



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA

**APLICACIÓN DE ULTRASONIDO DE POTENCIA, LUZ VISIBLE
Y ULTRAVIOLETA EN HOJAS DE BRÓCOLI (*Brassica oleracea*
var. *itálica*) Y SU EFECTO SOBRE ACTIVIDAD Y
CONCENTRACIÓN DE COMPUESTOS ANTIOXIDANTES**

TESIS DE MAESTRÍA

**QUE PARA OBTENER GRADO DE
MAESTRO EN INGENIERÍA QUÍMICA**

PRESENTA:

Ing. Montserrat González Limón

ASESOR:

M.C. Héctor Ruiz Espinosa

COASESOR:

Dr. Carlos Enrique Ochoa Velasco

BUAP

H. Puebla Z., Enero 2016

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Facultad de Ingeniería Química y al Conacyt por brindarme la oportunidad de continuar con mis estudios de posgrado.

Quiero agradecer de manera especial al M.C. Héctor Ruíz Espinoza por su valioso apoyo para realizar esta tesis bajo su dirección, por su paciencia y enseñanza que guiaron en todo momento el desarrollo de esta investigación. Agradezco también a mi coasesor el Dr. Carlos Enrique Ochoa Velazco por su apoyo, paciencia y contribución para llevar a cabo este trabajo, a la Dra. Edith Corona Jiménez y al Dr. Irving Israel Ruiz López por todas sus sugerencias y aportes a este trabajo.

Y finalmente y no menos importante a mi familia por todo su apoyo incondicional y comprensión en cada momento, pues esto es una nueva experiencia en nuestras vidas.

ABREVIATURAS

ROS Especies reactivas de oxígeno

ATP Adenosín Trifosfat

US Ultrasonido

LV Luz visible

UV Luz ultravioleta

UV-C Luz ultravioleta de onda corta

UV-B Luz ultravioleta de onda media

CFT Compuestos fenólicos totales

CA Capacidad Antioxidante

RL Radicales libres

ÍNDICE

RESUMEN.....	¡Error! Marcador no definido.
INTRODUCCIÓN.....	3
OBJETIVOS GENERAL Y ESPECÍFICOS.....	¡Error! Marcador no definido.
I MARCO TEÓRICO	¡Error! Marcador no definido.
1.1 GENERALIDADES DE ANTIOXIDANTES.....	¡Error! Marcador no definido.
1.1.1 PROCESO DE OXIDACIÓN	6
1.1.2 RADICALES LIBRES Y ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO.....	7
1.1.3 ESTRÉS OXIDATIVO	8
1.2 TIPOS DE ANTIOXIDANTES	8
1.2.1 ANTIOXIDANTES SINTÉTICOS.....	9
1.2.2 ANTIOXIDANTES NATURALES.....	10
1.3 MÉTODOS PARA DETERMINAR LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE.....	16
1.3.1 MÉTODO DPPH	17
1.4 MÉTODOS PARA DETERMINAR COMPUESTOS FENÓLICOS	18
1.5 NUTRACEUTICOS DE LAS PLANTAS	19
1.6 GENERALIDADES DE VERDURAS CRUCÍFERAS.....	19
1.7 GENERALIDADES DEL BRÓCOLI	21
1.8 ESTRUCTURA DEL BRÓCOLI	21
1.9 PRODUCCIÓN DE BRÓCOLI	22
1.10 CONTENIDONUTRIMENTAL.....	23
1.11 ESTRÉS ABIOTICO	25
1.12 TECNOLOGÍAS EMERGENTES	26
1.12.1 GENERALIDADES DEL ULTRASONIDO	27
1.12.2 EFECTOS FÍSICOS DEL ULTRASONIDO	28
1.13 GENERALIDADES DE LUZ ULTRAVIOLETA	31

1.14	GENERALIDADES DE LUZ VISIBLE	32
II	METODOLOGÍA.....	¡Error! Marcador no definido.
2.1	MATERIA VEGETAL	¡Error! Marcador no definido.
2.2	EQUIPO DE ULTRASONIDO	¡Error! Marcador no definido.
2.3	EQUIPO DE LUZ ULTRAVIOLETA Y VISIBLE.....	¡Error! Marcador no definido.
2.4	MÉTODOS	35
	2.4.1EXTRACTOS OBTENIDOS CON TRATAMIENTOS US.....	35
	2.4.2 EXTRACTOS OBTENIDOS CON TRATAMIENTOS DE UV-C Y LV....	¡Error!
	Marcador no definido.	
2.5	DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE	37
2.6	CUANTIFICACIÓN DEL CONTENIDO DE COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES.....	37
2.7	DETERMINACIÓN DE CLOROFILA a Y b.....	38
2.8	REACTIVOS.....	38
III	ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	39
3.1	DISEÑO DEL DISPOSITIVO PARA EL TRATAMIENTO ULTRASÓNICO....	¡Error!
	Marcador no definido.	
	3.1.1 PRUEBAS PRELIMINARES	¡Error! Marcador no definido.
3.2	EFFECTO DEL ULTRASONIDO SOBRE EL CONTENIDO DE COMPUESTOS FENÓLICOS	43
3.3	EFFECTO DEL ULTRASONIDO SOBRE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE	44
3.4	EFFECTO DEL ULTRASONIDO SOBRE LA CONCENTRACIÓN DE CLOROFILA a Y b.....	45
3.5	EFFECTO DE LA LUZ VISIBLE SOBRE EL CONTENIDO DE COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES	47
3.6	EFFECTO DE LA LUZ VISIBLE SOBRE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE.....	48

3.7	EFFECTO DE LA LUZ VISIBLE SOBRE LA CONCENTRACIÓN DE CLOROFILA a Y b	48
3.8	EFFECTO DE UV-C SOBRE COMPUESTOS ANTIOXIDANTES	50
3.9	EFFECTO DE LOS TRATAMIENTOS COMBINADOS LV/US	50
IV	CONCLUSIONES	53
V	BIBLIOGRAFÍA.....	54
VI	APENDICE	57

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Especies reactivas de oxígeno, especies reactivas de nitrógeno y especies no radicales.....	7
Tabla 2. Antioxidantes Sintéticos	9
Tabla 3. Antioxidantes naturales selectos.....	11
Tabla 4. Métodos para determinar actividad antioxidante	16
Tabla 5. Producción de Brócoli en el Estado de Puebla	22
Tabla 6. Composición Nutraceutica del Brócoli	24
Tabla 7. Características Equipo de Ultrasonido.....	34
Tabla 8. Porcentaje de amplitud y tiempo para los tratamientos con US.....	40
Tabla 9. Cuantificación de compuestos fenólicos en hojas de brócoli procesadas con US.....	40
Tabla 10. Cuantificación de compuestos fenólicos en hojas de brócoli procesadas con US.....	42
Tabla 11. Resultados de Absorbancias a 765 nm.....	56
Tabla 12. Resultados de Absorbancias a 517 nm	56

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Estructura de la Clorofila	13
Figura 2. Estructuras químicas de los principales grupos fenólicos.....	14
Figura 3. Reacción del radical DPPH.....	16
Figura 4. Reacción del reactivo de Folin-Ciocalteu	18
Figura 5. Estructura química de los principales compuestos en verduras crucíferas	20
Figura 6. Estructura del Brócoli.....	21
Figura 7. Mapa de las regiones productoras de Brócoli en Puebla	23
Figura 8. Espectro de sonido	27
Figura 9. Cavitación e Implosión Ultrasónica	29
Figura 10. Espectro Electromagnético.....	31
Figura 11. Espectro electromagnético con subdivisiones de la región Ultravioleta.....	32
Figura 12. Dispositivo horizontal para tratamiento ultrasónico de hojas de brócoli.....	39
Figura 13. Dispositivo vertical para tratamiento ultrasónico de hojas de brócoli.....	41
Figura 14. Hoja de brócoli dividida en 2 partes	42
Figura 15. Contenido de CFT en hojas de Brócoli tratadas con US.....	44
Figura 16. CA en hojas de Brócoli tratadas con US.....	45
Figura 17. Contenido de Clorofila a en hojas de Brócoli tratadas con US.....	46
Figura 18. Contenido de Clorofila b en hojas de Brócoli tratadas con US.....	46

Figura 19. Contenido de CFT en hojas de Brócoli tratadas con LV.....	47
Figura 20. CA en hojas de Brócoli tratadas con LV	48
Figura 21. Contenido de Clorofila a en hojas de Brócoli tratadas con LV	49
Figura 22. Contenido de Clorofila b en hojas de Brócoli tratadas con LV	49
Figura 23. Contenido de CFT en hojas de Brócoli tratadas con UV-C.....	50
Figura 24. Contenido de Compuestos antioxidantes en hojas de Brócoli tratadas con LV (90 s) /US (50% y 60 s).	52
Figura 25. Contenido de Compuestos antioxidantes en hojas de Brócoli tratadas con LV (90 s) /US (100% y 30 s).	52
Figura 26. Curva de Calibración para el método F-C	58
Figura 27. Curva de Calibración para el ensayo DPPH	59

RESUMEN

En las últimas décadas, el sector agrícola ha experimentado cambios importantes en materia económica, social y ambiental que a su vez han influido en el desarrollo de diversas industrias, incluyendo la alimentaria, farmacéutica, de perfumería, higiene personal, entre otras. En términos generales, las actividades agrícolas han aumentado en producción y valor económico; sin embargo, con frecuencia el aprovechamiento de la planta no es integral, pues sólo se utilizan aquellas partes comestibles por el ser humano y, por consiguiente, se generan subproductos que son utilizados parcialmente, con frecuencia como alimento o forraje para animales y en ocasiones, simplemente desechados cerca de los campos de cultivo. Recientemente la atención de diversos proyectos de investigación se ha centrado en el desarrollo de estrategias de aprovechamiento de desechos agroindustriales; con frecuencia, las partes no aprovechadas de la planta poseen constituyentes que pueden ser empleados como materia prima de diversos productos o bien como fuente de ciertos compuestos bioactivos de interés. Para Puebla, un caso de particular interés es el brócoli; el estado es uno de los productores más importante de este vegetal, cuyas hojas ricas en antioxidantes son eliminadas en cuanto se separa la inflorescencia (la parte comestible de la planta, la cual representa el 30% del total).

Una de las alternativas exploradas como estrategias de aprovechamiento de compuestos bioactivos en productos de origen vegetal es la aplicación de barreras diversas que funciones como un factor abiótico que potencien la concentración de estas sustancias. Los factores abióticos son estímulos del medio ambiente que influyen en las plantas provocando una alteración en el metabolismo celular; esto implica un estrés y como consecuencia un efecto reversible o irreversible. Recientemente, procesos tradicionales (reducción de concentración de oxígeno, daños mecánicos) y tecnologías emergentes como ultrasonido y luz ultravioleta han sido estudiadas y evaluadas como factores de estrés abiótico para potencializar la concentración de compuestos bioactivos presentes en subproductos o desechos de las plantas. De tal forma, que el objetivo de este proyecto fue utilizar las tecnologías

de ultrasonido, luz ultravioleta de onda corta y luz azul como generadores de estrés abiótico en hojas de brócoli (*Brassica oleracea* var. *itálica*), con la finalidad de evaluar su efecto en la concentración de pigmentos (clorofila a y clorofila b), compuestos fenólicos y su actividad antioxidante. El proyecto se desarrolló en tres etapas: en la primera etapa se diseñó un dispositivo para procesar las hojas de brócoli recién cortadas en medio acuoso con ultrasonido de alta potencia (24 kHz); se emplearon 4 diferentes tiempos de sonicación (30,60,90 y 120 s) a diferentes amplitudes de onda (50, 75, y 100%), se cuantificó la concentración de pigmentos (clorofila a y clorofila b) a través de la prueba de carotenoides, compuestos fenólicos totales por el método Folin-Ciocalteu y la actividad antioxidante se determinó por el ensayo DPPH. En una segunda etapa se realizaron los tratamientos con luz ultravioleta de onda corta y luz azul, con diferentes tiempos de exposición de las hojas (30,60, 90 y 120 s), evaluando la concentración de compuestos que se cuantificaron en la primera etapa. Finalmente, en la tercera etapa se realizó una combinación de tratamientos utilizando para luz azul un tiempo de 90 s y para ultrasonido amplitudes de 50 y 100% con tiempos de 30 y 60 s. Los resultados muestran incrementos en porcentaje de pigmentos (clorofila a y clorofila b), compuestos fenólicos y actividad antioxidante, respecto a las muestras control. De esta manera, las tecnologías de ultrasonido y luz ultravioleta pueden ser consideradas como técnicas promisorias para incrementar la concentración de compuestos bioactivos en hojas de brócoli y permitir su aprovechamiento.

INTRODUCCIÓN

En México, la producción de brócoli genera importantes cantidades de desechos agroindustriales, ya que la parte comestible de la planta es la inflorescencia siendo una tercera parte del total, lo cual deja dos terceras partes como residuos que son utilizados en la alimentación para animales. Sin embargo, estos desechos son fuente de investigación de compuestos fitoquímicos de interés, como antioxidantes, vitaminas y minerales. En el caso específico de Puebla, es uno de los más importantes productores de hortalizas, en la producción del brócoli ocupa la tercera posición a nivel nacional. La planta del brócoli es rica en compuestos bioactivos que influyen en la actividad celular y en mecanismos fisiológicos del ser humano; su consumo está asociado con la reducción en el riesgo de padecer enfermedades crónico-degenerativas, tales como, diabetes mellitus, enfermedades cardiovasculares y cáncer. Estos compuestos bioactivos se clasifican de acuerdo a las funciones de protección biológica que ejercen y a sus características físicas y químicas. Entre estas categorías se encuentran los terpenos (carotenoides), fenoles (flavonoides, antocianinas, catequinas, ácidos gálicos e isoflavinas) y tioles (glucosinolatos e indoles). Recientemente las tecnologías emergentes utilizadas en los procesos de alimentos, incluyendo altas presiones hidrostáticas, campos eléctricos pulsados, pulsos luminosos de alta intensidad, campos magnéticos oscilantes, ultrasonido e irradiación de luz ultravioleta, se han propuesto como nuevos enfoques para potencializar el contenido de compuestos antioxidantes.

La Facultad de Ingeniería Química oferta la licenciatura en Ingeniería Agroindustrial en la zona de Actazingo, área estratégica en la producción de brócoli. En este sentido, este proyecto busca dar una alternativa viable para el aprovechamiento de los desechos agroindustriales del brócoli de esta región. El objetivo de esta investigación es evaluar el contenido de pigmentos (clorofila a y clorofila b), compuestos fenólicos y actividad antioxidante en hojas de brócoli, sometiénolas a estrés abiótico por medio de ultrasonido y luz ultravioleta de onda media.

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar la concentración de compuestos fenólicos, de clorofila a, clorofila b y capacidad antioxidante en hojas de brócoli (*Brassica oleracea* var. *itálica*) sometidas a estrés abiótico por medio de ultrasonido de potencia, luz ultravioleta y visible.

Objetivos Específicos

- ✓ Analizar el contenido de compuestos bioactivos selectos (clorofila a y b, compuestos fenólicos y capacidad antioxidante) en hojas de brócoli.
- ✓ Evaluar los cambios en las concentraciones de compuestos bioactivos y actividad antioxidante sometiendo las hojas de brócoli a estrés abiótico por ultrasonido de potencia.
- ✓ Evaluar los cambios en las concentraciones de compuestos bioactivos y actividad antioxidante sometiendo las hojas de brócoli a estrés abiótico por luz UV-C.
- ✓ Evaluar los cambios en las concentraciones de compuestos bioactivos y actividad antioxidante sometiendo las hojas de brócoli a estrés abiótico por luz visible.

I. MARCO TEÓRICO

1.1 Generalidades de antioxidantes

En los últimos años se han relacionado a las enfermedades crónicas degenerativas como cáncer, enfermedades cardiovasculares (corazón y vasos sanguíneos), osteoporosis, degeneración muscular y diabetes con procesos de oxidación celular (Rao, et al. 1999). La generación de especies reactivas y otros radicales libres (ROS) durante el metabolismo es un proceso necesario y normal que se compensa con un sistema antioxidante endógeno, sin embargo, debido a factores del medio ambiente, estilo de vida (obesidad, inactividad física y dieta poco saludable), situaciones patológicas (factores genéticos y edad) y el exceso de radicales, se pueden acumular dando como resultado el estrés oxidativo (Ash & Catignani, 2010). Investigaciones epidemiológicas mencionan que la ingesta nutricional insuficiente puede jugar un papel importante en desarrollo de dichas enfermedades, por lo que se sugiere la captación de antioxidantes exógenos para interferir benéficamente con el estrés oxidativo (Mangge, et al., 2014). El consumo de frutas y verduras median su efecto benéfico a través de varios mecanismos que incluyen el metabolismo, la modulación inmune y la inducción hormonal; por lo que son considerados antioxidantes que pueden dificultar los procesos oxidativos y de estrés oxidativo (Rao & Rao, 2007).

Los antioxidantes son moléculas químicas que, en bajas concentraciones capaces de inhibir o prevenir la oxidación en otras moléculas (Gülcin, 2012). En términos de alimentos se define como cualquier sustancia que se encuentra presente en bajas concentraciones reaccionando con un sustrato oxidable y como resultado se inhibe la oxidación del sustrato. (John W. Finley, 2011). Algunos reglamentos sobre aditivos alimentarios mencionan que un antioxidante prolonga la vida útil de un alimento, protegiéndolo contra el deterioro inducido por la oxidación, tal es el caso como la rancidez de lípidos y cambios de color. Los antioxidantes no se limitan a un grupo específico de sustancias o mecanismo específico de acción, actualmente su uso se ampliado a enzimas antioxidantes de fijación de hierro y proteínas de transporte y otros compuestos que afectan a la transducción de señales y la

expresión génica (Bartosz, 2014). Desde un enfoque médico, los antioxidantes son considerados como naturales y podrían definirse como las sustancias o compuestos que poseen varios tipos de propiedades antioxidantes y que se producen en los organismos vivos y también pueden formarse en alimentos de origen vegetal post cosecha y en el caso de alimentos de origen animal se pueden formar post mortem (Bartosz, 2014).

1.1.1 Proceso de oxidación

La oxidación de los alimentos es un proceso que causa un deterioro principalmente en lípidos y otros compuestos orgánicos con abundancia de insaturaciones y que es perjudicial ya que afecta la calidad sensorial, la vida útil y el valor nutritivo de los productos; esta oxidación se lleva a cabo por diversas variables como la susceptibilidad y estructura molecular de los lípidos, el estado físico, las reacciones de iniciación, presencia de lípidos oxidados entre otros (Branen, *et al.* 2002).

La oxidación afecta a todos los organismos, plantas, animales y está también se produce naturalmente en el cuerpo humano (exceso o falta de ejercicio, estrés, tabaquismo, obesidad, etc.) que contribuye al desarrollo de enfermedades crónicas, sin embargo, existe evidencia científica sobre el consumo de antioxidantes y las mejoras sobre el estado oxidativo (Díaz-Rubio, *et al.* 2015).

Los antioxidantes comprenden una amplia variedad de compuestos en los alimentos de origen vegetal, que generan un efecto en la salud, se ha informado que (ROS) se incrementan en el corazón provocando enfermedades como la aterosclerosis e insuficiencia cardíaca, la presencia de enzimas antioxidantes disminuye la descompensación en el corazón (Takano, *et al.* 2004).

1.1.2 Radicales libres y especies reactivas del oxígeno

La oxidación es la transferencia de electrones de un átomo a otro; este proceso es esencial en los organismos vivos y en el metabolismo, ya que el oxígeno es el aceptor de electrones el cual produce energía en forma de ATP (adenosín trifosfato). Sin embargo, pueden surgir complicaciones cuando el flujo de electrones se convierte en desacoplado es decir hay electrones desapareados generando radicales libres (Gülcin, 2012). Los procesos oxidativos en los organismos dan lugar a los radicales libres (RL) y otras especies reactivas de oxígeno (ROS) que son moléculas en la que en su estructura atómica presenta un electrón desapareado o impar en el orbital más externo, generando una alta inestabilidad. En la Tabla 1 se muestran las principales especies reactivas reportadas.

Tabla 1. Especies reactivas de oxígeno, especies reactivas de nitrógeno y especies no radicales (Gülcin, 2012).

Radicales		No Radicales	
Superóxido	$O_2^{\bullet -}$	Peróxido de hidrógeno	H_2O_2
Radical hidroxilo	HO^{\bullet}	Oxígeno singulete	1O_2
Radical peroxilo	HO_2^{\bullet}	Ozono	O_3
Radical lipídico	L^{\bullet}	Hidroperóxido lipídico	LOOH
Radical lipídico peroxilo	LOO^{\bullet}	Hipoclorito	HOCL
Radical peroxilo	ROO^{\bullet}	Peroxinitrito	$ONOO^-$
Radical lipídico alcóxido	LO^{\bullet}	Dinitrógeno trióxido	N_2O_3
Dióxido de Nitrógeno	NO_2^{\bullet}	Ácido Nitroso	HNO_2
Óxido nítrico	NO^{\bullet}	Cloruro de nitrilo	NO_2Cl
Catión nitroxilo	NO^+	Anión nitroxilo	NO^-
Radical Tiilo	RS^{\bullet}	Ácido peroxinitroso	ONOOH

Radical Proteico	Óxido nitroso	N ₂ O
------------------	---------------	------------------

1.1.3 Estrés oxidativo.

El estrés oxidativo se entiende como el desequilibrio entre la producción y la manifestación de las (ROS) y la capacidad de un sistema biológico para desintoxicar los intermediarios reactivos o bien para reparar el daño ocasionado; tales especies reactivas u oxidantes se forman como producto normal del metabolismo aeróbico. La concentración de antioxidantes se reduce debido a las enzimas antioxidantes mutadas, toxinas, o la reducción en la ingesta de antioxidantes naturales (Sies, 1997). Es importante tener en cuenta el estrés oxidativo ya que sus implicaciones pueden llegar ser muy amplias y como consecuencia implican alteraciones de la relación estructura-función en cualquier órgano, sistema o grupo celular especializado; por lo tal motivo se reconoce como un mecanismo general de daño celular, que está asociado con la fisiopatología primaria o la evolución de un número creciente de entidades y síndromes de interés de salud pública (Gülcin, 2012).

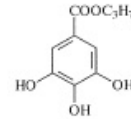
1.2 Tipos de antioxidantes

Los compuestos antioxidantes pueden eliminar los radicales libres y aumentar la vida útil retardando el proceso de oxidación, que es una de las principales razones de deterioro de alimentos durante el procesamiento y almacenamiento de los mismos. En los últimos años, existe un gran interés para la identificación de las fuentes naturales y sintéticas que sean fuentes alternativas seguras de antioxidantes en los alimentos, por ejemplo, que los antioxidantes naturales sean de origen vegetal (Gülcin, 2012).

Los antioxidantes según su procedencia se pueden clasificar como sintéticos y naturales, éstos se detallan a continuación.

en polvo, especias,
dulces y vitaminas

galato de
(PG)



propilo

1.2.2. Antioxidantes Naturales

Los antioxidantes naturales se encuentran en muchos alimentos, principalmente en frutas y verduras, están presentes en pequeñas cantidades y son capaces de prevenir o retardar la oxidación de materiales oxidables como lípidos, proteínas, DNA y carbohidratos (Brewer, 2011). La clasificación inicial de los antioxidantes naturales es en *enzimáticos* (enzimas primarias y secundarias) y *no enzimáticos* (minerales, vitaminas, carotenoides, compuestos Sulfurados, compuestos de bajo peso molecular, cofactores y polifenoles) (Bartosz, 2014).

Recientemente un incremento en el consumo de frutas y verduras en la dieta habitual se le ha relacionado con la protección contra diversas enfermedades (Prior & Cao, 2000).

Estudios epidemiológicos revelan los efectos antioxidantes de los flavonoides y su efecto protector para atenuar los mecanismos inflamatorios que se producen en enfermedades como la aterosclerosis y trombosis; promoviendo una función endotelial normal, es por ello, que se recomienda el consumo alimentos ricos en flavonoides ya que aumenta la capacidad antioxidante del plasma y reduce la actividad plaquetaria (Etherton, *et al.* 2002).

El estrés oxidativo crónico y acumulativo induce modificaciones perjudiciales en los componentes macromoleculares, tales como ADN, lípidos y proteínas; existe evidencia que el consumo de alimentos ricos en antioxidantes reduce las reacciones adversas y toxicidad en personas que padecen procesos cancerígenos (Fuchs-Tarlovsky, 20014).

En el mismo sentido, la hiperglucemia promueve la auto-oxidación de la glucosa para formar en exceso radicales libres, dando como resultado una disfunción

macro y microvascular. El estrés oxidativo juega un papel muy importante en esta fisiopatología, de tal forma que diversas investigaciones demuestran que los antioxidantes pueden tener un efecto benéfico y protector en la enfermedad (Bajaj & Khan, 2012).

En la Tabla 3 se muestran los antioxidantes naturales que generalmente han sido asociados con metabolitos secundarios de las plantas.

Tabla 3. Antioxidantes naturales selectos (Bartosz, 2014) modificada.

Antioxidante	Propiedades
Vitamina C, E, A	Actúan como eliminadores de radicales, quelantes de metales, agentes sinérgicos; son soluble en lípidos: los tocoferoles y tocotrienoles y retinol se encuentran en verduras de hoja verde, nueces, semillas, aceites vegetales, germen de trigo; etc.
Antocianinas	Captadores de radicales; ejemplos son antocianidinas: cianidina, delphinidina, malvinidin, pelarginidin, peonidina, petunidina, sus glicósidos antocianinas; presente en diversos materiales vegetales, especialmente los que poseen los colores rojo-azul.
Glucosinolatos	Son compuestos orgánicos azufrados, las principales fuentes son las plantas de las familias de las crucíferas y son un mecanismo de defensa de las plantas.
Flavonoides	Eficientes eliminadores de radicales, pueden actuar como antioxidantes secundarios; presentarse en diversos materiales de origen vegetal, se encuentran en grandes cantidades en frutas, verduras, hierbas y té
Ácidos fenólicos	Eficientes eliminadores de radicales, pueden actuar como antioxidantes secundarios; ejemplos son clorogénico, cinámico, ferúlico, gálico, elágico, chicórico, rosmarínico, salicílico, cafeico (hidrocinámico); presente en diversos materiales de origen vegetal.

Los antioxidantes más destacados en la dieta son la vitamina C, tocoferoles, carotenoides y flavonoides. Estos antioxidantes se componen de un número de compuestos estructuralmente diferentes, un ejemplo de esto son los más de 600 carotenoides diferentes que se han identificado hasta el momento y cerca de 50 de ellos podrían estar presente en la dieta humana. (Gülcin, 2012).

- El Ácido ascórbico (vitamina C) está considerado como uno de los más poderosos antioxidantes naturales, ya que tiene la propiedad de ser soluble en agua y se encuentra en altas concentraciones en muchos alimentos o plantas. El ácido ascórbico reacciona eliminando a los radicales libres por transferencia de electrones. Diversos estudios han mostrado que las principales fuentes de ácido ascórbico son: las frutas, en especial los cítricos, kiwis, cerezas, melones, y verduras como el tomate, verduras de hoja verde, brócoli, coliflor, coles de Bruselas y la col (Gülcin, 2012).
- Los Tocferoles (Vitamina E) representan a una familia de 8 diferentes isómeros, siendo el α -tocoferol su forma más activa. Su principal función es la protección contra la peroxidación lipídica. En recientes investigaciones se ha demostrado que el α -tocoferol y el ácido ascórbico funcionan juntos en la reacción química. El α -tocoferol se convierte a un radical por la donación de un hidrógeno lábil a un lípido o lípido peroxilo radical. (Bartosz, 2014) La vitamina E se encuentra abundantemente en los aceites vegetales y en los derivados de margarinas, hojas verdes y vegetales.
- Los Carotenoides se encuentran en microorganismos y plantas como zanahoria, tomate, papa, espinacas, col, acelgas entre otras. La forma más común en la que se encuentran los carotenoides son α -caroteno, β -caroteno, β -criptoxantina, luteína, zeaxantina y licopeno. Así mismo estos pueden reaccionar eficazmente con una variedad de radicales libres, incluyendo radicales peroxilo y radicales hidroxilos, así como los radicales de anión superóxido (Bartosz, 2014).

- Las Antocianinas son pigmentos que forman parte del grupo de los flavonoides, son responsables del color rojo, azul y morado en las frutas, estas poseen propiedades antioxidantes, la forma más común es la cianidina (Einbond, *et al.* 2004). Con frecuencia estos pigmentos interactúan con otros fitoquímicos para potenciar los efectos biológicos, de tal forma se consideran como protectores en una gran variedad de enfermedades (Lila 2004).
- Los Glucosinolatos son metabolitos secundarios, en su estructura contiene compuestos nitrogenados y sulfurados, son químicamente estables en condiciones normales, sin embargo, cuando los tejidos vegetales son dañados, se hidrolizan estos compuestos dando lugar a varios productos de degradación, tales como isotiocianatos, nitrilos, tiocianatos, epithionitriles y oxazolidinas (Martinez-Ballesta, *et al.* 2013).
- La clorofila es un pigmento verde que se encuentra en las plantas y algas, este pigmento es responsable del proceso de fotosíntesis (Branen, *et al.* 2002), es decir, las plantas utilizan la energía del sol para convertirla en CO₂ e hidratos de carbono (HC). Este pigmento se clasifica en clorofila a y b, estos dos tipos son encontrados en la naturaleza y ambos absorben principalmente la luz roja y azul reflejando luz verde (Milenkovic, *et al.* 2012) El contenido de clorofila en las hojas de las plantas depende del contenido de nitrógeno foliar (Hunt, *et al.* 2013). La estructura de clorofila a y b se muestra en la Figura 1.

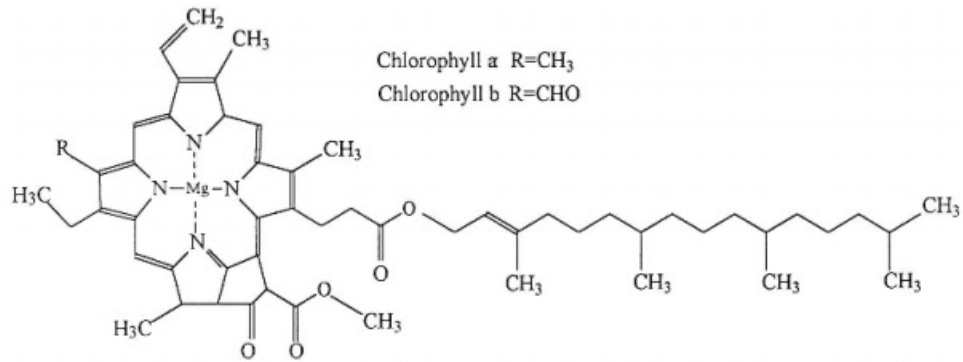


Figura 1 Estructura de la Clorofila (Branen, *et al.* 2002).

- Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios de las plantas que poseen en su estructura química al menos un anillo aromático al que se encuentra unido uno o más grupos Hidroxilo. Se clasifican como flavonoides y no flavonoides. La actividad antioxidante de cada compuesto fenólico puede ser diferente y dependerá de su capacidad de donante-protón (Bartosz, 2014).

A continuación, se muestra en la Figura 2 la clasificación y estructura química de los compuestos fenólicos.

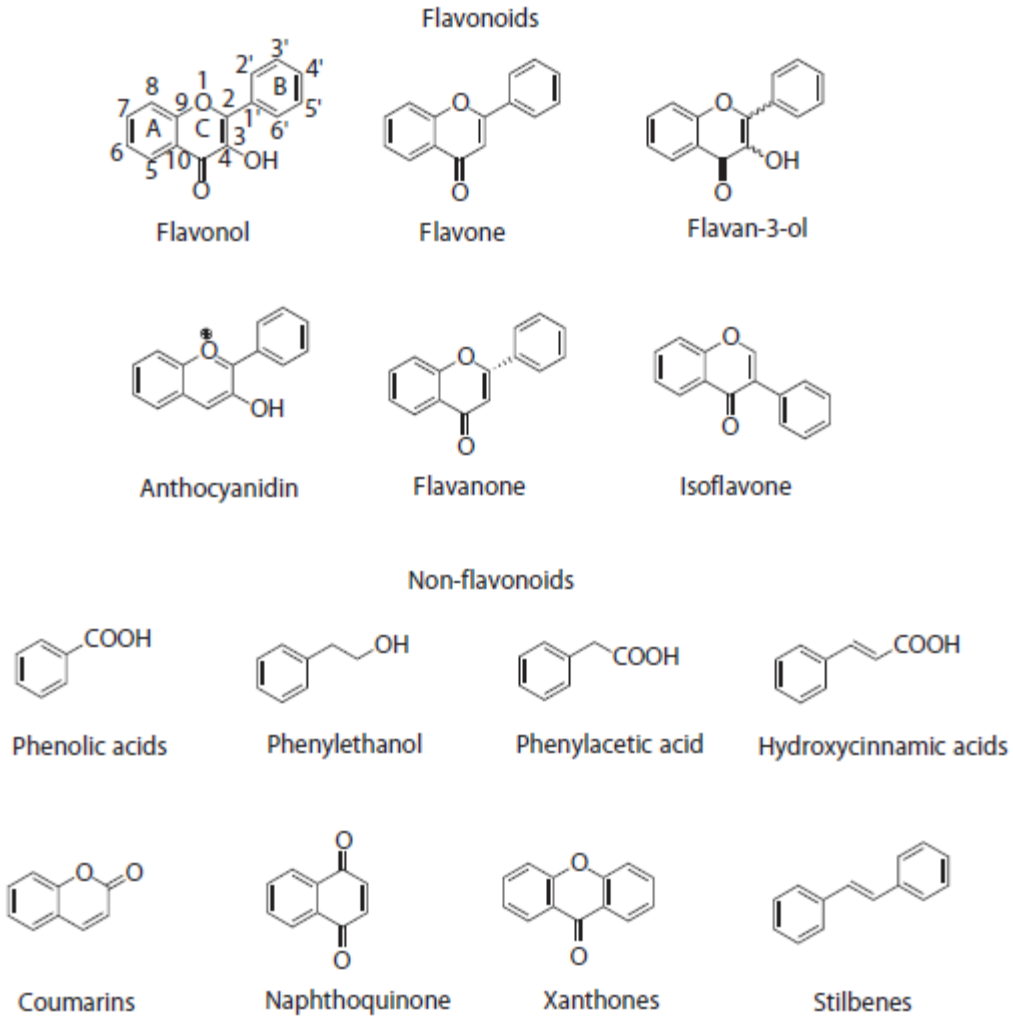


Figura 2. Estructuras químicas de los principales grupos fenólicos (Bartosz, 2014).

La potencia antioxidante de los compuestos fenólicos se relaciona con su estructura química y su reacción de deslocalización de electrones del núcleo aromático. Para los ácidos fenólicos (ácidos hidroxibenzoico, hidroxifenilacéticos y hidroxicinámicos) y sus derivados de éster, la actividad antioxidante depende del número de grupos hidroxilo en la molécula y estos son afectados por el grupo carboxilato de etilo (Zevallos., 2009).

- Los flavonoides se encuentran en las hojas, cortezas, semillas y flores. La antocianina presente en las flores es la responsable de la pigmentación. La estructura molecular de los flavonoides se compone de dos anillos de carbono aromáticos y benzopirano (anillos A y C) y uno de benceno (anillo B). Los flavonoides se pueden clasificar en flavonoles (quercetina), flavonas (luteolina), isoflavonas (genisteína), flavanonas (naringenina), flavanoles (epigallocatequina), y antocianidinas (cianuración) (Bartosz, 2014).

1.3 Métodos para determinar la Capacidad Antioxidante

Existen algunos ensayos que pueden ser utilizados para medir la actividad antioxidante de los componentes en los alimentos. La capacidad antioxidante se define como la proporción de la capacidad antioxidante total y el total de compuestos fenólicos solubles, expresada en μ moles de Trolox (Ácido-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico, derivado soluble en agua del α -tocoferol) equivalentes por μ mol o miligramo de compuestos fenólicos. Su eficiencia radica en neutralizar los radicales libres y corresponderá a la pendiente de una actividad antioxidante contra el contenido fenólico (Zevallos., 2009).

La actividad antioxidante en los alimentos está influenciada por la temperatura, la composición del alimento, la estructura del alimento y la disponibilidad del oxígeno.

En la Tabla 4 se muestran los diversos métodos o ensayos para la determinación de antioxidantes.

Tabla 4. Métodos para determinar Capacidad Antioxidante (Zevallos., 2009).

Tipo	Ensayo	Radical
Peroxidación de lípidos	TBA	Ácido tiobarbitúrico

	MDA/HPLC	Malondialdehído / Cromatografía líquida de alta resolución.
	MDA/GC	Malondialdehído / Cromatografía de Gas
	Ensayo por blanqueo de β - caroteno	
Captación de Radicales	DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
	ABTS	3-etilbenzotiazolina-ácido sulfónico
Reducción de Hierro en el poder antioxidante	FRAP	Fe ^{III} /Fe ^{II} -TPTZ
Capacidad de absorbancia del radical oxígeno.	ORAC	Capacidad de eliminación del radical peroxilo

1.3.1. Método DPPH

El ensayo DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) es una prueba eficaz y sencilla para evaluar la actividad antioxidante en el que se utiliza un espectrofotómetro UV-Visible; para realizar la medición a 517 nm; este ensayo se basa en la captación de radicales libres, es decir, donantes de hidrógeno o electrones, de tal manera que la intensidad de absorción se reduce y la solución de color morado oscuro se decolora a amarillo (Bartosz, 2014).

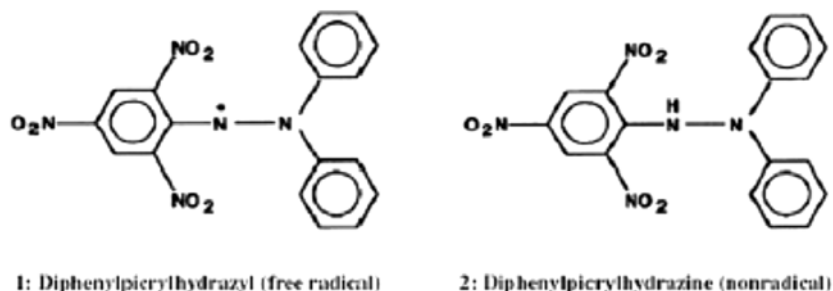


Figura 3. Reacción del radical DPPH (Singh, 2011)

La reacción del radical DPPH se muestra en la Figura 3; otra forma de comprender la reacción es representando al radical DPPH por $Z\bullet$ y la molécula donadora por AH, la reacción primaria es: $Z\bullet + AH = ZH + A\bullet$. Se obtiene que ZH es la forma reducida y $A\bullet$ es el radical libre producido. Este método se emplea para medir la capacidad antioxidante de jugos de frutas y vegetales, así como también se ha utilizado en investigaciones sobre las propiedades de diversos alimentos tal es el caso de granos de trigo y salvado, ácido linoleico, hierbas, aceites de semillas comestibles y harinas empleando diferentes sistemas de solventes incluyendo etanol, acetona, metanol y benceno (Singh, 2011).

1.4 Método para determinar Compuestos Fenólicos totales (CFT)

El ensayo Folin-Ciocalteu (F-C) es un método colorimétrico basado en la transferencia de electrones entre el reactivo F-C y el contenido de compuestos fenólicos totales. Este método se generó con el fin de mejorar el ensayo Folin-Denis (F-D) el cual fue diseñado para determinar la concentración total de proteínas mediante la medición del contenido de tirosina y triptófano. El principio de ambos métodos se basa en la reacción entre el reactivo oxidante y la concentración de tirosina y triptófano, teniendo como resultado la formación de un color azul proporcional a la concentración de proteína. La diferencia entre ambos métodos es la proporción de Molibdeno utilizado para preparar el reactivo (Sánchez Rangel, 2013).

El reactivo F-C es formado por una mezcla de molibdato de sodio, tungsteno de sodio y otros reactivos. La reacción se mide en el espectrofotómetro UV-visible a 765 nm. Este ensayo ha sido utilizado por algunos años por la industria de alimentos y agricultura para determinar el contenido fenólico de plantas. (Everette, 2010).

Durante el ensayo F-C la reacción que se lleva a cabo entre los compuestos fenólicos y el reactivo F-C es a un pH aproximado de 10 que reacciona cuando se le adiciona carbonato de sodio. En estas condiciones básicas la disociación de un

protón fenólico conduce a la formación de un ion fenolato, el cual es capaz de reducir al reactivo F-C. como se muestra en la Figura 4.

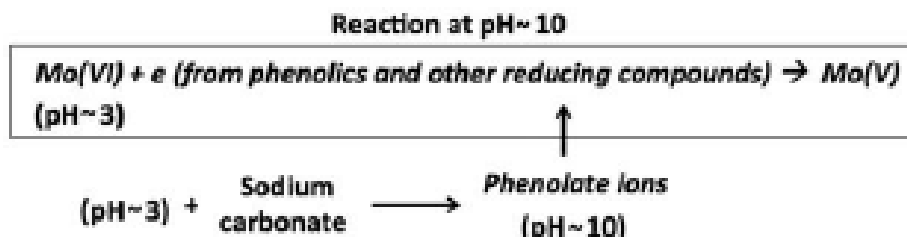


Figura 4. Reacción del reactivo de Folin-Ciocalteu (Sánchez Rangel, 2013).

1.5 Nutraceuticos de las plantas

El término nutraceutico es una combinación de nutrición y farmacéutica, estos son sustancias que pueden considerarse como parte de los alimentos y que proveen un beneficio a la salud en la prevención de enfermedades. Tales sustancias se encuentran como nutrientes aislados, suplementos alimenticios, productos herbales y alimentos que son modificados genéticamente. Algunos nutraceuticos son fibra dietética, ácidos grasos poliinsaturados, proteínas, péptidos, aminoácidos, minerales, vitaminas y antioxidantes. Las plantas no solo proveen nutrientes esenciales necesarios para la vida, sino también componentes bioactivos promotores de salud (Arshad Mehmood Abbasi, 2015).

1.6 Generalidades de Verduras Crucíferas

Las verduras crucíferas son un importante grupo de alimentos que forman parte de la familia de las *Cruciferae* del orden botánico *Capparales*, estas incluyen al género de las *Brassicas*. Pertenecen a este grupo las plantas del brócoli, coles de Bruselas, col china, rábano, wasabi, mostaza blanca, berros y la coliflor (P. Bansal, 2012).

Los componentes nutricionales de las Crucíferas son proteína en un rango de 1.0 a 3.3% en peso fresco, carbohidratos en un rango de 0.3 a 10% de peso fresco,

vitaminas (ácido ascórbico, ácido fólico, tocoferoles y provitamina A) y minerales (hierro, calcio, selenio, cobre, magnesio y zinc), lo que respecta a grasa contiene una cantidad insignificante, menor al 1.00% (Raúl Domínguez-Perales, 2010).

El grupo de las Crucíferas contiene un grupo de compuestos bioactivos que son metabolitos secundarios, estos incluyen compuestos nitrogenados y sulfurados (glucosinolatos y sulfóxido de cisteína S-metilo) compuestos pigmentados biológicamente activos (flavonoides, antocianinas y carotenoides), además plifenoles, cumarinas, enzimas antioxidantes y terpenos. Las estructuras químicas de estos compuestos se representan en la Figura 5. (Shivapriya Manchalli, 2012)

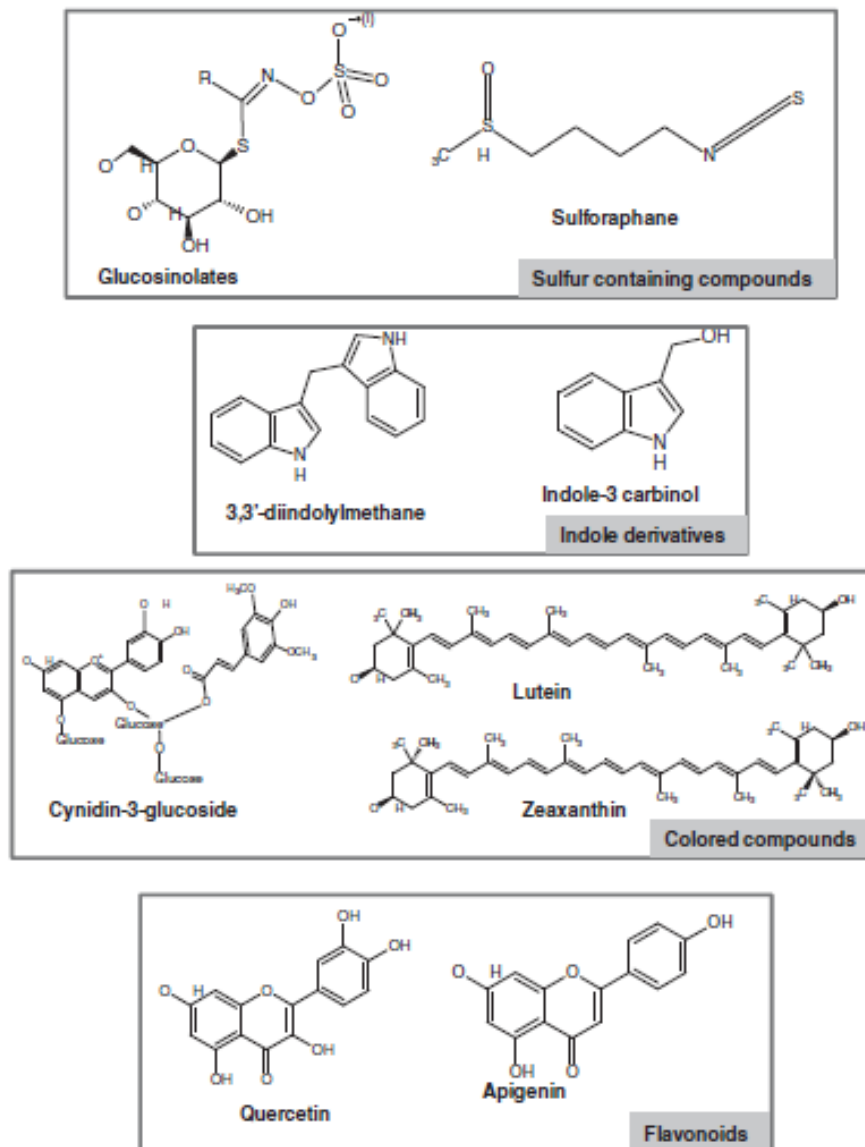


Figura 5. Estructura química de los principales compuestos en verduras crucíferas
(Shivapriya Manchalli, 2012).

1.7 Generalidades del Brócoli

El brócoli pertenece a la familia de las *Brassica Oleracea*, su nombre es una palabra italiana que proviene del latín *brachium* que significa brazo. En Italia el término de brócoli es utilizado para nombrar racimos florales comestibles en plantas brasicas. El origen de los cultivos de brócoli estuvo localizado en la cuenca del Mediterráneo en la costa este, Asia menor, Italia, Libia y Siria. El cultivo de brócoli se asienta en zonas con clima templado. Durante la época romana el intenso intercambio entre numerosos países, permitió esparcir y modificar el material genético del brócoli en diversas regiones. Este proceso evolutivo se observó al buscar la adaptación a diferentes condiciones de suelo y clima; el cultivo y la selección de genotipos ha tenido un mayor interés en la agroeconomía haciendo referencia a la calidad y permitiendo la identificación de los diferentes tipos (Branca, 2008).

El Brócoli (*Brassica oleracea* var. *Itálica*) ha adquirido considerable relevancia en los últimos años como promotor de la salud. Los atributos de esta crucífera son en consecuencia a su elevado contenido de fitoquímicos bioactivos.

1.8 Estructura del Brócoli

Es una planta formada por tallos carnosos y gruesos que emergen de axilas foliares formando inflorescencias y hojas Figura 6. (SAGARPA, 2011)



Figura 6. Estructura del Brócoli.

1.9 Producción de Brócoli

La Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, tiene un registro de la producción agrícola anual de 198 cultivos, donde el brócoli ocupa el lugar 46, siendo un cultivo importante en el sector agroalimentario del año 2014. La producción de brócoli a nivel nacional fue de 445,885.51 toneladas (sumando la cosecha de riego y temporal) siendo Guanajuato el estado líder en su producción, mientras que Puebla ocupa el 3er lugar en este espacio, sin embargo, en el modo de siembra por riego a nivel nacional ocupa el 2do lugar, cabe señal que en este estado solo se realiza la siembra por riego con lo que se obtiene una producción de 26,002.71 toneladas, lo que refleja un valor en producción de 109,802.77 mil pesos. Así mismo en las regiones de Palmar de Bravo-Actazingo-Tecamachalco-Quecholac contribuyen con una cantidad significativa en la producción del estado como se muestra en la Tabla 5. Se puede observar en el mapa (Figura 7) la cercanía de los municipios obteniéndose una producción de 11.767.00 Toneladas en el año 2014 (SIAP, 2015).

Tabla 5. Producción de Brócoli en el Estado de Puebla (SIAP, 2015).

Municipio	Superficie cosechada (Ha)	Producción (Ton)	Rendimiento Ton/Ha
Palmar de Bravo	761.00	4,390.00	9.52
Cuyoaco	280.00	3,641.00	13.00
Libres	300.00	2,680.99	8.94
Los Reyes de Juárez	286.00	2,184.00	10.25
Acatzingo	101.00	1,790.00	18.45
Quecholac	259.00	1,720.00	7.51
Tecamachalco	99.00	1,683.00	17.00

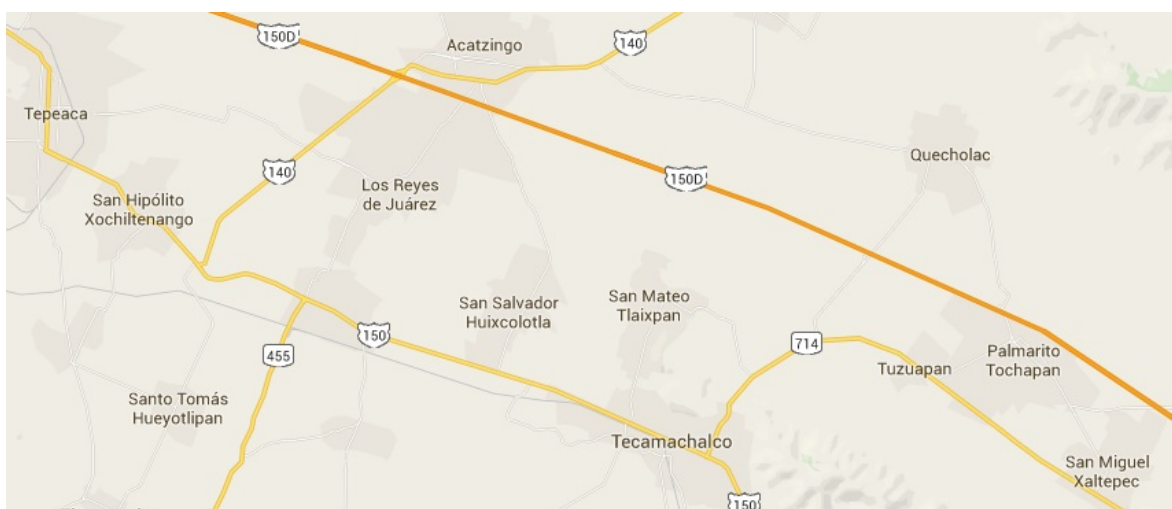


Figura 7. Mapa de las regiones productoras de Brócoli en Puebla.

1.10 Contenido Nutricional

El brócoli es una crucífera que actualmente ha adquirido relevancia en el mundo debido a sus atributos nutraceuticos. Se le considera como un alimento saludable en consecuencia a sus elevados contenidos de fitoquímicos bioactivos como compuestos nitrógeno-sulfurados (glucosinolatos e isotiocianatos), compuestos fenólicos (ácido clorogénico y sinápico y derivados de flavonoides), vitaminas (vitaminas C, E y K), así como minerales esenciales (N, K, Ca, Fe, ente otros) como se observa en la Tabla 7. El consumo del brócoli previene desordenes crónicos degenerativos, tal es el caso de enfermedades cardiovasculares y cancerígenas. (Raúl Domínguez-Perales, 2010).

La producción de compuestos bioactivos en el brócoli está relacionada significativamente con el genotipo de los cultivos, tejido específico de la planta, la fertilización, estación de crecimiento, entre otros factores ambientales (Shivapriya Manchalli, 2012).

Tabla 6. Composición nutraceutica del Brócoli (valor nutricional por cada 100 g de producto fresco).

Componente	Contenido en Hojas de Brócoli	Contenido en Floretes de Brócoli
Agua	90.69 g	90.69 g
Energía	28 kcal	28 kcal
Proteína	2.98 g	2.98 g
Lípidos	0.35 g	0.35 g
Carbohidratos	5.06 g	5.06 g
Fibra dietética	2.3 g	2.3 g
Azucares totales	1.48 g	1.48 g
Vitaminas		
Vitamina A	16001 UI	3000 UI
Vitamina C	93.2 mg	93.3 mg
Tiamina	0.065 mg	0.065 mg
Rivoflavina	0.119 mg	0.119 mg
Niacina	0.638 mg	0.638 mg
Vitamina B6	0.159 mg	0.159 mg
Folato	71 mcg	71 mcg
Minerales		
Calcio	48 mg	48 mg
Hierro	0.88 mg	0.88 mg
Magnesio	25 mg	25 mg
Fosforo	66 mg	66 mg
Potasio	325 mg	325 mg
Sodio	27 mg	27 mg

Zinc	0.4 mg	0.4 mg
Manganeso	0.2 mg	0.2 mg
Selenio	3.0 mcg	3.0 mcg

<http://www.nutritiondata.self.com/facts>

1.11 Estrés abiótico

Las plantas requieren de factores ambientales para su óptimo crecimiento, sin embargo, las desviaciones de estas condiciones ya sea por exceso o por déficit en el entorno fisicoquímico se considera como un estrés abiótico. El efecto de cada factor abiótico en una planta depende de la cantidad e intensidad del mismo. (Hans-Werner Koyro, 2012).

El mecanismo de defensa de las plantas impacta en el aumento de las especies reactivas de oxígeno (ROS) como oxígeno singulete, moléculas de peróxido de hidrógeno, superóxido y radical hidroxilo que se producen en cloroplastos, mitocondrias y peroxisomas obteniendo como resultado un efecto en los compuestos antioxidantes como mecanismo de defensa (Nitin Mantri, 2012).

La exposición de las plantas a ambientes desfavorables, tales como un déficit de agua, cambios extremos de temperatura (calor frío y congelación), falta de oxígeno, contaminación por aire, irradiación y exceso en nutrientes en el suelo dan lugar a un cierto grado de estrés, sin embargo, las plantas se adaptan a estas condiciones resistiendo genéticamente. Las condiciones de estrés abiótico afectan 3 vías implicadas en la biosíntesis de metabolitos secundarios, terpeno, compuestos fenólicos y compuestos nitrogenados (Cisneros-Zevallos, 2003).

Las plantas producen una amplia gama de fitoquímicos complejas en respuesta a diferentes factores de estrés abióticos. Recientemente se han relacionado los factores abióticos con un incremento en compuestos antioxidantes de algunos vegetales poscosecha empleando daño mecánico (lesiones), cambios en temperatura de almacenamiento, choque de calor, aumento en la cantidad de oxígeno y agua y radiaciones entre otros (Koyro, et al. 2012).

Dentro de los factores más relevantes se incluyen los siguientes:

- Radiación UV-C: Se evaluaron los efectos del estrés por radiación UV-C aplicado en zanahorias enteras para inducir la síntesis de compuestos bioactivos y prevenir el decaimiento en frutas y verduras recién cortadas, obteniéndose como resultado un aumento en el contenido de carotinoides después de su almacenamiento (Alegria et al., 2012).
- Lesiones en tejido: Por medio de una herida inducida en productos poscosecha se provoca un aumento en la capacidad antioxidante en calabacín, col blanca y roja, lechuga, rábano, camote y papa. La respuesta de la herida depende del tipo de tejido (Hodges, 2008).
- Lesiones en tejido: La aplicación de estrés abiótico como rebanadas de papas y zanahorias muestran un incremento en el contenido de compuestos fenólicos correspondiente a un aumento de la actividad antioxidante en el tejido. (Zevallos 2003).
- Lesiones en tejido: Se evaluaron los cambios en capacidad antioxidante de compuestos fenólicos, ácido ascórbico, carotenoides totales y antocianinas después de lesionar el tejido (heridas) en calabacín, col blanca, lechuga, apio, zanahoria, rábano, camote y papa; obteniendo un incremento. (Reyes et al. 2007)
- Lesiones y UV C: Se evaluó la aplicación de heridas y luz UV onda corta en bagazo y tejido desmenuzado de zanahoria y uvas respectivamente como una estrategia para aumentar el contenido de compuestos fenólicos (Sánchez 2013).

1.12 TECNOLOGÍAS EMERGENTES

Los tratamientos térmicos en productos alimenticios están asociados con aumentar la vida útil, sin embargo, afectan negativamente en ciertos componentes como reduciendo el contenido de vitaminas y otros nutrientes, así como en la calidad

sensorial haciéndolos menos atractivos en términos de color y propiedades de textura.

Las tecnologías no térmicas son una alternativa viable para obtener productos con una mejor calidad sensorial, nutritiva y microbiológica; entre las que se encuentran el ultrasonido, luz ultravioleta y visible.

1.12.1. Fundamentos del ultrasonido

Recientemente se ha incrementado el consumo de alimentos que aportan un beneficio a la salud para prevenir diferentes tipos de enfermedades. Los métodos más comunes utilizados en el procesamiento de alimentos son los tratamientos térmicos ya que tienen la habilidad de eliminar microorganismos e inactivar enzimas, sin embargo, estos procesos afectan las características físicas y químicas impactando en las propiedades organolépticas y reduciendo la biodisponibilidad de algunos nutrimentos (Villamiel, 2010).

La tecnología del Ultrasonido (US) ha aumentado rápidamente ya que se le considera como una técnica amigable con el medio ambiente. Está basada en el mecanismo de onda de sonido y está determinada por la frecuencia como se muestra en la Figura 8. el infrasonido se refiere a las ondas de frecuencia de sonido por debajo de la detección del oído humano, el rango audible por el ser humano comprende de 20 Hz a aproximadamente 20 kHz. El mundo del ultrasonido se refiere a las ondas de sonido que están por arriba de 20 kHz. El espectro ultrasónico se puede dividir en dos zonas. La primera, potencia ultrasónica se refiere a los rangos de 20 kHz a cerca de 1 MHz y el ultrasonido de diagnóstico con frecuencias superiores a 1 MHz y este es utilizado principalmente para la medicina (Hao Feng, 2011).

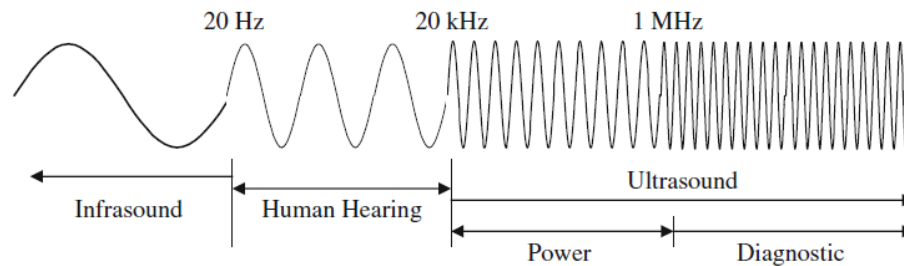


Figura 8. Espectro de sonido (Hao Feng, 2011).

La potencia ultrasónica puede dividirse en dos diferentes rangos de frecuencia:

- Ultrasonido de baja energía (baja potencia, baja intensidad) tiene frecuencias superiores a 100 kHz con intensidades por debajo de 1 W cm^{-2} , esta puede ser utilizada para el análisis no invasivo y el monitoreo de alimentos durante el procesamiento y almacenamiento para asegurar la calidad y sanidad. El ultrasonido de baja intensidad es comúnmente aplicado para obtener información sobre las propiedades fisicoquímicas de los alimentos tales como firmeza, madurez, contenido de azúcar, acidez, etc.
- Ultrasonido de alta potencia (alta potencia, alta intensidad) utiliza intensidades superiores a 1 W cm^{-2} y frecuencias de 20 a 100 kHz, es una técnica destructiva que induce efectos físicos, mecánicos y químicos/bioquímicos en las propiedades de los alimentos para mejorar la calidad. Los efectos mecánicos tienen diversas aplicaciones, tales como la extracción, desgasificación, emulsificación, mejora la cristalización, etc. (T. S. Awad, 2012).

Esta tecnología emergente ha sido utilizada como una alternativa convencional en los procesos y operaciones de alimentos como emulsificación, modificación de propiedades funcionales de diferentes proteínas, inactivación o aceleración de la actividad enzimática, para mejorar la vida de anaquel y la calidad de los alimentos, inactivación microbiana, procesos de congelación y descongelación, secado, concentración y la extracción de compuestos bioactivos (T.S. Awad, 2012).

1.12.2. Efectos físicos del Ultrasonido

El efecto previo indicativo del ultrasonido es la presión de la onda que pasa a través del medio creando regiones de altas y bajas presiones. El tamaño de las variaciones de presión hace referencia a la presión acústica y es directamente proporcional al aumento de energía aplicada en el sistema. Estas presiones tienen dos ciclos, el primero es un esfuerzo tensional que se da en un ciclo negativo y la compresión que se asocia con un ciclo positivo. Como resultado se genera la formación de microburbujas cuyo tamaño aumenta durante la alternancia de estos ciclos. A este proceso de formación de burbujas se le conoce como cavitación (Figura 9).

Las microburbujas que alcanzan un tamaño crítico implosionan o colapsan de manera violenta liberando toda la energía acumulada, ocasionando incrementos instantáneos de temperatura que se disipan en el medio sin elevar sustancialmente la temperatura. Este fenómeno de implosión afecta la estructura de la célula situada en el microentorno generando efectos fisicoquímicos y bioquímicos (Hao Feng, 2011). Con la cavitación las moléculas de agua se pueden dividir para formar radicales libres, que intensifican las reacciones químicas.

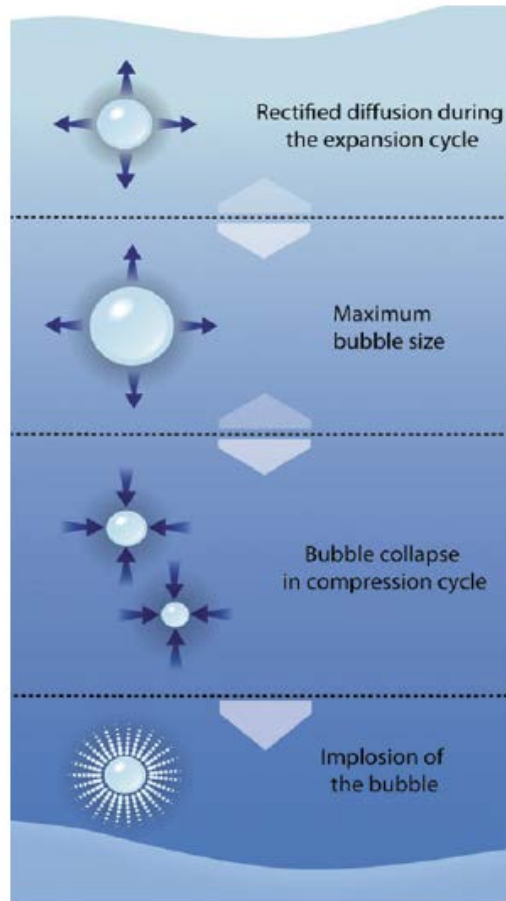


Figura 9. Cavitación e Implosión Ultrasónica (Hao Feng, 2011).

La técnica de ultrasonido de potencia es un coadyuvante de la extracción de diversos compuestos bioactivos y ha sido aplicado a subproductos de frutas y vegetales.

Las siguientes evidencias demuestran los estudios que se han realizado a subproductos agrícolas.

- **Eliminación de Tóxicos:** Productos de desecho obtenidos durante la extracción del aceite soya son utilizados como adsorbentes de bajo costo para la eliminación de tóxicos del tinte textil verde malaquita (Mittal 2004).
- **Biomasa:** Los desechos agrícolas son altamente eficientes, de bajo costo y una fuente de biomasa renovable que pueden ser utilizados para remediación

de metales pesados, la biosorción se está convirtiendo en una alternativa potencial a las tecnologías convencionales de eliminación y recuperación de iones metálicos a partir de soluciones acuosas. (Sud 2007).

- Producción de bioetanol: Los biocombustibles sustituyen a los combustibles derivados del petróleo, estos producen un beneficio ambiental y económico. La producción de bioetanol a partir de biomasa proveniente de desechos agrícolas se encuentra en constante desarrollo (Balat et al., 2009).
- Producción de biohidrógeno: mediante la fermentación a partir de residuos agrarios son una fuente abundante, económica, renovable y biodegradable (Guo et al. 2010).
- Extracción de compuestos fenólicos: Subproductos de frutas y vegetales son estudiados para la determinación del rendimiento de la extracción de compuestos fenólicos y actividad antioxidante para la aplicación en industria alimentaria y cosmética (Peschel et al. 2005).

1.13 Generalidades de Luz ultravioleta

La luz ultravioleta (UV) es definida como parte del espectro electromagnético mostrando longitudes de onda menores a las de la región visible (380-800 nm). En general la onda de luz ultravioleta abarca un rango de 100 a 400 nm, subdividiéndose en onda larga UV-A (315-400 nm), onda media UV-B (280-315 nm) y onda corta UV-C (200-280 nm). En la Figura 11 se muestra el espectro electromagnético completo y en la Figura 11 permite observar las subdivisiones entre los rangos de radiación UV (Hao Feng, 2011).

Recientemente investigaciones han demostrado el potencial de la luz UV-B para causar daño biológico en plantas a nivel celular. Las plantas son vulnerables al incremento de la radiación UV-B debido a que los componentes celulares como

ácidos nucleicos, lípidos, proteínas y quinonas pueden absorber la luz directamente. Estos efectos interfieren en la fisiología y desarrollo de diferentes cultivos, de la tal forma que esas condiciones se han convertido en una importante área de estudio. (Yasin Topcu, 2015).

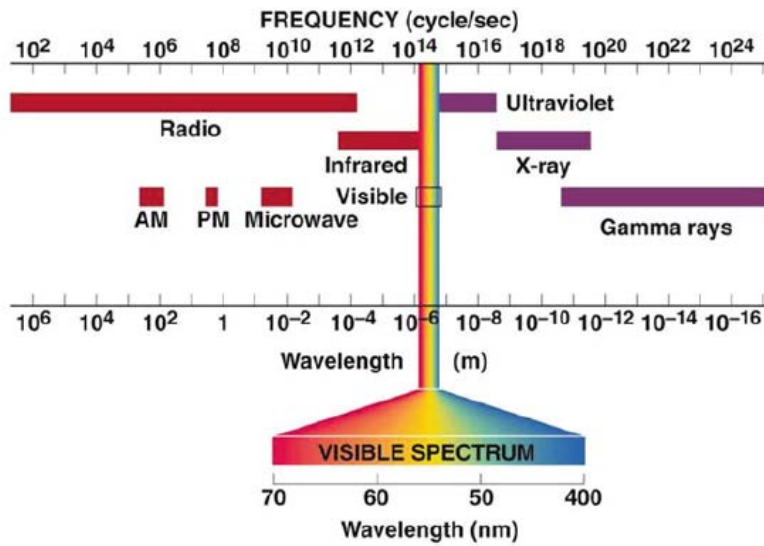


Figura 10. Espectro electromagnético.

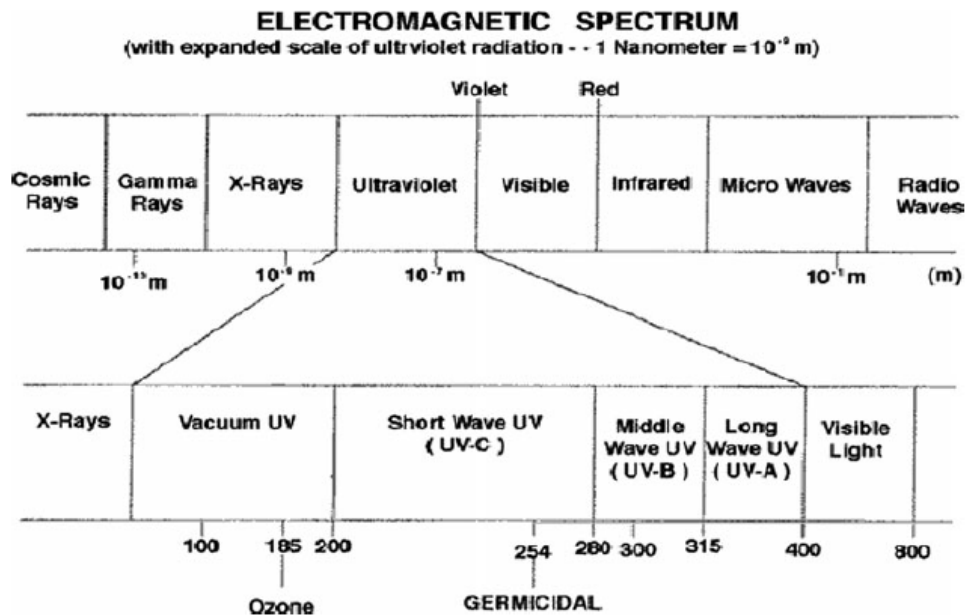


Figura 11. Espectro electromagnético con subdivisiones de la región ultravioleta.

1.14 Generalidades de Luz Visible

Actualmente la iluminación artificial ha tomado relevancia en la agricultura debido a que permite intensificar la producción en plantas y mejorar la calidad. En el mismo sentido son una fuente de luz eficiente para reducir costos de iluminación y enfriamiento debido a su mayor eficacia energética, son una alternativa potencial en la tecnología de iluminación, dentro de sus características incluye diferentes tipos de onda, tiempos de respuesta cortos y dimensiones pequeñas. La luz visible (LV) es una de las principales variables que afectan la concentración de fitoquímicos; se ha informado que el uso de lámparas en diversos cultivos aumenta su contenido (Piovene, *et al.* 2015).

Las siguientes evidencias demuestran los estudios que se han realizado a diversos productos con luz visible (azul):

- En el brócoli después de la cosecha se desencadenan reacciones que producen la senescencia y el deterioro del producto, estudios realizados con luz blanca y luz azul en condiciones de almacenamiento de 5 y 22 °C mostraron un incremento en los niveles de clorofila y contenido de carotenoides (Hasperué, *et al.* 2016).
- Se evaluó el efecto de la luz azul (470 nm) en frutas Bayberries chinas, almacenándolas a la exposición de luz durante 8 días a 10°C. Los resultados mostraron que la luz azul induce la acumulación de antocianinas asociada con el aumento de la expresión biosintética y los genes reguladores. Sugiriendo ser una técnica útil para mejorar el valor comercial y nutricional de la fruta (Shi, *et al.* 2014).
- Se realizaron tratamientos de estrés con luz azul, roja y blanco durante 21 horas, y con luz ultravioleta durante 3 horas en Microalga *Haematococcus*. La

combinación de luz ultravioleta y azul fue el mejor tratamiento para aumentar el contenido de carotenoides y clorofila ya que mostro un incremento de 8 veces mayos al control en el caso de carotenoides y para clorofila incremento 2 veces más que el control (Suyono, *et al.* 2015).

- Se evaluó el efecto del tratamiento con luz azul en la capacidad antioxidante y actividad enzimática de Fresa almacenada a 5°C. Los resultados mostraron que la iluminación de la luz azul aumenta el índice de color, la tasa de respiración y producción de etileno. También mejoro la actividad de las enzimas antioxidantes manteniendo niveles bajos de especies reactivas de oxígeno (Xu, *et al.* 2014).

II METODOLOGÍA

2.1 Materia vegetal

Para esta investigación se utilizó brócoli (*Brassica Oleracea* var. *Itálica*) recién cortado recolectado en la región de Acatzingo-Tecamachalco-Palmar de Bravo en el estado de Puebla. Se seleccionaron hojas internas de la planta que no presentaran daños por plaga, sol y rompimiento de tejido.

2.2 Equipo de Ultrasonido

Se utilizó un procesador de ultrasonidos UP400S HIELSCHER (400 vatios, 24kHz) con sonotrodos de diferentes rangos de diámetro que van de 3 a 40 mm. El dispositivo es adecuado para volúmenes de muestra de 5 a 2000 ml. Aproximadamente de 10 a 50 litros por hora pueden ser tratados. Se utiliza para los métodos de tratamiento de líquidos, tales como homogeneización, dispersión, extracción y la ruptura hacia abajo de las células.

Está conectado a un control de PC o un cable de conexión a una central de control de la planta del usuario con el fin de aumentar la seguridad del proceso. La alta potencia genera la cavitación intensiva requerida, pero el resultado es el ruido no deseado. Lo cual incluye una caja de protección de sonido. Las características del equipo se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7. Características Equipo de Ultrasonido.

Características del Equipo de Ultrasonido	
Potencia	400W
Control de potencia de amplitud	20-100%
Rango de pulso	0-100%

Frecuencia de funcionamiento	24 kHz
Dimensiones (LxWxH)	190x200x130mm
Peso	3.3 kg
Fuente de alimentación de	230 V ~, 4A, 50-60Hz 110-120V ~, 6,3 A, 50-60 Hz

2.3 Equipo de Luz ultravioleta onda corta (UV-C) y luz visible (LV)

Se utilizó una cámara ensamblada en la Facultad de Ciencias Químicas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, la cual está integrada por 6 lámparas de luz UV marca Philips Aqua Coral TLD 15W/03 con una dimensión de 45cm cada una, colocadas en el interior de la cámara en el centro de cada cara con la finalidad de que la superficie de la muestra quede irradiada completamente.

2.4 Métodos

A continuación, se describen los métodos utilizados para determinación de compuestos bioactivos selectos.

2.4.1 Extractos obtenidos con tratamiento de US

De una planta se seleccionaron 2 hojas que no presentan daños por el sol, daño por plaga y sin ruptura de tejido, cada hoja se divide en 2 partes iguales para pesarlas en una balanza analítica (Adventurer OAHUS, China), tomando una mitad de 1 hoja para el control que se licua con 1000 ml de agua y se filtra para obtener la muestra control y la otra mitad para el tratamiento con US; de la misma forma se realiza el procedimiento para la segunda hoja. En el dispositivo se colocan 1 mitad

de cada hoja en un volumen de 1000 ml de agua. Se realizan 3 réplicas con 3 plantas diferentes respectivamente.

Finalizado el tratamiento se licuan las hojas con el agua en un tiempo de 15 s, posteriormente; se filtra en algodón para obtener el extracto.

2.4.2 Extractos obtenidos con tratamientos de UV-C y LV

De una planta se seleccionó 2 hojas que no presentarán daños por el sol, daño por plaga y sin ruptura de tejido, se pesaron en una balanza analítica (Adventurer OAHUS, China), para introducir 1 sola hoja en el centro de la cámara de luz UV-B a diferentes tiempos (30, 90 y 120 s). La hoja restante se licua con 1000 ml de agua y se filtra para obtener la muestra control. Se realizan 3 réplicas con 3 plantas diferentes respectivamente.

Finalizado el tratamiento se licua la hoja con 1000 ml de agua en un tiempo de 15 s, posteriormente; se filtra en algodón para obtener el extracto.

2.4.3 Extractos obtenidos con tratamientos de LV/US

De una planta se seleccionó 2 hojas que no presentarán daños por el sol, daño por plaga y sin ruptura de tejido, se pesaron en una balanza analítica (Adventurer OAHUS, China), para introducir 1 sola hoja en el centro de la cámara de luz UV-B durante 90 s, posteriormente la hoja se introduce con 1000 ml de agua en el dispositivo para realizar el tratamiento con ultrasonido. Tomando en cuenta dos diferentes amplitudes y tiempos respectivamente (50% Amplitud 60 s y 100% Amplitud 30 s). La hoja restante (control) se licua con 1000 ml de agua y se filtra para obtener la muestra control. Se realizan 3 réplicas con 3 plantas diferentes respectivamente.

Finalizados los tratamientos combinados de UV-B/US en una sola hoja, se licua con 1000 ml de agua utilizados en el tratamiento con US en un tiempo de 15 s, posteriormente; se filtra en algodón para obtener el extracto.

2.5 Determinación de la Capacidad Antioxidante

Para el análisis de la capacidad antioxidante en los extractos obtenidos de los tratamientos y muestras control se utilizó el ensayo 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH), basándose en el método desarrollado por Domínguez y otros (2010) con modificaciones. La curva de calibración se presenta en el apéndice 1.

La captación de radicales libres se determinó utilizando DPPH, se evaluó mediante la medición de la absorbancia a 517 nm después de 30 minutos de reacción en oscuridad a 26 °C. Todas las reacciones se iniciaron mediante la adición de 1 ml de muestra a 1 ml de la solución de DPPH, obteniendo un volumen final de 2 ml. Para los blancos se adicionó 1 ml de dicha muestra a 1 ml de etanol. Las reacciones se midieron en un espectrofotómetro (Spectronic 20 génesis, E.U.A) a 517 nm. Los resultados se expresaron como miligramos de Trolox por 100 g de producto fresco.

2.6 Cuantificación del contenido de Compuestos Fenólicos totales

La concentración de compuestos fenólicos totales se determinó mediante el método de Folin-Ciocalteu (Sánchez Rangel, 2013) con modificaciones. La curva de calibración se presenta en el apéndice 2. La concentración de fenoles se determinó utilizando Reactivo de Folin-Ciocalteu para determinación de proteínas, se evaluó mediante la medición de la absorbancia a 765 nm después de 30 minutos de reacción en oscuridad a 26 °C. Todas las reacciones se iniciaron mediante la adición de 1 ml del Reactivo Folin-Ciocalteu a 1 ml de muestra, después de 3 minutos de reacción se adicionó 1ml de carbonato de sodio para obteniendo un volumen final de 3 ml. Para los blancos se adicionó 1 ml de agua a 1 ml de muestra y 1 ml de carbonato de sodio. Las reacciones se midieron en un espectrofotómetro (Spectronic 20 génesis, E.U.A) a 765 nm. Los resultados se expresaron como de miligramos de ácido gálico por 100 g de producto fresco.

2.7 Determinación de Clorofila a y Clorofila b

La cuantificación de clorofila a y clorofila b se determinó siguiendo la metodología de (Sukania. et al., 2009) con modificaciones. Cada muestra se hizo reaccionar con 5 ml de acetona al 95% (v/v), 4 ml de Agua desionizada, y 1 ml de muestra para obtener un volumen total de 10 ml. Posteriormente se midió la absorbancia en un espectrofotómetro (Spectronic 20 génesis, E.U.A) a 3 diferentes longitudes de onda (470, 645 y 662 nm). Los resultados se expresan como miligramos sobre 100 g de producto fresco.

2.8 Reactivos

- Folin-Ciocalteu 2N. Sigma-Aldrich
- Ácido gálico. Sigma-Aldrich
- Carbonato de sodio anhidro. Meyer
- DPPH 2,2 difenil-1-pycrydrazyl. Sigma-Aldrich
- Trolox, ácido-6-hidroxi-(2,5,7,8 tetrametilcromano-2-carboxílico). Sigma-Aldrich.
- Etanol absoluto. Meyer
- Acetona.
- Agua desionizada

2.9 Equipos Utilizados

- Ultrasonido de alta potencia. UP400S. *Hielscher Ultrasound Technology*. Alemania
- Cámara de luz UV-B con 6 lámparas
- Horno de secado. RF 53-UL. *Redline by Binder*. Alemania
- Balanza analítica. Es 120^a. Precisa. Suiza
- Espectrofotómetro.

III ANÁLISIS DE RESULTADOS

3.1 Diseño del dispositivo para el tratamiento ultrasónico

3.1.1 Pruebas preliminares

Con el objetivo de conocer el comportamiento de los compuestos fenólicos de hojas de brócoli recién cortadas sometidas a tratamientos selectos de ultrasonido (US) como un factor de estrés abiótico, se desarrollaron 2 dispositivos diferentes para contener la muestra durante el tratamiento; en el presente resumen de avances se muestran los resultados obtenidos con el uso de ambos dispositivos, buscando en cuál de ellos se podía obtener la información más consistente.

Dispositivo 1:

Se utilizó un dispositivo horizontal (Figura 12) con una capacidad de 1 L, en el cual se inserta la sonda del US por un orificio donde se coloca una malla de acero inoxidable de tamaño 5 cm de diámetro para evitar que las hojas estén en contacto con la sonda. Las hojas se dispusieron en posición horizontal, una sobre otra y el efecto US se aplicó de manera perpendicular a las hojas.



Figura 12. Dispositivo horizontal para tratamiento ultrasónico de hojas de brócoli.

Metodología: De 3 plantas diferentes se seleccionaron las hojas que no presentaran daños por el sol, daño por plaga y sin ninguna ruptura de tejido. Se cortaron de la parte inferior del tallo, se eliminó el exceso de tierra; se pesaron 40 g (equivalente a 4 hojas) las cuales se sometieron a tratamiento US con 400 ml de agua destilada a un ciclo de US con las características de amplitud y tiempo que se muestran en la Tabla 1.8, el control corresponde a hojas sin tratamiento.

Tabla 8. Porcentaje de amplitud y tiempo para los tratamientos con US.

% Amplitud	Tiempo (s)
50	120, 150, 180 y 210
75	90, 120 y 150
100	15, 30, 45 y 60

Finalizado el tratamiento se licuan las hojas con el agua en un tiempo de 15 s, posteriormente; se filtra en algodón para obtener la muestra y cuantificar compuestos fenólicos por el método Folin-Ciocalteu (Sánchez Rangel, *et al.* 2013), por triplicado cada muestra.

Los resultados selectos que indican un aumento superior al control (100%) con su réplica se muestran en la Tabla 1.8

Tabla 9. Cuantificación de compuestos fenólicos en hojas de brócoli procesadas con US*

% Amplitud/tiempo (s)	Promedio % (mg GAE/100 g)
50 / 1 80	102.9 ± 1.3
75 / 90	106.3 ± 3.2
75 / 150	105.7 ± 5.7
100 / 15	107.4 ± 0.8

* Promedio de duplicados ± DE

Los resultados mostraron un incremento en el contenido de compuestos fenólicos por efecto del US; por ello se toman las siguientes condiciones:

- 50 % Amplitud; 180 s
- 75 % Amplitud; 90 s
- 100 % Amplitud, 15 s

Dispositivo 2:

Se observó que con el dispositivo 1 la hoja que queda en la parte superior cambia de color en donde la sonda emite la energía por lo tanto se utiliza un dispositivo vertical con una capacidad de 2 L (Figura 13) en el cual de la misma manera que el dispositivo 1 se inserta la sonda por el orificio con malla para evitar que la hoja este en contacto con la sonda; de tal forma, la hoja se sitúa alrededor de la sonda sin tocarla, en el espacio entre la malla y el dispositivo.



Figura 13. Dispositivo vertical para tratamiento ultrasónico de hojas de brócoli.

Metodología: de una planta se seleccionaron las hojas que no presentan daños por el sol, daño por plaga y sin ruptura de tejido, cada hoja se divide en 2 partes como se muestra en la Figura 15, tomando la primera parte de 1 hoja para el control y la otra parte para el tratamiento con US. En el dispositivo se colocan 2 ½ de 2 hojas en un volumen de 1000 ml; de las partes restantes se procesan para el control. Se hacen 2 réplicas con 2 plantas diferentes respectivamente.



Figura 14. Hoja de brócoli dividida en 2 partes.

Finalizado el tratamiento se licuan las hojas con el agua en un tiempo de 15 s, posteriormente; se filtra en algodón para obtener la muestra y cuantificar compuestos fenólicos por el método Folin-Ciocalteu (Sánchez Rangel, *et al.* 2013), por triplicado cada muestra.

Los resultados con dos replicas se muestran en la Tabla 9.

Tabla 10. Cuantificación de compuestos fenólicos en hojas de brócoli procesadas con US*.

% Amplitud/tiempo (s)	Promedio % (mg GAE/100 g)
50 / 180	125.6 ± 6.1
75 / 90	114.9 ± 2.7
100 / 15	99.2 ± 4.2

* Promedio de triplicados ± DE

Si se comparan los resultados obtenidos entre los dos dispositivos utilizados para procesar las hojas de brócoli recién cortadas con tratamiento US, se podrá observar una diferencia en magnitud; tal es el caso de 50 % de amplitud con un tiempo de 180 s, se observa un incremento progresivo en el porcentaje de compuestos fenólicos entre el dispositivo horizontal y el dispositivo vertical; sin

embargo se mantiene en misma magnitud los valores de 75 % de amplitud con un tiempo de 90 s en los dos dispositivos.

En base a los resultados se concluye que al procesar las hojas de brócoli recién cortadas con tratamiento US utilizando el dispositivo vertical se obtiene un mayor rendimiento en el contenido de compuestos fenólicos. Es por ello que se utilizará el dispositivo vertical para las pruebas posteriores en hoja de brócoli recién cortadas sometidas a tratamientos selectos con US.

3.2 Efecto del US sobre el contenido de Compuestos Fenólicos

El contenido de compuestos fenólicos indica que el efecto de ultrasonificación induce un incremento significativo ($p < 0.005$) en el contenido de compuestos fenólicos en las hojas de brócoli a condiciones de tiempo y amplitud, tales como (60 s y 50%), (30 s y 100%), y (60 s y 100%) con porcentajes de incremento del 25%, 11% y 15.5% respectivamente, respecto al control como se muestra en la Figura 15. Las muestras tratadas con ultrasonido a 90 s y 120 y amplitudes de 50, 75 y 100% exhiben un incremento en el contenido fenólico que el control, sin embargo, estos resultados no son significativos, probablemente a las variaciones biológicas de las muestras. La disminución en el contenido fenólico podría ser atribuido al consumo de fenoles de las especies reactivas (ROS) causado por el tratamiento de ultrasonido (Yu, *et al.* 2016). El contenido de compuestos fenólicos totales está determinado por la interacción entre diversos factores que promueven la producción de compuestos fenólicos.

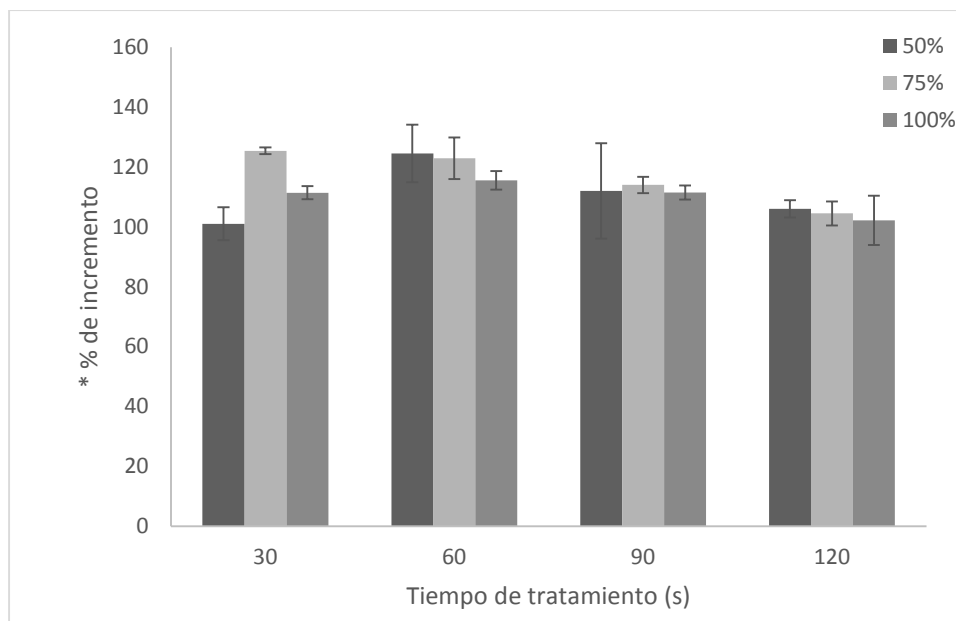


Figura 15. Contenido de CFT en hojas de Brócoli tratadas con US. * Promedio de triplicados \pm DE

3.3 Efecto del Ultrasonido sobre la Capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante en hojas de Brócoli fue expresada en porcentaje de inhibición de DPPH como se muestra en la Figura 16, un incremento en el porcentaje de inhibición indica una elevada capacidad antioxidante, sin embargo, los resultados muestran que no existe diferencia significativa respecto a los diferentes tiempos de tratamiento con diferentes amplitudes, respecto al control; esta disminución podría ser atribuida a la deficiencia de reacciones a nivel biomolecular que impide una rápida reducción de las (ROS) incluyendo a los radicales libres (Khan, et al. 2010).

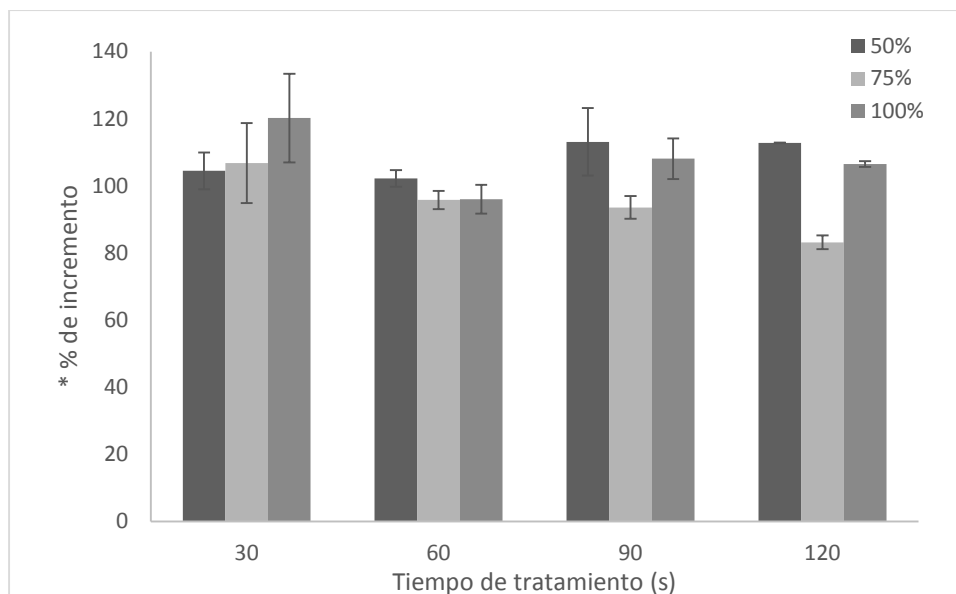


Figura 16. CA en hojas de Brócoli tratadas con US. * Promedio de triplicados \pm DE

3.4 Efecto del Ultrasonido sobre la concentración de Clorofila a y b

El contenido de clorofila a, se muestra en la Figura 17 e indica el efecto de la ultrasonicación, la cual induce un incremento significativo ($p < 0.05$) en un solo tratamiento (60 s y 50% de Amplitud) con un incremento de 27.5% respecto al control, esto se debe a que estos parámetros permiten la cavitación simulando un efecto similar a la fotosíntesis a nivel celular (Chen, *et al.* 2008). La exploración de los diferentes tiempos (30, 90 y 120 s) y amplitudes (75 y 100%) mostraron incrementos que no son significativos. En el contenido de clorofila b, también se presentaron leves incrementos en la mayoría de los tratamientos a diferentes tiempo y amplitudes sin llegar a ser significativos como se muestra en la Figura 18.

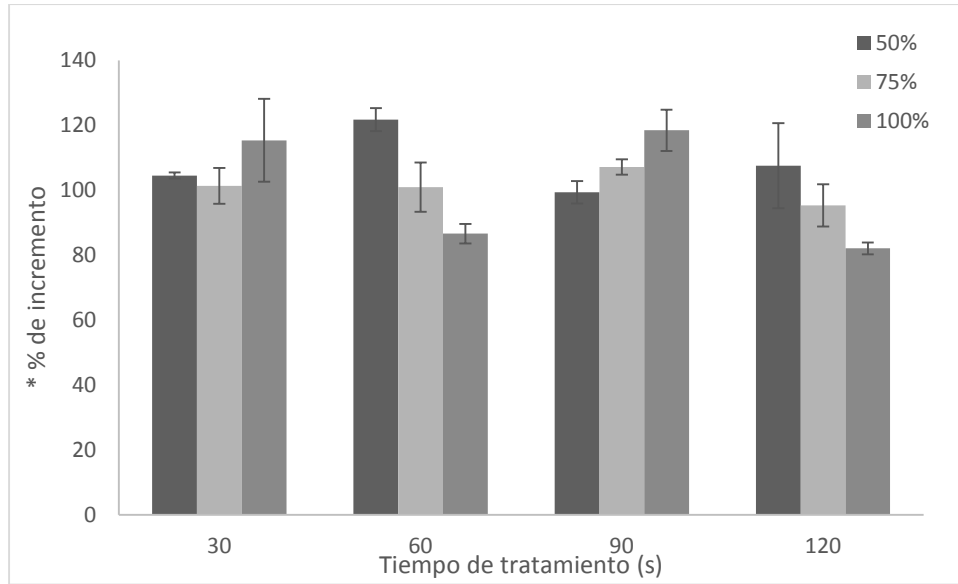


Figura 17. Contenido de Clorofila a en hojas de Brócoli tratadas con US. * Promedio de triplicados \pm DE

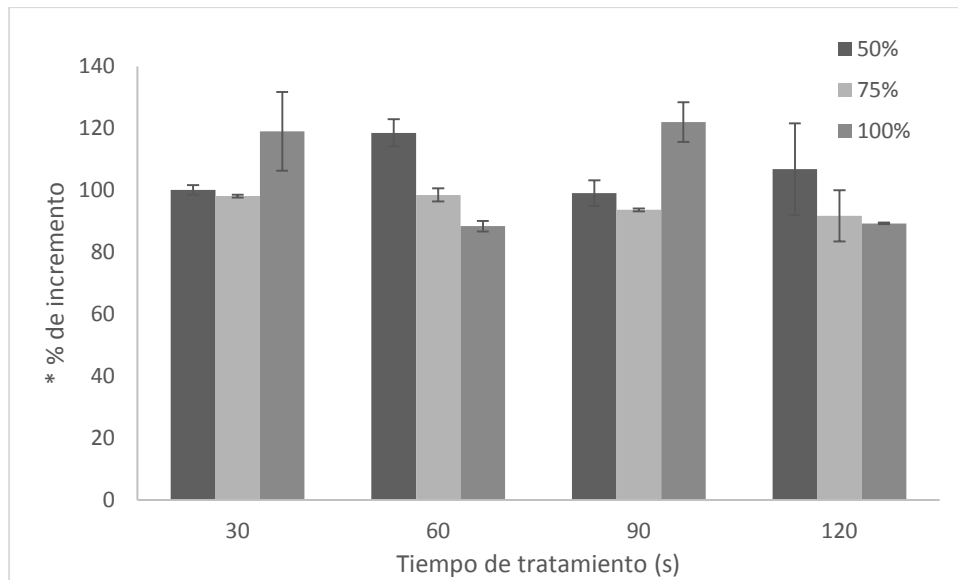


Figura 18. Contenido de Clorofila b en hojas de Brócoli tratadas con US. * Promedio de triplicados \pm DE

3.5 Efecto de la Luz visible sobre el contenido de Compuestos Fenólicos totales

El contenido de compuestos fenólicos indica que el efecto de la luz visible genera un incremento significativo ($p < 0.005$) en el contenido de compuestos fenólicos en las hojas de brócoli tratadas a un tiempo de exposición de 120 s, con un incremento del 18% respecto al control como se muestra en la Figura 19. Esto se debe a que hay un control en la morfogénesis de la planta, por consecuencia de las características de la luz como longitud de onda, intensidad y duración que proporcionan a las plantas cambios en los fotorreceptores y estos a su vez se traducen en señales a nivel celular (Paniagua-Pardo, et al. 2015)..Las muestras expuestas a tiempo de 30,60 s, no exhiben un incremento en el contenido fenólico respecto a el control; sin embargo, tratamientos con exposición a 90 s de luz provoca un aumento no considerable.

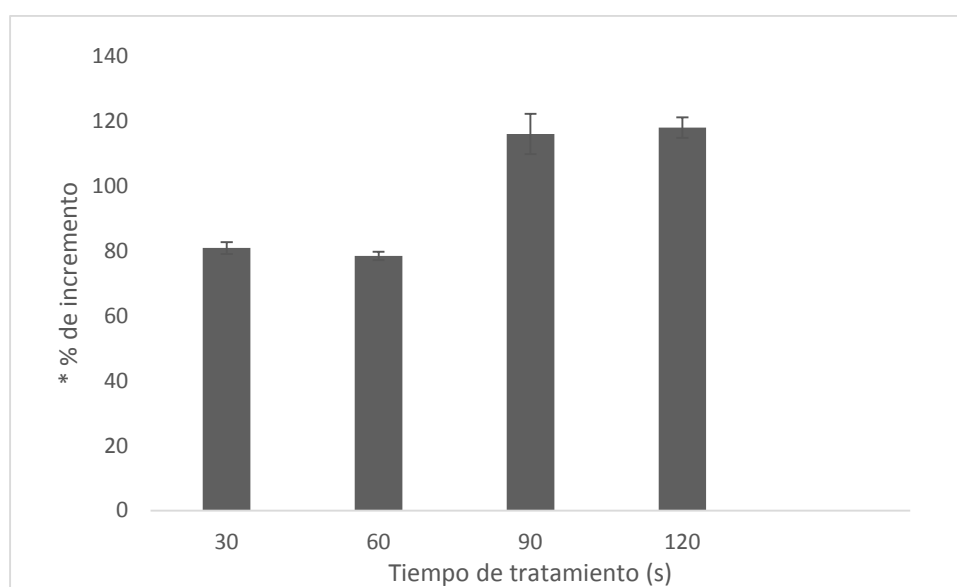


Figura 19. Contenido de CFT en hojas de Brócoli tratadas con LV. * Promedio de triplicados \pm DE

3.6 Efecto de la Luz visible sobre la Capacidad Antioxidante

La capacidad antioxidante en hojas de Brócoli fue expresada en porcentaje de inhibición de DPPH como se muestra en la Figura 20, un incremento en el porcentaje de inhibición indica una elevada capacidad antioxidante, de tal forma, los resultados muestran que existe una diferencia significativa ($p < 0.05$) con dos tiempos de exposición de 60 s, con un aumento del 12% respecto al control, este efecto puede atribuirse a un aumento en el estrés oxidativo y por consecuencia en una acumulación en la capacidad antioxidante (Hasperué, *et al.* 2016), sin embargo, tratamientos con tiempos de exposición de 30 y 120 s, no mostraron un incremento, y el tratamiento con 90 s mostro un pequeño incremento sin ser significativo.

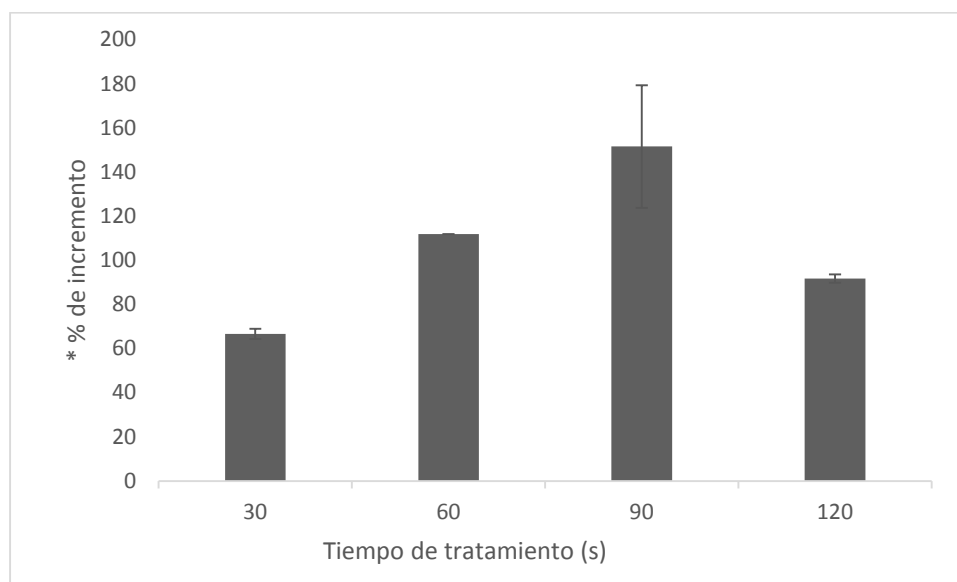


Figura 20. CA en hojas de Brócoli tratadas con LV * Promedio de triplicados \pm DE

3.7 Efecto de la luz visible sobre la concentración de Clorofila a y b

El contenido de clorofila a, se muestra en la Figura 21 y 22 para el caso de clorofila b, indican el efecto de absorción de la luz visible con un tiempo de exposición

de 90 s, y 120 s respectivamente la cual induce un incremento significativo ($p < 0.05$) de 9% y 11% respectivamente con referencia al control, esto debe atribuirse a la capacidad fotosintética que se presenta con tratamiento de luz visible, sin afectar el proceso de absorción beneficiando la capacidad de fotosíntesis produciendo clorofila (Suyono, *et al.* 2015). La exploración a tiempos de 30, 60 y 90 s para clorofila a y de 30, 90 y 120 s para clorofila b se presentan aumentos en la cantidad de clorofila sin llegar a ser significativos.

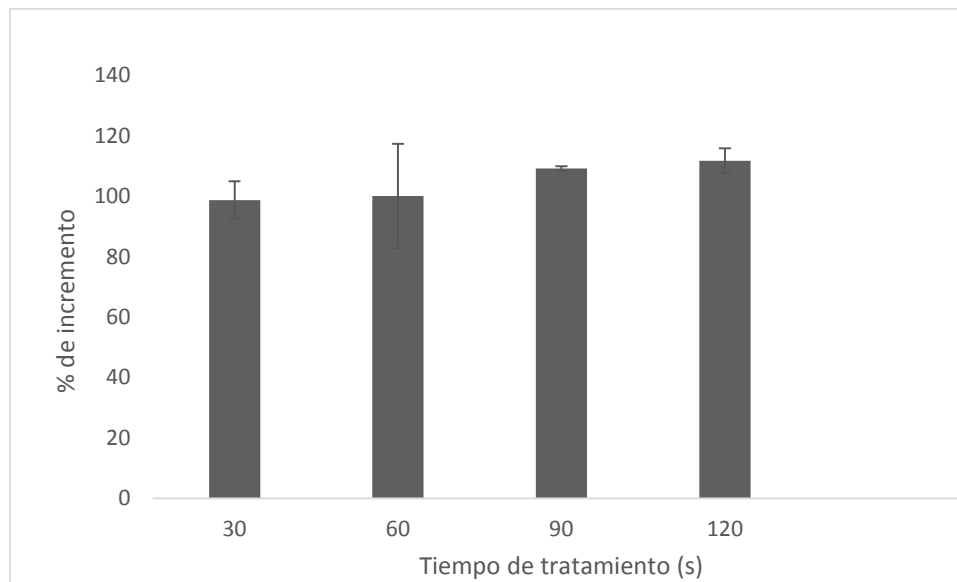


Figura 21. Contenido de Clorofila a en hojas de Brócoli tratadas con LV. * Promedio de triplicados \pm DE

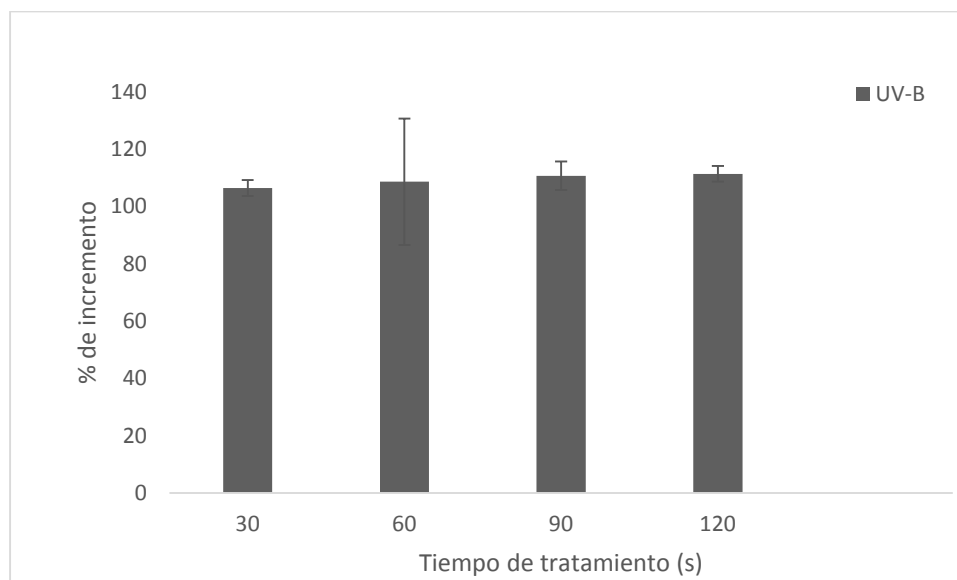


Figura 22. Contenido de Clorofila b en hojas de Brócoli tratadas con luz visible. * Promedio de triplicados \pm DE

3.8 Efecto de Luz ultravioleta de onda corta sobre compuestos antioxidantes

Los resultados en todos los tratamientos con exposición de UV-C en diferentes tiempos (30, 60,90 y 120) que se muestran en la Figura 23 no se presentaron incrementos en el contenido de compuestos fenólicos, capacidad antioxidante y concentración de clorofila a y b, sin embargo, algunas investigaciones han reportado que tratamiento con UV-C en inflorescencias de brócoli muestran una menor tasa de respiración, menor contenido en fenoles y flavonoides, una mayor capacidad antioxidante y una disminución en la degradación de clorofila (Erkan, *et al.* 2008).

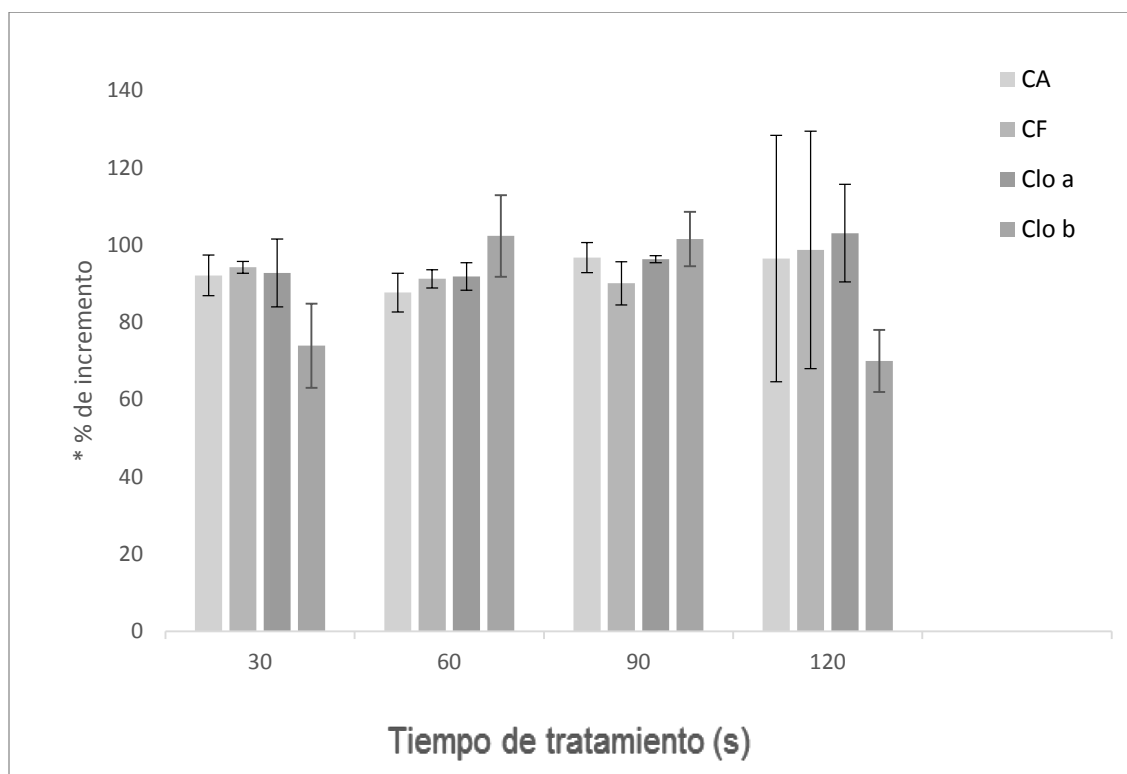


Figura 23. Contenido de Compuestos antioxidantes en hojas de Brócoli tratadas con UV-C. * Promedio de triplicados \pm DE

3.9 Efectos de los tratamientos combinados LV/US

Los tratamientos combinados con una exposición de LV de 90 s y US de potencia a dos diferentes amplitudes y tiempos (50%/60 s y 100%/30 s) se muestran en la Figura 24 y 25 respectivamente.

Se puede observar un efecto en el contenido de compuestos fenólicos que es presentan una diferencia significativa ($p < 0.005$), en ambos tratamientos combinados con valores de incremento de 10% y 14% respecto a las muestras control. En el mismo sentido, la capacidad antioxidante también presenta una diferencia significativa ($p < 0.05$) en ambos tratamientos combinados con un aumento del 6% y 34% respecto al control. Finalmente, la concentración de clorofila a y clorofila b en el tratamiento de LV (90 s)/US (50%/ 60 s) no muestra diferencia significativa, por el contrario, existe un incremento en la concentración de clorofila a y b en el tratamiento de Luz visible (90 s)/US (100%/30 s) muestran incrementos de 28% y 30% respectivamente de tal forma que existe una diferencia significativa ($p < 0.05$); respecto a estos efectos en tratamientos combinados no hay información suficiente, sin embargo, si se le atribuye una efecto sinérgico en la combinación de tratamientos para incrementar la síntesis de compuestos fenólicos, potencializar la capacidad antioxidante y ejercer un efecto sobre los compuestos cromóforos que inducen un aumento en la concentración de clorofila a y b (Potrebko & Resurrección, 2009).

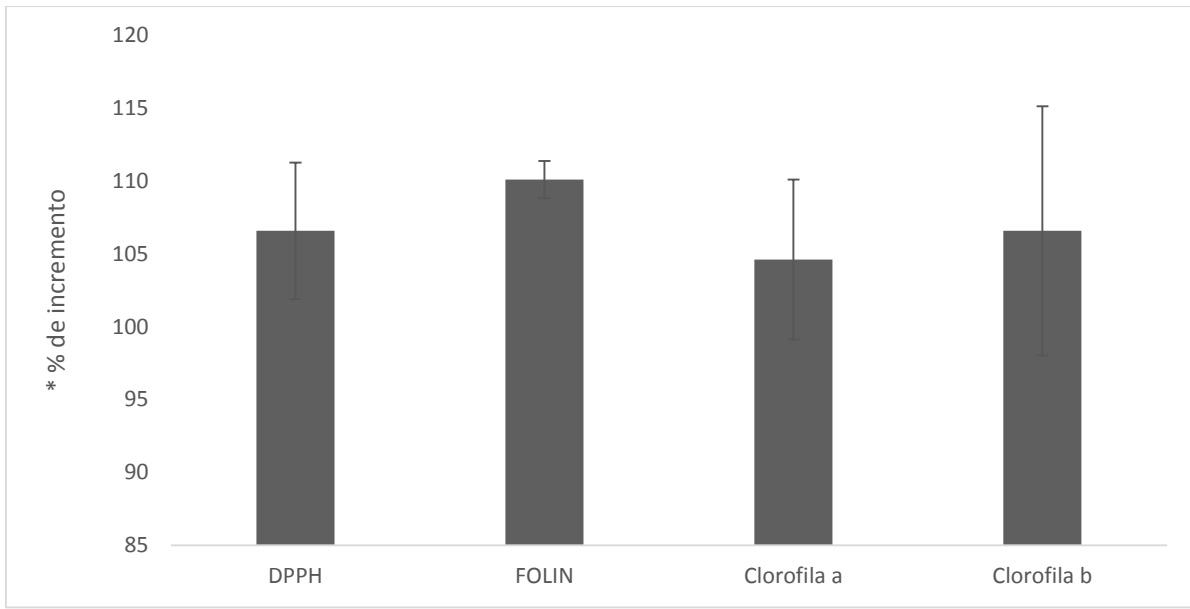


Figura 24. Contenido de Compuestos antioxidantes en hojas de Brócoli tratadas con LV (90 s) /US (50% y 60 s). * Promedio de triplicados ± DE

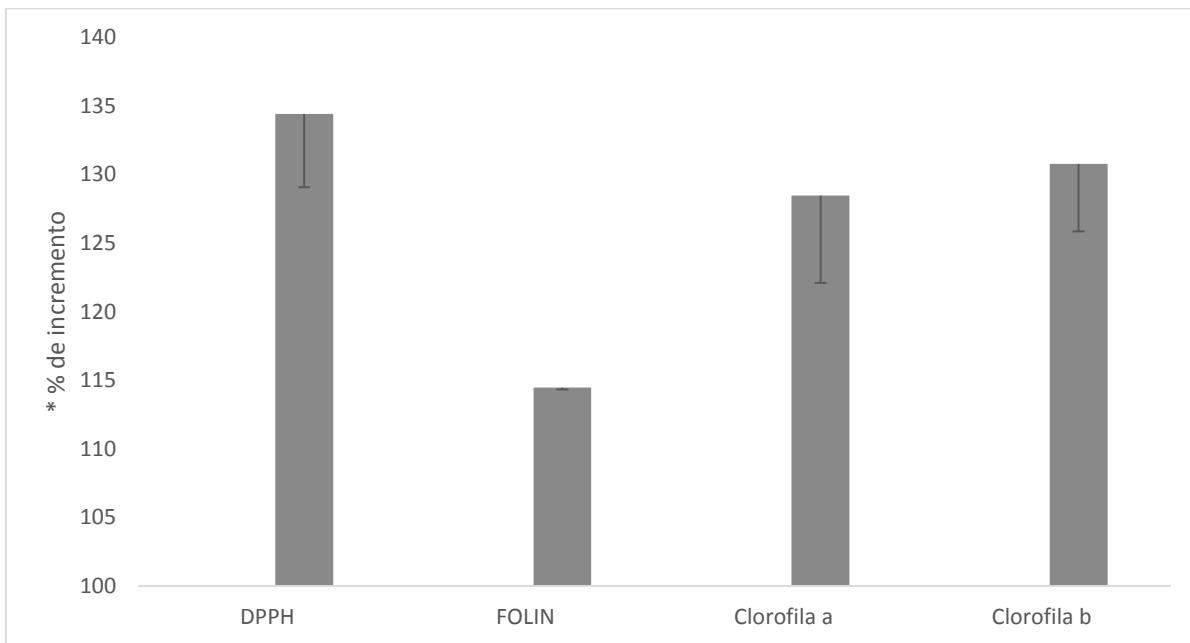


Figura 25. Contenido de Compuestos antioxidantes en hojas de Brócoli tratadas con LV (90 s) /US (100% y 30 s). * Promedio de triplicados ± DE

IV CONCLUSIONES

Los efectos de las tecnologías emergentes tales como ultrasonido de potencia, Luz ultravioleta visible desencadenan estímulos de defensa en las plantas, de tal forma que estas tecnologías podrían ser considerados como factores abióticos.

Las hojas de Brócoli tuvieron diferentes respuestas a los tratamientos con ultrasonido, luz ultravioleta y visible, los cuales influyen en el tiempo de sonicación y la amplitud de onda utilizada y el tiempo de exposición respectivamente. Los resultados mostraron un incremento en compuestos fenólicos, sin embargo, se presentó una disminución en la capacidad antioxidante que podría ser el resultado del consumo de antioxidantes que fueron almacenados en las células, en el mismo sentido la concentración de pigmentos (clorofila a y clorofila b), se ve atribuida por las características propias de la planta y su capacidad para absorber la luz por medio de compuestos cromóferos.

Es importante destacar que los compuestos bioactivos podrían variar dependiendo de las condiciones del cultivo, climatológicas, del suelo, fertilización y empleo de plaguicidas.

Pocos estudios tratan la comprensión de las respuestas fisiológicas en productos frescos con tratamientos derivados de tecnologías emergentes, sin embargo, esta investigación provee el conocimiento para modificar los sistemas de defensa de las hojas de brócoli, obteniendo un valor agregado a los desechos agroindustriales y que podrían impactar en calidad nutricional.

V BIBLIOGRAFÍA

- Andrzej L. Dawidowicz, D. W. (2012). On practical problems in estimation of antioxidant activity on compounds by DPPH method (Problems in estimation of antioxidant activity). *Food Chemistry*, 1037-1043.
- Anoop A. Shetty, S. M. (2013). Vegetables as Sources of Antioxidants. *Journal of Food and Nutritional Disorders*, 2324-9323.
- Arshad Mehmood Abbasi, M. H. (2015). *Wild Edible Vegetables of Lesser Himalayas. Ethnobotanical and Nutraceutical*. Switzerland: Springer.
- Bartosz, G. (2014). *Food Oxidants and Antioxidants chemical, biological and functional properties*. Florida, Boca Raton: CRC Press.
- Batchvarov, G. M. (2011). Evaluation of the methods for determination of the free radical scavenging activity by DPPH. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 11-24.
- Branca, F. (2008). Cauliflower and Broccoli. En F. N. Jaime Prohens, *Handbook of Plant Breeding Vegetables I* (págs. 151-186). Valencia, España: Springer.
- Cisneros-Zevallos, L. (2003). The Use of Controlled Postharvest Abiotic Stresses as a Tool for Enhancing the Nutraceutical Content and Adding-Value of Fresh Fruits and Vegetables. *Journal of Food Science*, 1560-1565.
- Everette, J. D. (2010). Thorough Study of Reactivity of Various Compound Clases toward the Folin-Ciocalteu Reagent. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 8139-8144.
- Farid Chemat, Z.-e.-H. M. (2011). Applications of ultrasound in food technology: Processing , preservation and extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, 813-835.
- Gülcin, I. (2012). Antioxidant activiy of food constituents. *Arch toxicol*, 345-391.
- Hans-Werner Koyro, P. A. (2012). Abiotic Stresses Responses in Plants: An Overview. Germany.
- Hans-Werner Koyro, P. A. (2013). Abiotic Stress Response in plantas: An overview. 01-28.
- Hao Feng, g. V.-C. (2011). *Ultrasound Technologies for Food and Bioprocessing*. Washigton USA: Springer.
- Inga Mewis, M. S. (2012). UV-B Irradiation Changes Specifically the Secondary Metabolite Profile In Broccoli Sprouts: Induced Signaling Overlaps with Defense Response to Biotic Stressors. *Plant Cell Physiol*, 1546-1560.

- Jace D. Everette, Q. M. (2010). Thorough Study of Reactivity of Various Compound Classes toward the folin-Ciocalteu Reagent. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 8139-8144.
- Jamal Javanmardi, C. K. (2006). Variation of lycopene, antioxidant activity, total soluble solid and weight loss of tomato during posharvest storage. *Postharvest, Biology and technology*, 151-155 .
- Jan Pokorny, N. y. (2001). *Antioxidants in food. Practical applications*. Florida. Boca Raton: CRC Press.
- Jara Pérez-Jimenez, F. S.-C. (2007). Metodología pra la evaluación de capacidad antioxidante en frutas y Hortalizas. *V Congreso Iberoamericano de Tecnología poscosecha y Agroexportaciones*. (págs. 1-11). Madrid España: Deaprtamemtno de Metabolismo y Nutrición, Instituto del frío.
- John W. Finley, *. A.-N. (2011). Antioxidants in Foods: State of the Science Important to the food indutry. *Journal of agricultural and food chemistrty*, 6837-6846.
- Juan Carlos Sánchez-Rangel, J. B.-Z.-V. (2013). The Folin-Ciocalteu assay revisted: improvement of its specificity for total phenolic content determination. *The Royal Society of Chemistry*, 5990-5999.
- Jung-Ho, R. B. (2015). Chemical Composition and Antioxidant Activity in Different Tissues of Brassica Vegetables. *journal Molecules*, vol. 20 1228-1243.
- Koutchma, T. (2008). UV Light for processing foods. *Science and Engineering*, 1-6.
- Krishnanand Mishra, H. O. (2012). Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results. *Food Chemistry*, 1036-1043.
- Machali Shivapriya, N. C. (2012). Crucial Facts About health benefits of poplar cruciferous vegetables. *ELSVIER*, 4 94-106.
- Maria Elena Cartea, M. F. (2011). Pehnolic Compounds in Brassica Vegetables. *Molecules*, 251-280.
- Nitin Mantri, V. P. (2012). Abiotic Stress Responses in Plants: Present and Future. En M. N. Parvainz Ahmad, *Abiotic Stress Responses in Plants* (págs. 1-19). New York: Springer.
- P. Bansal, M. K. (2012). Cruciferous Vegetables: Novel Cancer Killer and Guardians of Our Health. En M. M. L.D. Khemani, *Chemistry of Phytopotentials: Health, Energy and Environmental Perspectives* (págs. 3-7). New Yorka: Springer.

- Parvaiz Ahmad, M. P. (2012). *Abiotic Stress Responses in Plants. Metabolism, Productivity and Sustainability*. New York: Springer.
- Pilar Soengas, T. S. (2011). Antioxidant Properties of Brassica Vegetables. *Functional Plant Science and Biotechnology*, 43-55.
- Raúl Domínguez-Perales, M. C.-B.-V. (2010). Broccoli-Derived By-Products-A Promising Source of Bioactive Ingredients. *Journal of Food Science*, 383-392.
- Sagar B. Kedare, R. S. (2011). Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *Journal Food Sci Technol*, 412-422.
- SAGARPA. (2011). Monografía de cultivos. Brócoli. SAGARPA, 1-9.
- Sánchez Rangel, J. B.-V. (2013). The Folin-Ciocalteu assay revisited: improvement of its specificity for total phenolic content determination. *Analytical Methods*, 5, 5990-5999.
- Sánchez- Rangel, J., J. B., & Jacobo - Velazquez, D. (2014). Abiotic stress based bioprocesses for the production of high value antioxidant phenolic compound in plant´s: An overview. *Redalyc.org*, 49-61.
- Shivapriya Manchalli, K. N. (2012). Crucial facts about health benefits of popular cruciferous vegetables. *Journal of Functional Foods*, 94-106.
- Singh, S. B. (2011). Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *Journal Food Sci Technol*, 48(4) 412-422.
- T. S. Awad, H. A. (2012). Applications of ultrasound in analysis, processing and quality control of food: A review. *Food Research International*, 410-427.
- T.S. Awad, H. M. (2012). Applications of ultrasound in analysis, processing and quality control of food: A review. *Food Research International*, 410-427.
- Turtoi, M. (2013). Ultraviolet light treatment of fresh fruits and vegetables surface: A review. *Journal of Agroalimentary Processes and technologies.*, 325-337.
- Villamiel, A. C. (2010). Effect of ultrasound on the technological properties and bioactivity of food: a review. *Trends in Food Science y Technology*, 323-331.
- Yasin Topcu, A. D.-N. (2015). The effects of UV radiation during the vegetative period on antioxidant compounds and postharvest quality of broccoli (*Brassica oleracea* L.). *Plant Physiology and Biochemistry*, 56-65.
- Zevallos., J. V. (2009). Correlations of Antioxidants Activity against Phenolic Content Revisited: A New Approach in Data Analysis for Food and Medicinal Plants. *Journal of Food Science*, Vol. 74, 107-113.

VI APENDICE

APENDICE 1

Para la curva de calibración del método Folin-Ciocalteu, se prepararon muestras estándar de ácido gálico con agua a 5, 10, 15 y 20 ppm. Se adiciono 1ml de muestra estándar con 1 ml del Reactivo de Folin-Ciocalteu al 5%(v/v), después de 3 minutos que se llevó a cabo la reacción se le adiciono 1 ml de carbonato de sodio 0.5%(m/v) para obtener un total de 3 ml. Los blancos se prepararon con 1 ml de la solución estándar con 1 ml de agua desionizada y 1 ml de carbonato de sodio Las muestras se mantuvieron en oscuridad a temperatura ambiente (26°C) durante 30 min, para posteriormente leer la absorbancia a 765 nm en un espectrofotómetro. La tabla 11 muestra los resultados de las absorbancias y la Figura 26 la línea de tendencia y ecuación.

Tabla 11 Resultados de Absorbancias a 765 nm

FOLIN-CIOCALTEU		765 nm
Absorbancia	Abs-blanco	[AC. GALICO] ppm
0.238	0.1035	5
0.246	0.1115	5
0.238	0.1035	5
0.449	0.3145	10
0.459	0.3245	10
0.476	0.3415	10
0.692	0.5575	15
0.692	0.5575	15
0.707	0.5725	15
0.941	0.8065	20
0.947	0.8125	20
0.945	0.8105	20
1.122	0.9875	25
1.122	0.9875	25
1.108	0.9735	25

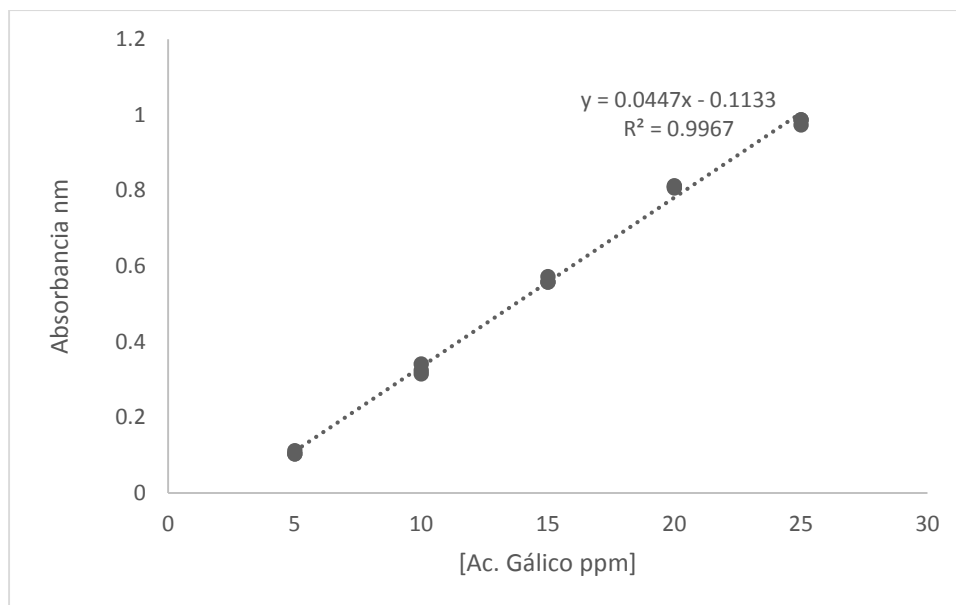


Figura 26. Curva de calibración para el método Folin-Ciocalteu

APENDICE 2

Para la curva de calibración del ensayo DPPH, se prepararon muestras estándar de Trolox/etanol a 100 ppm (p/v) a diferentes concentraciones de 4, 8, 12.16 y 20 ppm. Posteriormente se adiciona 1 ml de muestra estándar a 1 ml del Reactivo DPPH al 0.004% (v/v), los blancos se prepararon con 1 ml de la solución estándar en 1 ml de etanol. Las muestras se mantuvieron en oscuridad a temperatura ambiente (26°C) durante 30 min, para posteriormente leer la absorbancia a 517 nm en un espectrofotómetro. La Tabla 12 muestra los resultados de las absorbancias y la Figura 27 la línea de tendencia y ecuación.

Tabla 12 Resultados de Absorbancias a 517 nm

DPPH		
DPPH/ETANOL	ETANOL/ETANOL	BLANCO/STAN
0.77	0.044	0.032
0.774	0.044	0.032
0.781	0.044	0.031

Absorbancia	[TROLOX] PPM	[TROLOX] PPM -BLANCO
0.621	4	0.589
0.636	4	0.604
0.65	4	0.618
0.431	8	0.399
0.464	8	0.432
0.452	8	0.420
0.35	12	0.318
0.367	12	0.335
0.314	12	0.282
0.203	16	0.171
0.21	16	0.178
0.235	16	0.203
0.171	20	0.139
0.178	20	0.146
0.175	20	0.143

Figura 27 Curva de calibración para el ensayo DPPH

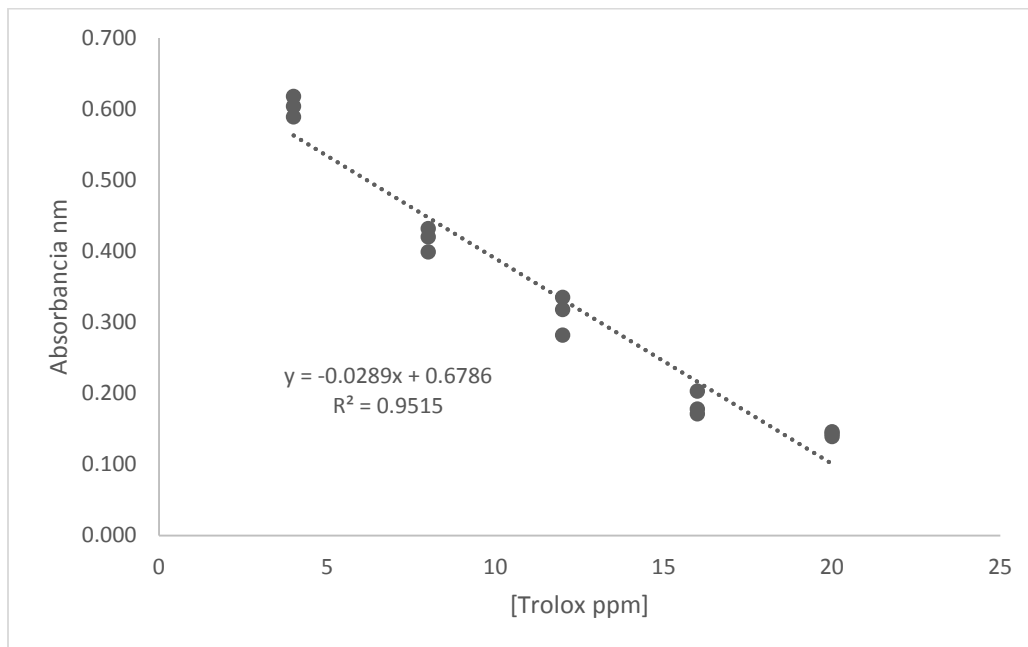


Figura 26. Curva de calibración para el ensayo DPPH

APENDICE 3

Tratamientos con Ultrasonido

Compuestos Fenólicos (mg GAE/100g) *			
Tiempo (s)	Amplitud		
	50%	75%	100%
Control	335.9 ± 12.1 a	289.2 ± 35.9 a	192.1 ± 1.5b
30	339.0 ± 6.2 a	362.5 ± 41.8 a	214.1 ± 6. 1a
Control	245.5 ± 1.8 b	393.9 ± 137.0 a	289.7 ± 2.5 b
60	303.6 ± 5.5 a	489.0 ± 195.8 a	334.8 ± 6.1 a
Control	287.2 ± 15.6 a	277.5 ± 3.8 a	221.5 ± 14.0 a
90	320.5 ± 28.3 a	315.0 ± 89.4 a	247.1 ± 20.9 a
Control	274.8 ± 15.2 a	246.8 ± 84.6 a	224.6 ± 21.4 a
120	291.5 ± 26.5 a	258.4 ± 33.6 a	230.4 ± 40.4 a

Clorofila a (mg/100g FW)			
Tiempo (s)			
	50%	75%	100%
Control	6.8 ± 0.1 a	7.1 ± 0.4 a	23.2 ± 6.3 a
30	7.4 ± 0.3 a	7.2 ± 0.4 a	29.7 ± 3.3 a
Control	22.4 ± 0.6 b	7.2 ± 0.1 a	39.4 ± 12.4 a
60	27.3 ± 0.8 a	8.4 ± 1.0 a	38.1 ± 2.7 a
Control	5.8 ± 0.2 a	7.4 ± 0.3 a	50.3 ± 4.2 a
90	6.5 ± 0.7 a	7.9 ± 0.17 a	51.6 ± 2.7 a
Control	6.5 ± 0.6 a	26.5 ± 6.0 a	54.1 ± 7.0 a
120	7.0 ± 0.8 a	30.2 ± 7.1 a	52.0 ± 9.6 a

Clorofila b (mg/100g FW)			
Tiempo (s)			
	50%	75%	100%
Control	8.5 ± 0.75 a	8.4 ± 1.0 a	36.3 ± 11.1 a
30	8.9 ± 0.8 a	8.2 ± 0.1 a	46.8 ± 5.0va
Control	30.7 ± 2.7 a	8.6 ± 0.5 a	57.7 ± 17.4 a
60	36.3 ± 1.3 a	9.4 ± 0.7 a	58.3 ± 5.2 a
Control	6.2 ± 0.5 a	9.9 ± 1.9 a	78.6 ± 4.0 a
90	6.9 ± 0.4 a	8.7 ± 0.1 a	81.6 ± 4.3 a
Control	7.6 ± 0.9 a	37.5 ± 9.0 a	83.5 ± 11.8 a
120	8.1 ± 1.13 a	43.8 ± 11.7 a	80.2 ± 15.3 a

Capacidad antioxidante (mg Trolox/100g)			
Tiempo (s)			
	50%	75%	100%
Control	970.4 ± 12. 1a	2743.8 ± 121.0a	439.79 ± 26. 5a
30	1071.4 ± 122.0a	2929.8 ± 327.8a	481.4 ± 52. 8a

Control	402.5 ± 28. 8a	360.6 ± 21. 5a	367.4 ± 31. 9a
60	407.2 ± 9. 9a	358.0 ± 28. 6a	385.9 ± 42. 7a
Control	464.2 ± 116.3a	344.7 ± 11. 6a	286.6 ± 13. 8a
90	721.4 ± 64. 1a	305.4 ± 11. 0a	301.5 ± 17. 0a
Control	760.2 ± 89. 9a	381.2 ± 77. 0a	274.5 ± 13. 6a
120	901.9 ± 0. 8a	341.3 ± 59. 1a	299.2 ± 9. 4a

Tratamientos con LV

	Compuestos Fenólicos (mg GAE/100g)	Clorofila a (mg/100g FW)	Clorofila b (mg/100g FW)	Capacidad antioxidante (mg Trolox/100g)
Tiempo				
s				
Control	306.7 ± 0. 0a	22.4 ± 0.0a	30.7 ± 0.0a	119.2 ± 0.0a
30	248.1 ± 5.6b	22.1 ± 1.3a	32.7 ± 0.8a	79.3 ± 2.7b
Control	355.6 ± 0. 0a	19.7 ± 0.0a	24.6 ± 0.0a	185.2 ± 0.0b
60	279.1 ± 4.5b	19.7 ± 3.4a	26.7 ± 5.4a	207.2 ± 0.1a
Control	255.9 ± 0.0a	22.4 ± 0.0b	32.8 ± 0.0a	128.3 ± 0.0a
90	296.8 ± 15.9a	24.5 ± 0.1a	36.3 ± 1.6a	194.5 ± 35.6a
Control	249.5 ± 0.0b	18.3 ± 0.0a	26.2 ± 0.0b	202.5 ± 0.0a
120	294.3 ± 7.8a	20.5 ± 0.7a	29.2 ± 0.7a	185.7 ± 3.8b

Tratamientos con UV-C

	Compuestos Fenólicos (mg GAE/100g)	Clorofila a (mg/100g FW)	Clorofila b (mg/100g FW)	Capacidad antioxidante (mg Trolox/100g)
Tiempo				
s				
Control	319.9 ± 0.0a	16.9 ± 0.0a	21.0 ± 0.0a	610.0 ± 0.0a
30	296.9 ± 28.1a	15.9 ± 0.2b	19.40 ± 1.1a	451.1 ± 66.5a
Control	263.5 ± 0.0a	15.2 ± 0.0a	19.9 ± 0.0a	312.2 ± 0.0a
60	242.1 ± 9.4a	13.9 ± 0.3b	17.5 ± 1.0a	319.7 ± 32.9a
Control	255.5 ± 0.0a	14.7 ± 0.0a	18.3 ± 0.0a	548.8 ± 0.0a
90	246.2 ± 2.3b	13.2 ± 0.8a	17.7 ± 0.7a	557.6 ± 38.75a
Control	355.0 ± 0.0a	32.3 ± 0.0a	47.3 ± 0.0a	674.17 ± 0.0a

120	365.9 ± 44.9a	31.9 ± 9.9a	45.7 ± 15.1a	472.0 ± 54.1b
-----	---------------	-------------	--------------	---------------

Tratamientos combinados US/LV

Compuestos Fenólicos (mg GAE/100g)

Tiempo s	Amplitud/Tiempo (s)	
	50% / 60	100 %/ 30
Control	247.7 ± 0.0b	239.9 ± 0.0b
90	272.7 ± 3.1a	274.7 ± 0.3a

Clorofila a (mg/100g FW)

Tiempo s	Amplitud/Tiempo (s)	
	50% / 60	100 %/ 30
Control	22.78 ± 0.0a	29.4 ± 0.0b
90	22.56 ± 2.3a	37.8 ± 1.8a

Clorofila b (mg/100g FW)

Tiempo s	Amplitud/Tiempo (s)	
	50% / 60	100 %/ 30
Control	29.9 ± 0.0a	42.1 ± 0.0b
90	30.1 ± 3.5a	55.1 ± 2.0a

Capacidad antioxidante (mg Trolox/100g)

Tiempo s	Amplitud/Tiempo (s)	
	50% / 60	100 %/ 30
Control	664.0 ± 0.0a	683.7 ± 0.0b
90	707.7 ± 31.1a	919.2 ± 36.6a
