la actividad GPX aumentó gradualmente hasta el final de la vida comercial donde se registraron los valores más elevados. Sin embargo, la evolución de la actividad GPX en el producto tratado con NEW presento unos valores de actividad GPX mucho más elevados que el tratado con NaOCl tras el procesado del producto y se elevaron hasta unos máximos tras 5 días de almacenado. La actividad cayó significativamente el día 9 de almacenamiento momento a partir del cual mostró un aumento hasta el final de la vida comercial.

En la figura 21b se observa la evolución de la actividad GPX en el cv. Parthenon. Se vio que no presentaba diferencias significativas a lo largo del tiempo entre el producto tratado con NaOCl y con NEW, salvo el día 14 donde la actividad del tratado con NEW sufrió un aumento de alrededor de 5 UA/mg de proteína aunque tras esto se estabilizó. Los datos obtenidos para el cv. Parthenon tratado con NaOCl presentaron una evolución similar para el cv. Bimi con el mismo tratamiento donde tras el procesado la actividad aumentó sufriendo un descenso hasta el quinto día de almacenamiento y aumentando a partir de este momento. Sin embargo, el producto tratado con NEW mostró una mayor actividad GPX tras el procesado y, al contrario que en Bimi tratado con NEW, la actividad descendió tras 5 días de almacenamiento, momento a partir del cual la actividad fue en aumento.

A la vista de los resultados obtenidos (Tabla 3) se deduce que el tratamiento con NEW afectó de manera diferente al brócoli Bimi que al Parthenon. Ello puede deberse a que, al efecto de la matriz vegetal, lo que no está estudiado hasta donde conocemos.

Tabla 3. Evolución de la Actividad GPX

	Día procesado	Tras 5 días a 5°C	Tras 9 días a 5°C	Tras 14 días a 5°C	Tras 19 días a 5°C
Bimi (UA/mg proteína)					
CI	7,125±1,301	4,114±0,781	5,688±0,427	8,788±1,634	11,934±0,300
NEW 100	12,734±0,904	15,428±1,068	7,739±0,142	10,132±0,961	15,671±1,443
Parthenon (UA/mg proteína)					
CI	13,377±2,810	5,272±1,374	9,741±3,373	11,264±2,445	18,891±3,338
NEW 100	13,909±2,581	10,142±4,525	13,756±0,497	19,037±1,819	17,307±2,218

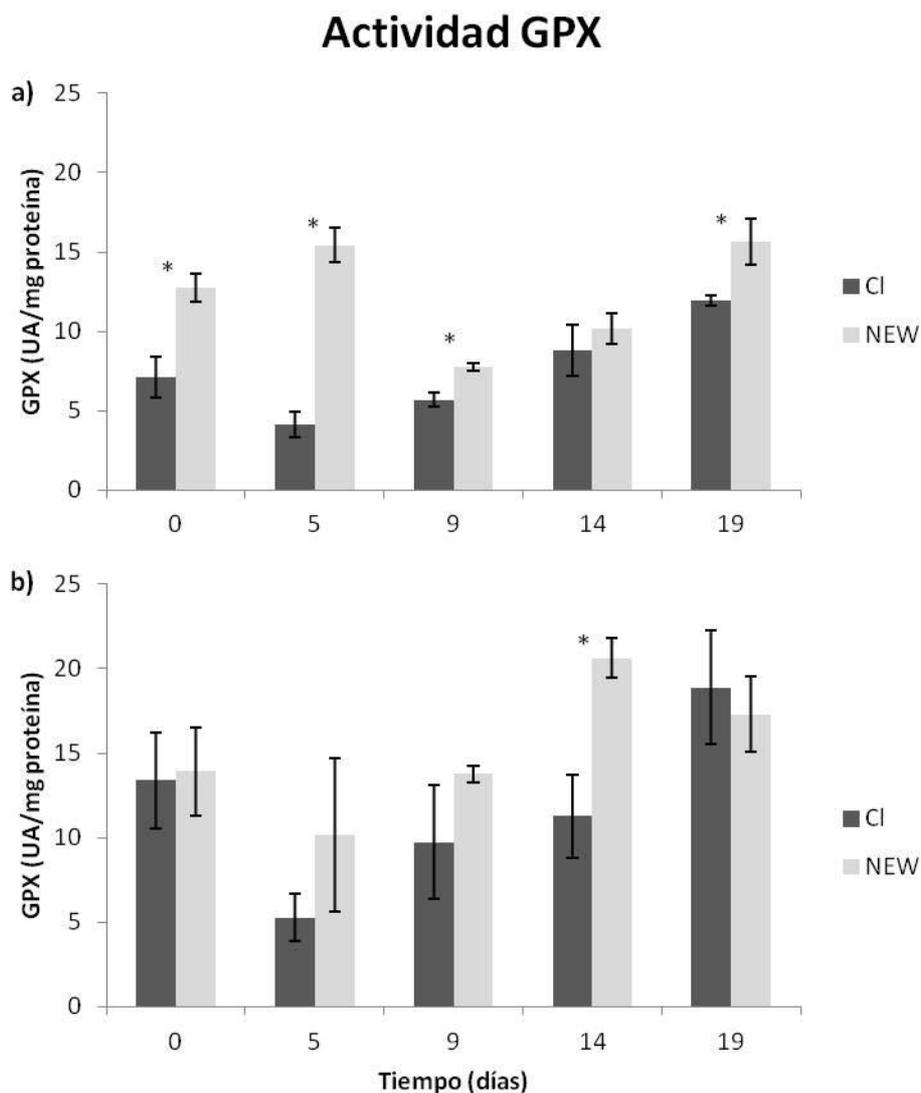


Figura 21. Evolución de la actividad GPX durante la vida comercial del brócoli a) Bimi y b) Parthenon tratados con NaOCl (Cl) y NEW.

* Significa que hubieron diferencias significativas respecto al control a) $LSD_{0,05}=1.73$; b) $LSD_{0,05}=4.63$.

Los resultados obtenidos para el cv. Parthenon y el Bimi tratados con NaOCl no concuerdan con todos los de la bibliografía, ya que la mayoría de estos muestran un aumento de la actividad GPX con el tiempo tras el procesamiento del producto con diversos

tratamientos que no incluyen el NEW: Lemoine et al. (2010) en brócoli convencional bajo UV-C, Tareen et al. (2012) en melocotón con ácido salicílico, o Jiang et al. (2010) en champiñón bajo UV-C. Sin embargo, Yahia et al. (2007) mostraron que tras la aplicación de un tratamiento térmico a tomates, la actividad POX disminuyó a los 10 días, momento a partir del cual comenzó a aumentar.

4.1.4 SOD

Los resultados obtenidos en el cv. Bimi (Figura 22a) mostraron diferencias significativas a lo largo de casi toda la vida comercial del producto, entre las muestras tratadas con NaOCl y con NEW, siendo mayor en éste. No obstante, se mantuvo en niveles estables sin diferencias significativas durante la vida comercial.

En el cv. Parthenon se observó que inmediatamente tras el procesado, los niveles de SOD fueron mayores en el producto tratado con NaOCl que en el tratado con NEW, aunque a los 5 días hubo un pequeño descenso significativo de la actividad. Los niveles de SOD también se mantuvieron estables en este cv. sin que se produjeran diferencias a lo largo del tratamiento salvo en el citado día 5 (Figura 22b).

La SOD es la responsable de la dismutación del O_2^- en H_2O_2 y O_2 . Se trata de la primera línea de defensa frente al estrés oxidativo es previsible un aumento de la actividad tras el procesado, ya que se produce un daño celular importante. Existen estudios que demuestran que un aumento en la actividad SOD aumenta la tolerancia a diferentes factores de estrés (Lee et al. 2001). Sin embargo, en este caso, los niveles de SOD se mantienen estables, lo que induce a pensar que estos tratamientos no afectan de forma considerable al estrés oxidativo, al contrario de lo que sucede con otros tratamientos como la luz UV donde la actividad se ve considerablemente aumentada frente al testigo (Lemoine et al. 2010).

Tabla 4. Evolución de la actividad SOD

	Día procesado	Tras 5 días a 5°C	Tras 9 días a 5°C	Tras 14 días a 5°C	Tras 19 días a 5°C
Bimi (UA/mg proteína)					
Cl	2,051±0,111	2,181±0,248	2,332±0,249	2,494±0,031	2,429±0,022
NEW 100	2,816±0,127	2,970±0,023	2,835±0,125	2,759±0,059	2,656±0,177
Parthenon (UA/mg proteína)					
Cl	2,224±0,165	1,462±0,161	1,917±0,036	1,695±0,046	1,523±0,245
NEW 100	1,880±0,060	1,792±0,227	1,792±0,225	1,999±0,123	1,876±0,200

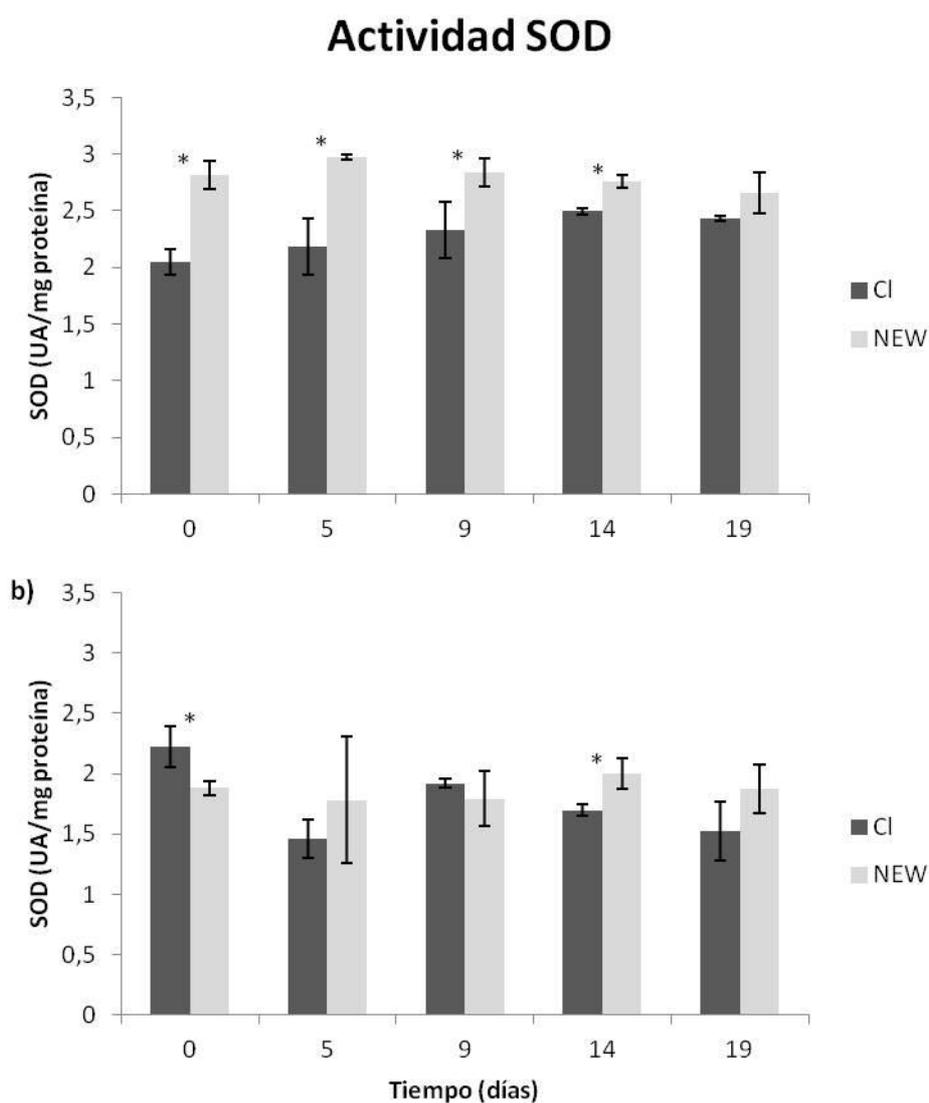


Figura 22. Evolución de la actividad SOD durante la vida comercial del brócoli a) Bimi® y b) Parthenon tratados con NaOCl (CI) y NEW.

*** Significa que hubieron diferencias significativas respecto al control a) $LSD_{0,05}=0.24$; b) $LSD_{0,05}=0.28$.**

4.2 Actividad mirosinasa

La Figura 23a recoge la evolución de la actividad Myr durante la vida comercial del brócoli Bimi MPF. En el producto tratado con NaOCl, esta actividad aumentó tras 5 días de almacenamiento, momento a partir del cual comenzó a disminuir, hasta alcanzar su nivel mínimo tras 14 días a 5°C (Tabla 5). Sin embargo, las muestras tratadas con NEW mantuvieron los niveles de actividad Myr estables durante toda la vida comercial, sin diferencias significativas.

Tabla 5. Evolución de la actividad Myr

	Día procesado	Tras 5 días a 5°C	Tras 9 días a 5°C	Tras 14 días a 5°C	Tras 19 días a 5°C
Bimi (UA/mg proteína)					
CI	16,464±1,846	17,998±2,315	13,708±0,894	9,525±0,400	12,365±2,312
NEW 100	10,546±0,745	11,733±0,975	11,027±0,914	11,489±1,007	10,541±1,352
Parthenon (UA/mg proteína)					
CI	10,771±1,948	10,807±1,546	7,207±0,188	4,187±0,333	9,990±0,951
NEW 100	15,697±1,622	9,987±0,722	5,487±1,917	8,270±1,554	7,683±1,510

En el cv. Parthenon se produjo en ambos casos un descenso de la actividad a partir del día 5 llegando a casi hasta la mitad el día 14 en el tratado con NaOCl y el día 9 en el tratado con NEW.

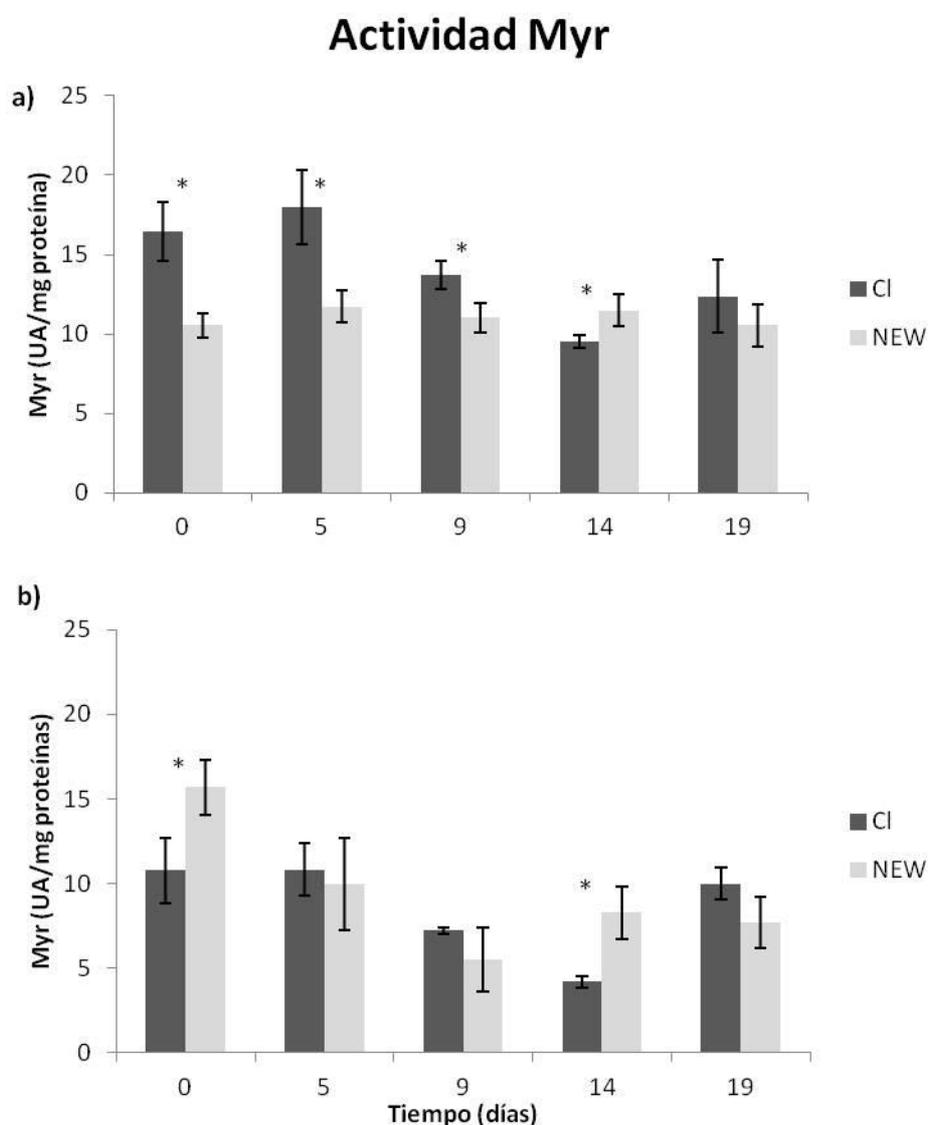


Figura 23. Evolución de la actividad Myr durante la vida comercial del brócoli a) Bimi y b) Parthenon tratados con NaOCl (CI) y NEW.

* Significa que hubieron diferencias significativas respecto al control a) $LSD_{0.05}=2.42$; b) $LSD_{0.05}=2.33$.

De los resultados obtenidos se deduce que la actividad Myr fue algo superior en el brócoli Bimi que en el Parthenon. Ello puede significar que el Bimi sufrió un menor daño celular que el Parthenon como consecuencia de los tratamientos poscosecha, al margen del desinfectante utilizado.

Diversos estudios han determinado cómo afectan las técnicas poscosecha y de elaboración a la concentración de glucosinolatos en brócoli (Song y Thornalley 2007; Jones et al. 2006; Martínez-Hernández et al., 2012). Sin embargo, los efectos que tienen los tratamientos postrecolección sobre la actividad Myr no se han estudiado en profundidad y, hasta donde conocemos, no hay datos en la bibliografía sobre la evolución de esta actividad tras la aplicación al brócoli de desinfectantes.

Yábar et al. (2011), demostraron en un trabajo realizado con tres variedades de maca (una brassicácea cultivado en Perú) que la actividad Myr sufría un descenso asociado a la pérdida de agua. Además, a pesar de la alta estabilidad de la Myr, ésta se ve afectada por el procesado, llegando a sufrir una inactivación parcial o total. Por tanto, la pérdida de actividad que se observó en nuestras muestras podría deberse a una deshidratación parcial durante la vida comercial del brócoli.

Conclusiones

5. Conclusiones

Hasta ahora no existían estudios sobre cómo afectan diferentes tratamientos desinfectantes poscosecha al sistema antioxidante enzimático en el brócoli híbrido Bimi y son muy escasos los existentes sobre el brócoli convencional.

El NEW a 100 ppm Cl^- comparado con el NaOCl (a 100 ppm Cl^-) mostró una tendencia a inducir un mayor estrés oxidativo tras el procesado tanto del brócoli convencional como del híbrido. Ello se manifestó en una mayor actividad APX en el cv. Parthenon, un aumento gradual de la GPX en ambos cvs. y una mayor actividad de la SOD en el híbrido Bimi.

La actividad CAT mostró una ligera disminución en el brócoli Bimi, mientras se mantuvo prácticamente estable en el cv. Parthenon, resultado que difiere del previamente reportado en brócoli convencional tratado con radiación UV-C, en el que se produjo un aumento.

La actividad Myr fue algo superior en el brócoli Bimi que en el Parthenon, sin que existieran diferencias entre ambos tratamientos desinfectantes. Hasta donde conocemos por primera vez se aportan datos sobre la evolución de esta actividad tras la aplicación al brócoli de desinfectantes.

La matriz vegetal puede tener algún efecto sobre el sistema antioxidante, como se ha apreciado prácticamente en el comportamiento diferencial de ambos cvs. respecto de las diferentes actividades enzimáticas analizadas, lo que no ha sido estudiado hasta ahora.

Por tanto, como principal conclusión, aunque el NEW indujo un mayor estrés oxidativo que el NaOCl, al ser no significativas las diferencias o de escasa entidad, se considera que no afecta negativamente la actividad enzimática del brócoli MPF. Ello, unido a que se ha demostrado el poder desinfectante del NEW, se le puede considerar una alternativa viable al tratamiento tradicional con NaOCl, comúnmente utilizado por la industria del brócoli MPF.

Finalmente se considera necesario realizar más estudios para profundizar en estos conocimientos y confirmar o no los resultados aquí obtenidos.

Bibliografía

6. Bibliografía

- Allende, A., Aguayo, E. and Artés, F. 2004. Microbial and sensory quality of commercial fresh processed red lettuce throughout the production chain and shelf life. *Inter. J. Food Microbiol.* 91:2. 109-117.
- Alscher, R. G. 2002. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *J. Experim. Botany* 53 (372): 1331–1341.
- Artés, F. and Allende, A. 2005. Processing lines and alternative preservation techniques to prolong the shelf life of minimally fresh processed leafy vegetables. *Eur. J. Hortic. Sci.* 70 (5) 231-245.
- Artés, F., Gómez, P., Aguayo, E., Escalona, V., Artés-Hernández, F. 2009. Sustainable sanitation techniques for keeping quality and safety of fresh-cut plant commodities. *Postharvest Biol Technol.* 51: 287–296.
- Artés, F., Aguayo, E., Gómez, P. y Artés-Hernández, F. 2009. Productos vegetales mínimamente procesados o de la cuarta gama. *Revista Horticultura, Extra Poscosecha.*
- Björkman M, Klingen I, Birch AN, Bones AM, Bruce TJ, Johansen TJ, Meadow R, Mølmann J, Seljåsen R, Smart LE, Stewart D. 2011. Phytochemicals of Brassicaceae in plant protection and human health--influences of climate, environment and agronomic practice. *Phytochemistry* 72 (7): 538–56.
- Bones, A.M. y Rossiter, J.T. 2006. The Myrosinase-glucosinolate System, Its Organisation and Biochemistry. *Physiol. Plant.* 97 (1): 194–208.
- Bradford, M M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Cartea, M.E. and Velasco, P. 2008. Glucosinolates in brassica foods: bioavailability in food and significance for human health. *Phytochem. Rev.* 7 (2): 213–229.
- Chen, S. y Andreasson, E. 2001. update on glucosinolate metabolism and transport. *Plant Physiol* 39: 743–758.
- Dąbrowska, G., Kata, A., Goc, A., Szechyńska,-Hebda, M., Dyta, Skrzypek, E. 2007. Characteristics of the plant ascorbate peroxidase family. *Acta Biol. Cracov. Bot.* 49: 7–17.
- Dhindsa, RS, Plumb-Dhindsa, P, and Thorpe, TA. 1981. "Leaf senescence: correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation, and decreased levels of superoxide dismutase and catalase." *J. Exp. Bot.* 32: 93–101.
- Guo, R., Yuan, G., and Wang, Q.. 2011. Effect of sucrose and mannitol on the accumulation of health-promoting compounds and the activity of metabolic enzymes in broccoli sprouts. *Scientia Hort.* 128: 159–165.
- Huang, YR, Hung, YC, Hsu, SY, Huang, YW, Hwang, DF. 2008. Application of electrolyzed water in the food industry. *Food Control* 19 (4) (April): 329–345.
- Jahangir, M, Abdel-Farid, I.B., Kim, H.K., Choi, Y.H. and Verpoorte. R. 2009. Healthy and unhealthy plants: the effect of stress on the metabolism of Brassicaceae. *Environm. Experim.l Botany* 67 (1): 23–33.

- Jiang, T., Jahangir, M.M., Jiang, Z., Lu, X., and Ying, T.. 2010. Influence of UV-C Treatment on antioxidant capacity, antioxidant enzyme activity and texture of postharvest shiitake (*Lentinus edodes*) mushrooms during storage. *Postharvest Biol Technol* 56 (3): 209–215. .
- Jones, RB, Faragher, JD, and Winkler, S. 2006. A review of the influence of postharvest treatments on quality and glucosinolate content in broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) Heads. *Postharvest Biol Technol* 41 (1): 1–8.
- Kang, HM, and Saltveit, ME. 2001. Activity of enzymatic antioxidant defense systems in chilled and heat shocked cucumber seedling radicles. *Physio Plant* 113 (4): 548–556.
- Latté, KP, Appel, KE and Lampen, A. 2011. Health benefits and possible risks of broccoli - An overview. *Food Chem Toxicol.* 49: 3287–3309.
- Lee, DH, Kim, YS, Lee, CB. 2001. The inductive responses of the antioxidant enzymes by salt stress in the rice (*Oryza sativa* L.). *J. Plant Physiol.* 158 (6): 737-745
- Lemoine, M.L., Chaves, A.R, and Martínez, G.A. 2010. Influence of combined hot air and UV-C treatment on the antioxidant system of minimally processed broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*). *Food Sci. Technol.* 43: 1313–1319.
- Martínez-Hernández, G.B., Artés-Hernández, F., Colares-Souza, F., Gómez, P., García-Gómez, P., and Artés, F. 2012. Innovative cooking techniques for improving the overall quality of a kailan-hybrid broccoli. *Food Bioprocess Technol.* En prensa. Doi 10.1007/s11947-012-0871-0
- Miranda-Ham, L, and Castro-Concha, L. 2009 El estrés oxidativo en plantas. In: Benavides-Mendoza (Ed) *Temas modernos de nutrición vegetal.* Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo, A.C. Saltillo, Coah. México
- Ölmez, H., Kretschmar, U. 2009. “Potential Alternative Disinfection Methods for Organic Fresh-cut Industry for Minimizing Water Consumption and Environmental Impact.” *Food Sci Technol.* 42: 686–693.
- Perl-Treves R. and Perl A. 2002. Oxidative stress: an introduction. In: *Oxidative Stress in Plants.* Van Montagu M., Inze D., Taylor and Francis Books Ltd, London and New York.
- Pinto de Castelo-Branco, João Diogo Cristóvão. *Myrosinase Stability in Broccoli (Brassica Oleracea Var . Italica) Influence of Temperature and Water Activity.* Directora: Margarida Gomes Moldão Martins. Tesis doctoral. Universidad Técnica de Lisboa, Instituto Superior de Agronomia, Departamento de Ingeniería de Alimentos, 2010.
- Sala, J.M., Lafuente, M.T. 2004. Antioxidant enzymes activities and rindstaining in ‘Navelina’ oranges as affected by storage relative humidity and ethylene conditioning. *Postharvest Biol Technol* 31 (3): 277–285.
- Scandalios, JG, Guan, L and Polidoros, AN. 1997. Catalases in plants : gene structure , properties , regulation , and expression. In: Scandalios JG, ed. *Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses.* Cold Spring Harbor, New York, USA: Cold Spring Harbor Laboratory, 343–406
- Silveira, A.C, Conesa, A., Aguayo, E. and Artés, F. 2008. Alternative sanitizers to chlorine for use on fresh-cut ‘Galia’ (*Cucumis melo* Var. *Cantalupensis*) melon. *J Food Sci* 73 (9): M405–11.
- Song, L. y Thornalley, PJ. 2007. Effect of storage, processing and cooking on glucosinolate content of Brassica vegetables. *Food Chem Toxicol* 45 (2): 216–24.

- Starzyńska, A, Leja, M, Mareczek, A. 2003. Physiological changes in the antioxidant system of broccoli flower buds senescing during short-term storage, related to temperature and packaging. *Plant Science* 165 (6): 1387–1395.
- Tareen, MJ, Abbasi, NA, Hafiz, IA. 2012. Postharvest application of salicylic acid enhanced antioxidant enzyme activity and maintained quality of peach cv. 'Flordaking' fruit during storage. *Scientia Hort* 142: 221–228.
- Tayefi-Nasrabadi, H., Dehghan, G., Daeihassani, B., Movafegi, A., Samadi, A.. 2011. Some biochemical properties of guaiacol peroxidases as modified by salt stress in leaves of salt-tolerant and salt-sensitive safflower (*Carthamus tinctorius* L.cv.) cultivars. *Afr. J. Biotechnol.* 10 (5): 751–763.
- Tomás-Callejas, A, Martínez-Hernández, G.B., Artés, F and Artés-Herández, F. 2011. Neutral and acidic electrolyzed water as emergent sanitizers for fresh-cut Minuza baby leaves. *Postharvest Biol. Technol.* 59: 298–306.
- Nestle, M. Broccoli sprouts in cancer prevention. 1998 *Amer J Clinical Nutrition* 56 (4): 127–130.
- Yahia, E. Soto-Zamora, M.G. Brecht, J.K. and Gardea. A. 2007. Postharvest hot air treatment effects on the antioxidant system in stored mature-green tomatoes. *Postharvest Biol Technol* 44 (2): 107–115.
- Yábar, E, Pedreschi, R, Chirinos, R, Campos, D. 2011. Glucosinolate content and myrosinase activity evolution in three maca (*Lepidium meyenii* Walp.) ecotypes during preharvest, harvest and postharvest drying. *Food Chem* 127 (4): 1576–1583.
- Zahra, N. and Ashraf, M. 2009. Changes in antioxidant enzymes and some key metabolites in some genetically diverse cultivars of radish (*Raphanus Sativus* L.). *Environm. Experim. Botany* 67 (2): 395–402.
- Zhang, Z, Nakano, K, Maezawa, S. 2009. Comparison of the antioxidant enzymes of broccoli after cold or heat shock treatment at different storage temperatures. *Postharvest Biol. Technol.* 54 (2): 101–105.
- Zhao, S, Blumwald, E. 1998. Changes in oxidation-reduction state and antioxidant enzymes in the root of jack pine seeding during cold acclimation. *Physiol. Plant.* 104: 134–142.