

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Agronomia 'Eliseu Maciel'
Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos



Tese

Efeito da redução de aporte hídrico e aplicação de radiação UV-C sobre compostos relacionados à qualidade e ao metabolismo de glicosinolatos em brócolis (*Brassica oleracea* L. var. *italica*)

Roseane Farias D'Avila

Pelotas, 2017

Roseane Farias D'Avila

Efeito da redução de aporte hídrico e aplicação de radiação UV-C sobre compostos relacionados à qualidade e ao metabolismo de glicosinolatos em brócolis (*Brassica oleracea* L. var. *italica*)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Comitê de Orientação:

Prof. Dr. Fábio Clasen Chaves

Prof. Dr. César Valmor Rombaldi

Dr. Rafael da Silva Messias

Pelotas, 2017

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

D111e D'Avila, Roseane Farias

Efeito da redução de aporte hídrico e aplicação de radiação UV-C sobre compostos relacionados à qualidade e ao metabolismo de glicosinatos em brócolis (*Brassica oleracea* L. var. *italica*) / Roseane Farias D'Avila ; Fábio Clasen Chaves, orientador ; César Valmor Rombaldi, Rafael da Silva Messias, coorientadores. — Pelotas, 2017.

106 f. : il.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2017.

1. Estresse. 2. Compostos de defesa. 3. Antioxidantes. 4. Glicosinatos. I. Chaves, Fábio Clasen, orient. II. Rombaldi, César Valmor, coorient. III. Messias, Rafael da Silva, coorient. IV. Título.

CDD : 664

Roseane Farias D'Avila

Efeito da redução de aporte hídrico e aplicação de radiação UV-C sobre compostos relacionados à qualidade e ao metabolismo de glicosinolatos em brócolis (*Brassica oleracea* L. var. *italica*)

Tese aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Doutora em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas.

Data da defesa: 06 de dezembro de 2017.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Fábio Clasen Chaves (Orientador). Doutor em Plant Biology pela Rutgers, The State University of New Jersey.

Prof. Dr. César Valmor Rombaldi. Doutor em Biologie Moléculaire Végétale pela Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Toulouse.

Prof. Dr. Luciano do Amarante. Doutor em Biologia Vegetal pela Universidade Estadual de Campinas.

Dr. Railson Schreinert dos Santos. Doutor em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas.

Prof. Dr. Rui Carlos Zambiasi. Doutor em Food and Nutritional Science pela University of Manitoba.

Agradecimentos

Agradeço a todos que estiveram comigo durante esse período de doutorado. Principalmente à minha mãe, Maria Alda, que amorosa sempre me ensinou mais com exemplos do que palavras e sempre soube me trazer de volta a caminhos mais tranquilos quando eu não via soluções. Agradeço ao meu pai, Moacir, por sentir orgulho e acreditar em mim, mesmo quando eu própria não acreditei. Sua memória me faz seguir adiante.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Fábio Chaves, presente nas diversas etapas deste trabalho, pelo compartilhamento de seus conhecimentos. Também agradeço a seus pais Tânia e Morenei, que muito gentilmente cederam espaço em sua propriedade para realização do experimento e sempre foram muito solícitos em ajudar na sua execução, juntamente com Odair. E aos demais que orientaram a instalação ou condução do experimento, Prof. Dr. Eloy Antonio Pauletto, Dr. Rafael da Silva Messias, Prof. Dr. César Valmor Rombaldi.

Ao professor Rui Zambiasi, com quem convivi por um período extenso no laboratório 709, pelos ensinamentos. À banca, pela disponibilidade.

À UFPel e DCTA pela oportunidade de realização do trabalho e à CAPES pela concessão da bolsa.

Aos estagiários que passaram pelos laboratórios de frutas e hortaliças, Naralice, Cinara, Tássia, Bruna, Suzana, Josiane, Tailise, Karina e a Francine, Tainan, Leandro e aos demais que ajudaram na implantação do experimento. Às meninas do laboratório 710, Bianca Camargo, Rosane Crizel, Jéssica Hoffmann, Camila Nunes, Ísis Toralles por toda a ajuda durante esse período, e à Nathalia Madruga que deu continuidade ao projeto iniciado nesta tese.

Às meninas do laboratório 709, Fernanda Krumreich, Cristina Jansen, Michele Cardozo, Suzane Luz, Francine Bueno-Costa, Fernanda Oliveira, Bruna Antunes, Lorena Aguiar, amigas com quem convivi muito durante este doutorado e especialmente a Josiane Rutz e Médelin Marques que, além de terem sido colegas desde o início do mestrado, são ainda hoje companheiras muito próximas e queridas.

Por fim agradeço a Deus por este período, pelo aprendizado proveniente dos erros e acertos, pelas pessoas que conheci, pelo desenvolvimento pessoal e profissional. Muito obrigada.

“Por que a vida tem sentidos, onde a razão não se cansa

De renascer todo o dia, aonde exista esperança...”

Gujo Teixeira

Resumo

D'AVILA, Roseane Farias. **Efeito da redução de aporte hídrico e aplicação de radiação UV-C sobre compostos relacionados à qualidade e ao metabolismo de glicosinolatos em brócolis (*Brassica oleracea* L. var. *italica*)**. 2017.106p. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Características diversas das habituais durante o cultivo de vegetais e na pós-colheita podem ser reconhecidas como fatores de estresse pelo metabolismo e, dependendo da intensidade, levar ao acúmulo de compostos de defesa, relacionados ao aumento da vida de prateleira e a atividades antioxidantes e anticancerígenas *in vivo*. Deste modo, o efeito do cultivo de brócolis sob condições de estresse hídrico e da aplicação de radiação UV-C durante a pós-colheita sobre compostos relacionados a atributos sensoriais e funcionais foram analisados durante colheitas realizadas no verão e inverno. O cultivo sob estresse hídrico ocasionou a diminuição do teor de ácido L-ascórbico em todas as amostras, e os teores de glicosinolatos nos brócolis colhidos no verão, o que também ocorreu para clorofila a e carotenoides. No inverno, o estresse hídrico levou ao aumento de glicosinolatos somente após o armazenamento. Observaram-se diferenças significativas pela aplicação de UV-C após sete dias de armazenamento. No verão, a utilização da dose de 7 kJ.m⁻² de UV-C resultou no aumento do conteúdo de clorofilas a e b e de carotenoides nos brócolis cultivados sob aporte hídrico regular. A mesma dose, quando aplicada a plantas cultivadas sob estresse hídrico, promoveu aumento significativo apenas de carotenoides e ácido L-ascórbico. O teor de glicosinolatos em brócolis cultivados no verão foi intensificado pelo cultivo sob condições de estresse hídrico combinado com aplicação de 10 kJ.m⁻² de UV-C. No inverno, o aumento do teor de glicosinolatos foi observado aplicando a dose de 7 kJ.m⁻², e foi acompanhado pela redução da atividade de mirosinases. Em ambos os cultivos conduzidos no inverno, houve um aumento de isotiocianatos quando brócolis cultivados sob estresse hídrico foram tratados com 10 kJ.m⁻² de UV-C. Em vista dos resultados, conclui-se que as respostas metabólicas à redução do aporte hídrico e à aplicação de radiação UV-C são diferentes devido à época de cultivo da hortaliça, com exceção do teor do ácido L-ascórbico, que é reduzido pelo cultivo com estresse independentemente da estação.

Palavras chaves: estresse; compostos de defesa; antioxidantes; glicosinolatos.

Abstract

D'AVILA, Roseane Farias. **Effect of reduction of water supply and application of UV-C radiation on compounds related to the quality and to the glucosinolates metabolism in broccoli.** 2017.106p. Thesis (Doctorate in Food Science and Technology) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Characteristics different from the usual ones during the growing and in the post-harvest of vegetables can be recognized as stress factors by the metabolism and, depending on the level, lead to the accumulation of defense compounds, related to the increase of the shelf life and to the antioxidant and anticancer activities *in vivo*. Thus, the effect of broccoli cultivation under water stress and of the application of UV-C radiation during post-harvest on compounds related to sensorial and functional attributes were analyzed during summer and winter harvests. The cultivation under water stress caused a decrease in the L-ascorbic acid content in all the samples, and the glucosinolate content in the broccoli harvested in the summer, which also occurred for chlorophyll a and carotenoids. In winter, water stress the pigments presented opposite patterns between the years analyzed, which also occurred with the isothiocyanates, compounds derived from glucosinolates. The stress led to the increase of glucosinolates only after storage. Significant differences were observed by application of UV-C after seven days of storage. In the summer, the use of the 7 kJ.m⁻² UV-C dose resulted in increased content of chlorophyll a and b and carotenoids in broccoli grown under regular water intake. The same dose, when applied to the plants grown under water stress, promoted a significant increase only of carotenoids and L-ascorbic acid. The glucosinolates content in broccoli grown in summer was intensified by the cultivation under water stress conditions combined with the application of 10 kJ.m⁻² of UV-C. In the winter, the glucosinolates content increase was observed by applying the 7 kJ.m⁻² dose, and it was accompanied by a reduction in myrosinase activity. In both cultures conducted in winter, there was an increase in isothiocyanates when broccoli cultivated under water stress were treated with 10 kJ.m⁻² of UV-C. In view of the results, it is concluded that the metabolic responses to the reduction of the water supply and to the application of UV-C radiation are different due to the season of cultivation of the vegetable, except for the L-ascorbic acid content, which is reduced by the cultivation with water stress regardless of the season.

Keywords: stress, defense compounds, antioxidants, glucosinolates.

Lista de Figuras

Figura 1 - Estrutura dos carotenoides luteína, β -caroteno e violaxantina.....	25
Figura 2 - Estrutura do ácido L-ascórbico, ânion L-ascorbato e ácido dehidroascórbico	26
Figura 3 - Rotas de biossíntese de glicosinolatos alifáticos e indólicos provenientes de metionina e triptofano.	27
Figura 4 - Glicosinolato glicorafanina e isotiocianato sulforafano (a) e glicobrassicina e indol-3-carbinol (b).....	29
Figura 5 - Cultivo de brócolis em três níveis de tensão de água no solo - 15, 45 e 75 kPa - e esquema demonstrativo (direita abaixo) de processamento dos brócolis de cada unidade experimental a floretes e aplicação de radiação UV-C – 0,, 7 e 10 kJ. m ⁻²	31
Figura 6 - Tensões de água no solo durante o primeiro cultivo de brócolis, mostrando o primeiro período de estresse (a) e o segundo período de estresse (b).	34
Figura 7 - Curva de retenção de água do solo onde foram desenvolvidos os experimentos, no município de Capão do Leão-RS.	35
Figura 8 - Sistema de plantio de túnel baixo (a) e cobertura do solo com plástico mulching (b) para o cultivo de brócolis nos experimentos (2 e 3) conduzidos no inverno de 2014 e 2015.....	36
Figura 9 - Tensões de água no solo durante o cultivo de brócolis pertencente ao experimento 2, colhidos em 27 de outubro de 2014.....	37
Figura 10 - Tensões de água no solo durante o cultivo de brócolis durante o experimento 3, colhidos em 12 de outubro de 2015.....	38
Figura 11 - Disposição dos floretes de brócolis nas bandejas para aplicação de tratamento com radiação UV-C	39
Figura 12 - Demonstração de medição dos diâmetros superior, inferior e altura de brócolis.....	40
Figura 13 - Teor de clorofila a, clorofila b e de carotenoides de brócolis cultivados sob aporte hídrico regular e com estresse hídrico e colhidos em fevereiro de 2014 (a) e março de 2014(b).	48
Figura 14 - Média das colheitas do Experimento 1 de clorofilas a e b e carotenoides de brócolis cultivados sob aporte hídrico regular e estresse após a colheita e o armazenamento por 7 dias, tratados com 0, 7 e 10 kJ.m ⁻² de UV-C.....	49

Figura 15 - Teor de açúcares redutores de brócolis cultivados sob aporte hídrico regular e com estresse hídrico e colhidos em fevereiro de 2014 (a) e março de 2014 (b).....	50
Figura 16 - Ácido ascórbico de brócolis cultivados sob tensão regular de água no solo e estresse colhidos em fevereiro de 2014 (a) e março de 2014 (b).....	52
Figura 17 - Média das colheitas do Experimento 1 do teor de ácido L-ascórbico de brócolis cultivados sob aporte hídrico regular e estresse após a colheita e o armazenamento por 7 dias tratados com 0, 7 e 10 kJ.m ⁻² de UV-C.....	52
Figura 18 - Atividade de mirosinases de brócolis cultivados sob condições normais de água no solo e estresse colhidos em fevereiro de 2014 (a) e março de 2014 (b).	53
Figura 19 - Glicosinolatos totais de brócolis cultivados com e sem estresse hídrico ao primeiro e sétimo dia de armazenamento, colhidos em fevereiro de 2014 (a) e março de 2014 (b).....	54
Figura 20 - Média das colheitas do Experimento 1 de glicosinolatos totais de brócolis cultivados sob aporte hídrico regular e estresse após a colheita e 7 dias de armazenamento tratados com 0, 7 e 10 kJ.m ⁻² de UV-C.....	55
Figura 21 -Média dos Experimentos 2 e 3, cultivados ou não com estresse hídrico e aplicados ou não com radiação UV-C, do ângulo Hue de brócolis durante 15 dias de armazenamento.	59
Figura 22 - Média dos Experimentos 2 e 3 de açúcares redutores (mmol glicose), de brócolis cultivados sob aporte hídrico regular e estresse após a colheita e 7 dias de armazenamento tratados com 0, 7 e 10 kJ.m ⁻² de UV-C.....	62
Figura 23 - pH de brócolis cultivados com e sem estresse hídrico ao primeiro e sétimo dia de armazenamento, colhidos em outubro de 2014 (a) e 2015 (b).....	62
Figura 24 - Ácido ascórbico de brócolis cultivados sob aporte hídrico regular e estresse colhidos em outubro de 2014 (Experimento 2) e 2015 (Experimento 3).....	64
Figura 25 - Média dos Experimentos 2 e 3 de ácido ascórbico de brócolis cultivados sob aporte hídrico regular e estresse após a colheita e 7 dias de armazenamento, tratados com 0, 7 e 10 kJ m ⁻² de UV-C.	64
Figura 26 - Média dos Experimentos 2 e 3 de atividade de mirosinases de brócolis cultivados sob aporte hídrico regular e estresse após a colheita e 7 dias de armazenamento, tratados com 0, 7 e 10 kJ.m ⁻² de UV-C.....	66
Figura 27 - Média dos Experimentos 2 e 3 de glicosinolatos totais de brócolis cultivados sob aporte hídrico regular e estresse após a colheita e 7 dias de armazenamento, tratados com 0, 7 e 10 kJ m ⁻² de UV-C.....	67

Figura 28 - Média dos Experimentos 2 e 3 de isotiocianatos de brócolis cultivados sob aporte hídrico regular e estresse após a colheita e 7 dias de armazenamento, tratados com 0, 7 e 10 kJ.m ⁻² de UV-C	68
Figura 29 - Dados climáticos do Capão do Leão referentes aos meses em que houve o cultivo de brócolis nos experimentos 1 (Verão 2014), 2 (Inverno 2014) e 3 (Inverno 2015)	70

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Datas de transplante, florescimento, colheita e períodos de estresse hídrico em plantas pertencentes ao primeiro experimento	33
Tabela 2 - Parâmetros de tamanho das inflorescências de brócolis, através das colheitas do verão de 2014, cultivados sobre tensão regular de água no solo e de estresse.....	45
Tabela 3 - Parâmetros de tamanho de brócolis cultivados sobre tensão regular de água no solo e de estresse colhidos em fevereiro de 2014 (Colheita 1) e março de 2014 (Colheita 2).....	45
Tabela 4 - Ângulo Hue ($^{\circ}$ h) anteriormente ao armazenamento de floretes de brócolis das duas colheitas do Experimento 1, cultivados sob aporte hídrico regular e estresse.....	46
Tabela 5 - Ângulo Hue ($^{\circ}$ h) de brócolis tratados com radiação UV-C após 7 dias de armazenamento refrigerado a 4°C colhidos em fevereiro de 2014 (Colheita 1) e março de 2014 (Colheita 2)	47
Tabela 6 - Açúcares redutores (mmol de glicose.kg ⁻¹) de brócolis cultivados com aplicação de 0, 7 e 10 kJ.m ⁻² de UV-C colhidos em fevereiro de 2014 (Colheita 1) e março de 2014 (Colheita 2) aos 7 dias de armazenamento	50
Tabela 7 - pH de plantas de brócolis cultivadas com aplicação de 0, 7 e 10 kJ.m ⁻² de UV-C colhidos em fevereiro de 2014 (Colheita 1) e março de 2014 (Colheita 2).....	51
Tabela 8 - Atividade de mirosinases (mol de glicose.kg ⁻¹ de proteína) de brócolis cultivados com aplicação de 0, 7 e 10 kJ.m ⁻² de UV-C colhidos em fevereiro de 2014 (Colheita 1) e março de 2014 (Colheita 2).....	54
Tabela 9 - Teor de isotiocianatos (mmol.kg ⁻¹) brócolis cultivados com aplicação de 0, 7 e 10 kJ.m ⁻² de UV-C colhidos em fevereiro de 2014 (Colheita 1) e março de 2014 (Colheita 2).....	56
Tabela 10 - Parâmetros médios de tamanho das inflorescências de brócolis, através das colheitas dos invernos de 2014 e 2015, cultivados sobre tensão regular de água no solo e de estresse	57
Tabela 11 - Diâmetro inferior (cm) de brócolis cultivados sobre tensão regular de água no solo e estresse colhidos no inverno de 2014 (Experimento 2) e 2015 (Experimento 3).....	57

Tabela 12 - Potencial osmótico durante 15 dias de armazenamento de brócolis cultivados sobre tensão regular de água no solo e estresse colhidos no inverno de 2014 (Experimento 2) e 2015 (Experimento 3).....	58
Tabela13 - Ângulo Hue ($^{\circ}$ h) de brócolis cultivados sobre tensão regular de água no solo e estresse colhidos no inverno de 2014 (Experimento 2) e 2015 (Experimento 3) anteriormente ao armazenamento.	58
Tabela 14 - Clorofilas e carotenoides de brócolis cultivados com e sem estresse hídrico e colhidos nos invernos de 2014 (Experimento 2) e 2015 (Experimento 3)...	60
Tabela 15 - Teores de clorofilas (a e b) e de carotenoides aos 7 dias de armazenamento de brócolis submetidos a radiação UV-C colhidos em outubro de 2014 (Experimento 2) e 2015 (Experimento 3).....	60
Tabela 16 - Açúcares redutores ($\text{mmol de glicose.kg}^{-1}$) de brócolis cultivados sob aporte hídrico regular e estresse colhidos em outubro de 2014 (Experimento 2) e 2015 (Experimento 3).....	61
Tabela17 - pH de brócolis cultivados com aplicação de 0, 7 e 10 kJ.m^{-2} de UV-C, aos 7 dias de armazenamento, dos Experimentos 2 e 3	63
Tabela 18 - Atividade de mirosinases ($\text{mol de glicose.kg}^{-1}$ de proteína) de brócolis cultivados sob aporte hídrico regular e estresse após a colheita e aos sete dias de armazenamento, colhidos em outubro de 2014 (Experimento 2) e 2015 (Experimento 3).	65
Tabela 19 – Isotiocianatos (mmol.kg^{-1}) após a colheita de brócolis cultivados sob aporte hídrico regular e estresse colhidos em outubro de 2014 (Experimento 2) e 2015 (Experimento 3).	68
Tabela 20 - Insolação e radiação total em quinze dias anteriores às colheitas realizadas nos experimentos 1, 2 e 3.....	71

Sumário

1 Introdução	15
1.1 Hipóteses	16
1.2 Objetivo	16
2 Revisão de literatura.....	16
2.1 Ativação de respostas a estressores abióticos.....	16
2.2 Redução do aporte hídrico	19
2.3 Radiações Ultravioleta.....	21
2.4 Metabólitos e análises de conservação de brócolis.....	23
2.4.1 Clorofilas e Carotenoides	24
2.4.2 Ácido Ascórbico.....	25
2.4.3 Glicosinolatos e Isotiocianatos	26
2.2.4.1 Análises de glicosinolatos e isotiocianatos	29
3 Materiais e Métodos	31
3.1 Condições de estresse pré-colheita e caracterização dos solos por experimento	31
3.1.1 Experimento 1 – 2013/2014 verão.....	32
3.1.2 Experimento 2 – 2014 inverno.....	35
3.1.3 Experimento 3 – 2015 inverno.....	37
3.2 Condições de estresse pós-colheita.....	38
3.3 Análises.....	40
3.3.1 Análises de crescimento.....	40
3.3.2 Potencial osmótico	41
3.3.3 Análise de cor da superfície	41
3.3.4 Teor de carotenoides e clorofilas a e b.....	41
3.3.5 Açúcares redutores	42
3.3.6 pH e acidez total.....	42
3.3.7 Ácido Ascórbico.....	42
3.3.8 Atividade de mirosinases.....	43
3.3.9 Glicosinolatos totais e isotiocianatos	44
3.3.10 Análise estatística.....	45
4 Resultados	45
4.1 Experimento 1 – 2013/2014 verão	45

4.1.1 Análises de crescimento.....	45
4.1.2 Análise de Cor Superficial	46
4.1.3 Clorofilas a e b e carotenoides	47
4.1.4 Açúcares redutores	49
4.1.5 Acidez e pH.....	51
4.1.6 Ácido ascórbico	51
4.1.7 Atividade de mirosinases.....	53
4.1.8 Glicosinolatos totais.....	54
4.1.9 Isotiocianatos	55
4.2 Experimento 2 e 3 – 2014 e 2015 inverno.....	56
4.2.1 Análises de crescimento.....	56
4.2.2 Potencial osmótico	57
4.2.3 Cor.....	58
4.2.4 Carotenoides e clorofilas a e b	59
4.2.5 Açúcares Redutores	61
4.2.6 pH.....	62
4.2.7 Ácido ascórbico	63
4.2.8 Atividade de Mirosinases.....	65
4.2.9 Glicosinolatos totais.....	66
4.2.10 Isotiocianatos	67
5 Discussão.....	68
5.1 Análises de crescimento.....	68
5.1.1 Efeitos do Estresse Hídrico	68
5.2 Potencial Osmótico.....	72
5.2.1 Efeitos do Estresse Hídrico	72
5.3 Cor e clorofilas a e b e carotenoides	72
5.3.1 Efeitos do Estresse Hídrico	72
5.3.2 Efeitos da Radiação UV-C.....	74
5.4 Açúcares redutores	76
5.4.1 Efeitos do Estresse hídrico.....	76
5.4.2 Efeitos da Radiação UV-C.....	77
5.5 pH.....	77
5.5.1 Efeitos do Estresse Hídrico	77
5.5.2 Efeitos da Radiação UV-C.....	78

5.6 Ácido Ascórbico.....	78
5.6.1 Efeitos do Estresse Hídrico	78
5.6.2 Efeitos da Radiação UV-C.....	79
5.7 Miosinases	80
5.7.1 Efeitos do Estresse Hídrico	80
5.7.2 Efeitos da Radiação UV-C.....	81
5.8 Glicosinolatos	82
5.8.1 Efeitos do Estresse Hídrico	82
5.8.2 Efeitos da Radiação UV-C.....	84
5.9 Isotiocianatos	84
5.9.1 Efeitos do Estresse Hídrico	84
5.9.2 Efeitos da Radiação UV-C.....	85
6 Conclusões Gerais	86
Referências	87

1 Introdução

As mudanças climáticas e populacionais que vem ocorrendo no planeta exigem que sejam criadas alternativas para conciliar o crescimento da produção agrícola a condições desfavoráveis de cultivo, dentre as quais, a menor disponibilidade de água, a maior incidência de radiações UV, os períodos de temperaturas mais elevadas durante o cultivo, solos com baixa fertilidade, dentre outras (ROSENZWEIG et al., 2014). Muitas dessas condições quando em doses horméticas, moderadas, ativam o metabolismo de defesa das plantas, que passam a sintetizar diversos compostos necessários para protegê-las de danos extremos que impossibilitariam a realização de funções básicas de seus organismos, como a produção de biomassa (SUDHA; RAVISHANKAR, 2002). Além da função de defesa do vegetal, esses compostos podem possuir atividades antioxidantes, antimicrobianas e anticarcinogênicas, motivo pelo qual é incentivado o seu consumo (HUANG; CAI; ZHANG, 2009). Assim, condições moderadas de estresse, que aliam maior produção de metabólitos de defesa com baixa diminuição da produtividade vem sendo alvos de estudos (ZOBAYED; KOZAI, 2005; LEVYA et al., 2013).

Dentre esses compostos de defesa, os glicosinolatos são sintetizados em plantas pertencentes às brássicas, que incluem hortaliças de relevância econômica como brócolis, couve e repolho. Para exercer atividade biológica, esses compostos necessitam passar por uma hidrólise da glicose ligada ao enxofre presente em sua estrutura, ocorrendo assim a liberação dos isotiocianatos. Pesquisas relacionam os isotiocianatos a atividades benéficas à saúde tais como anti-inflamatória e anticancerígena (HANSCHEN et al., 2014).

Com o intuito de determinar o efeito da aplicação de condições horméticas de estresse hídrico e de radiação UV-C durante a pré e pós-colheita, respectivamente, sobre a qualidade metabólica de brócolis (*Brassica oleracea* L. var. *italica* cv. Legacy) foi instalado experimento a campo durante o verão de 2014 e os invernos de 2014 e 2015.

1.1 Hipóteses

Compostos relacionados à conservação pós-colheita são melhor preservados na hortaliça cultivada sob aporte hídrico reduzido e submetidas à aplicação de radiação UV-C.

Os estresses hídrico e por radiação UV-C induzem o acúmulo de pigmentos, ácido ascórbico, glicosinolatos e de isotiocianatos em floretes de brócolis.

Os estresses hídrico e por radiação UV-C aumentam a atividade de enzimas envolvidas na conversão de glicosinolatos à isotiocianatos.

1.2 Objetivo

Avaliar o efeito da redução de aporte hídrico e aplicação de radiação UV-C sobre compostos relacionados à conservação pós-colheita e qualidade funcional de brócolis, após a colheita e ao longo do armazenamento.

2 Revisão de literatura

2.1 Ativação de respostas a estressores abióticos

A disponibilidade de elementos químicos aos organismos, para utilização como substratos para as reações necessárias ao seu metabolismo, pode ser alterada por processos físicos e geológicos do planeta, assim como pela atividade de outros organismos vivos (ZEPP et al., 2011). Dentre essas transformações, a maior incidência de radiação ultravioleta, principalmente na forma de radiação UV-B, devido às alterações climáticas intensificadas no último século, pode modificar os teores de metabólitos produzidos pelas plantas, com alterações de biomassa e produção de outros compostos em quantidades diferentes das habituais. Porém, outras condições ambientais, como a menor disponibilidade de água para o cultivo e concentrações mais elevadas de dióxido de carbono, podem agir como fatores que tornam menos intensos os efeitos do aumento de incidência de radiação (UNEP, 2003).

Há previsões de que a menor disponibilidade de água potável em algumas regiões torne necessária uma alteraçãoda produção vegetal para o emprego de sistemas que utilizem pouca ou nenhuma irrigação. Modelos climatológicos para o final do século XXI consideram alguns fatores que poderiam levar a menor necessidade de água durante o cultivo, como o crescimento mais rápido dos vegetais devido a temperaturas mais elevadas, otimização da produção de áreas em que há disponibilidade de água para irrigação. Além destes, o aumento da evapotranspiração acompanhado pelos declínios de precipitação, que são os principais efeitos considerados em projeções de consumos futuros de água, podem ser neutralizados ou revertidos, já que concomitantemente pode ocorrer umaredução nos períodos de desenvolvimento de vegetais por condições como o aumento concomitante da concentração de dióxido de carbono durante o cultivo (ELLIOT et al., 2014).

Além dos efeitos diretos da menor disponibilidade de água para os vegetais, deve ser considerado que solos de todos os continentes cultiváveis têm um decréscimo em carbono e nitrogênio quando há aumento da aridez, além de aumento de fósforo, causando um decréscimo da razão C:P e N:P. Tal composição ocasiona, ainda, baixa absorção de nutrientes pelas plantas (WARDLE, 2013) e representa uma alteração adicional das condições habituais de cultivo.

A tolerância à seca foi obtida por adaptações de muitos vegetais ao longo do processo evolutivo, para promover um melhor aproveitamento da água na fotossíntese (GROSS et al., 2013). Atualmente, ferramentas biotecnológicas como a transgênese podem ser utilizadas para a obtenção de plantas tolerantes (SHAH; SINGH; RAI, 2015). Uma outra estratégia utilizada é a determinação das doses de fatores estressores abióticos, como a concentração de sais ou o período de exposição à falta de irrigação, que são extremas e levam à perda de turgor e necrose do vegetal, assim como das doses em que é possível obter plantas com boa qualidade (ACOSTA-MOTOS et al., 2017), possibilitando assim o cultivo de espécies com uma quantidade reduzida de água que não chegue a prejudicar a planta.

Doses moderadas do agente estressor, no geral, não acarretam em perdas de produtividade. Em cáqui, a redução do aporte hídrico durante a primavera pode reduzir a queda de frutas, que é um fator responsável por perdas, porém é acompanhada de diminuição do peso dos frutos (BADAL et al., 2013). O ideal seria a busca de doses do estressor que não prejudiquem o crescimento do vegetal, porém

que promovam o aumento dos compostos de defesa, denominadas dedoses horméticas.

A resposta ao estresse envolve o reconhecimento do fator estressante, tal como temperaturas e quantidades de nutrientes extremas, mudanças osmóticas como seca e salinidade, entre outras. Tal percepção é tarefa direta ou indireta da membrana plasmática, realizada por proteínas receptoras ali encontradas, gerando-se moléculas como espécies reativas de oxigênio (ROS) (RAORANE et al., 2013).

A formação de espécies reativas de oxigênio durante a redução do O_2 à H_2O tem início por um excesso de energia adquirido pela molécula de oxigênio que pode formar oxigênio singlete (1O_2), que por etapas espontâneas podem produzir também o radical superóxido (O_2^-), radical hidroperoxil (HO_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila (OH^-) (VRANOVÁ; INZÉ; BREUSEGEM, 2002). A produção de tais espécies nos cloroplastos, peroxissomos, mitocôndria, membrana plasmática e apoplastos já foram relatadas. Porém enzimas antioxidantes também se localizam nessas diferentes organelas, como superóxido dismutases (SOD), que agem sobre o radical superóxido formando peróxido de hidrogênio, que por sua vez é substrato para as enzimas catalase (CAT) e ascorbato peroxidase (APX) (KAR, 2011). Outro mecanismo de defesa das plantas é a produção intensificada de antioxidantes após sinalização de aumento de ROS. O ciclo ascorbato-glutationa, por exemplo, é outro meio de detoxicação do peróxido de hidrogênio, que envolve reações de quatro enzimas responsáveis pela oxidação e posterior redução das moléculas (DEL RÍO et al, 2012). O mecanismo de resposta ao estresse biótico ou abiótico é diferente, pois no primeiro há ativação de NADPH oxidase, enzima que age como uma fonte alternativa de elétrons que ocasiona a formação de ROS. Concomitantemente, há a supressão de APX e CAT, aumentando a concentração de peróxido de hidrogênio e demais substâncias reativas, ativando outros mecanismos de defesa. Em situações de estresse abiótico, há o aumento da produção de ROS pelos cloroplastos e mitocôndria, porém há também o aumento da atividade de enzimas como APX e CAT (MITTLER, 2002).

O aumento da produção de ROS pode, ainda, ativar a hiperpolarização de canais de cálcio presentes nas membranas celulares, alterando a concentração do elemento no citosol (KAR, 2011). Deste modo, o íon cálcio pode atuar como um mensageiro secundário, pois quando ocorrem alterações na sua concentração intracelular, ele se liga à proteínas quinases cálcio-dependentes, alterando sua

conformação e deste modo liberando o sítio ativo da enzima e promovendo sua atividade, havendo assim o reconhecimento do estresse pela planta (SCHULZ; HERDE; ROMEIS, 2013). Além disso, após o reconhecimento da sinalização do íon, ocorre a transdução do sinal e ativação de cascatas de fosforilação, que por sua vez resultam em ativação de rotas de compostos de defesa (LIESE; ROMEIS, 2013) via fatores de transcrição que regulam diferentes rotas metabólicas, tais como de compostos relacionados à fotossíntese, suprimento de NADPH, *heat-shock proteins* e outros (MITTLER, 2002).

2.2 Redução do aporte hídrico

O estresse hídrico pode ocorrer na natureza de maneira gradual, quando o declínio de água no solo ocorre ao longo de um determinado período, ou intensificada; tais condições podem também ser impostas na agricultura pelo controle da irrigação. Apesar de condições de redução de aporte hídrico serem habituais durante o desenvolvimento das plantas, podem afetar sua sobrevivência e produção de biomassa (SUDHA; RAVISHANKAR, 2002). Tal fenômeno ocorre porque a taxa de transpiração é reduzida quando as plantas estão em situação de estresse, ocorrendo o fechamento estomático e por consequência uma menor taxa de carboxilação (ZHOU et al., 2013). Com a diminuição deste processo, diminui a fixação de CO₂ e a subsequente síntese de compostos orgânicos carbonados (WALTER; ROSA; STRECK, 2015).

O estresse provocado pela presença de sais, seca ou frio possivelmente causa mudanças osmóticas e no turgor nos vegetais, envolvendo proteínas quinase ativadas por mitógenos (MAPK), ativadas por estresse hiperosmótico e hiposmótico, que por cascata de sinalização ativam alguns de seus genes (ZHU, 2001). Quando submetidos ao estresse hídrico, muitos vegetais têm as rotas de espécies reativas ao oxigênio (ROS) ativadas, o que ativa rotas de metabólitos especializados e enzimas que reagem com tais espécies (BOARETTO et al., 2014). A atividade enzimática de polifenoloxidasas de alface é aumentada em níveis de irrigação superiores, de 400 e 300 mm, enquanto plantas cultivadas com 200 e 100 mm há um aumento de compostos fenólicos e diminuição de atividade e percentual de

enzimas ativas, o que faz com que as plantas cultivadas sob reduzido aporte hídrico apresentem escurecimento mais lento (LUNA et al., 2012).

Em termos de pressão de água para o cultivo de plantas, Xia et al. (2007) consideraram que as condições de 0-20 kPa, 20-40 kPa e 60-80 kPa correspondem ao nível normal de água, estresse moderado e estresse intenso, respectivamente, para o cultivo de sementes de “amur corktree” (*Phellodendron amurense*). Esta espécie vegetal é originária da Ásia e seu interesse reside na utilização do floema pela medicina tradicional chinesa. Nessa cultura, o peso e o tamanho das mudas diminuem à medida que se intensifica a condição de estresse e diminuem o teor de alguns alcaloides de mudas colhidas após 120 dias. O alcaloide berberina, que é majoritário entre os estudados, diminui significativamente apenas sob condições intensas de estresse.

O estresse hídrico pode intensificar as respostas das plantas a condições de estresses subsequentes. Condições de seca de 50% da capacidade de campo, em comparação com o controle, irrigado a 100% da capacidade de campo, para o cultivo de populus (*Populus kangdingensis*; *P. cathayana*) diminuem significativamente o peso e a área das plantas, porém estes tratamentos combinados à aplicação de radiação UV-B resultam em plantas com dimensões ainda menores do que as somente cultivadas sob baixo aporte hídrico. Com relação às enzimas antioxidantes, os tratamentos combinados aumentam a atividade de SOD e APX no mesmo nível que o tratamento UV-B isolado (REN et al., 2007).

Ayas, Orta, Yazgan (2011) aplicaram cinco níveis de irrigação crescentes, de 70 até 522 mm de água, durante o cultivo de brócolis por gotejamento. Dentre os principais resultados, a altura das cabeças de brócolis teve diferença significativa apenas nos níveis com menor irrigação (70 mm). O peso dos brócolis não diferiu significativamente quando se diminuiu a irrigação a até 394 mm de água, assim como o diâmetro das inflorescências e matéria-seca (AYAS; ORTA; YAZGAN, 2011). Em brócolis cultivados com tensões de água no solo de 15 até 90 kPa, também submetidos à irrigação por gotejamento, há uma diminuição linear na massa fresca de brócolis a medida que aumenta a tensão de água, com dados que se ajustam a uma reta com R^2 superior a 0,98 (TANGUNE, 2012).

Cogo et al. (2011), pesquisando o efeito do cultivo de brócolis sob quantidade normal e reduzida de água no solo, reportaram que o estresse proporcionado com tensão de água de 0,4 MPa resultou em melhor preservação da

cor, com menor diminuição do ângulo Hue, além de maior atividade antioxidante, teor de ácido ascórbico e 5-metil-tetrahidrofolato. O estresse hídrico promoveu também o aumento de citocininas zeatina e zeatina ribose, apesar do efeito negativo no tamanho da hortaliça (ZAICOVSKI et al., 2008). Folhas de plantas de brócolis submetidas a condições de seca média e alta levaram a um aumento no teor de compostos da rota dos glicosinolatos como glicorafanina, 4-hidróxi-glicobrassicina, 4-metóxi-glicobrassicina, progoitrina e glicobrassicina (TARIQ et al., 2013).

De modo geral, o estresse hídrico está relacionado com diminuição de rendimento de culturas. Entretanto, benefícios em termos de composição de metabólitos nas plantas cultivadas com aporte hídrico reduzido já foram relatados, de modo que, sendo possível encontrar níveis em que não se observem perdas elevadas de biomassa, sua utilização pode resultar na obtenção de hortaliças com maiores teores de antioxidantes e outros compostos com atividades *in vivo*.

2.3 Radiações Ultravioleta

As radiações ultravioleta são divididas de acordo com o comprimento de onda em UV-A (400-315 nm), UV-B (315-280 nm) e UV-C (menor que 280 nm). Na natureza, apesar de haver um aumento da presença de radiação UV-B devido às mudanças climáticas, há predominância da radiação UV-A, que pelo maior comprimento de onda é mais penetrante na atmosfera que as demais (MORREY et al., 1991). A radiação UV-A é pouco absorvida pelas células vivas, tendo menor capacidade de causar danos ao DNA. Ela possui reduzida capacidade antimicrobiana, ainda que possa ser usada para esse fim por facilitar a oxidação de ácidos graxos da membrana celular e aumentar a formação de peróxido de hidrogênio como mecanismo de defesa das células após sua absorção por cromóforos ali presentes (BINTSIS et al., 2000).

Já a radiação UV-C, quase totalmente filtrada pela atmosfera terrestre, vem sendo utilizada em alimentos como uma maneira de aumentar o tempo de conservação pela capacidade de diminuir a população de micro-organismos contaminantes, preservar características sensoriais de hortaliças, frutas e produtos derivados, além de aumentar a concentração de diversos antioxidantes (ALLENDE; ARTÉS, 2003; FREITAS et al., 2015; UNLUTURK; ATILGAN, 2015), causando

alterações de resposta de diversos genes associados tanto ao metabolismo geral (primário) quanto ao especializado (secundário) (XI et al., 2014).

Em geral, uma maior efetividade para ação em organismos vivos é encontrada no comprimento de onda de 254 nm, na região do UV-C (BINTSIS et al., 2000). A dose de radiação UV-C mais eficiente para ação desinfetante depende do tipo de superfície em que será aplicada (alimentos com características mais planas ou circulares) e tipo de micro-organismo a ser eliminado (BIRMPA; SFIKA; VANTARAKIS, 2013). Esta radiação possui a limitação de ser uma forma não penetrante, mais utilizada para a descontaminação de superfícies, ar e alimentos líquidos (SOMERS; SITES; MUSGROVE, 2009).

A radiação UV pode também ser responsável pela inativação enzimática, tal como de polifenoloxidasas, ainda que na presença de pigmentos possa haver uma inativação mais lenta pela absorção da energia radiante por estes (FALGUERA et al., 2012). O conteúdo de proteínas ao longo do armazenamento por 5 a 20 dias de frutos de tomate é aumentado pela aplicação de radiações UV-B e UV-C em relação aos não aplicados, porém ocorre também menor perda de massa, maior retenção de firmeza, sólidos solúveis e açúcares solúveis (LIU et al., 2012), podendo estar relacionada à inativação de enzimas que agem sobre estes compostos, cuja degradação está relacionada à senescência.

A aplicação de radiação UV-C mostrou-se como meio eficaz para manter a coloração de brócolis, com menor atividade de enzimas que agem degradando a clorofila, além de diminuir a taxa de respiração ao longo de armazenamento a 20 °C e aumentar significativamente a quantidade total de compostos fenólicos, porém sem diferenças significativas no teor de flavonoides (COSTA et al., 2006).

Doses de radiação UV-C já aplicadas a brócolis variaram de 1,5 a 15 kJ.m⁻² (COSTA et al., 2006; LEMOINE et al., 2008; BÜCHERT; CIVELLO; MARTÍNEZ, 2011; MARTÍNEZ-HERNÁNDEZ et al., 2011; GOMEZ-LOBATO; CIVELLO; MARTÍNEZ., 2012). De modo geral, quando aliada ao emprego de tratamento térmico, pode contribuir para preservar a cor e características organolépticas (LEMOINE et al., 2008). Doses intermediárias aumentam a preservação e o teor de compostos fenólicos, sendo que as melhores doses para preservação de cor foram de 7 kJ.m⁻² e 10 kJ.m⁻². Doses mais altas, de 14 kJ.m⁻² e 15 kJ.m⁻², resultam em perdas de qualidade e menor vida de prateleira pela mudança na cor. A alteração ocorre provavelmente pela liberação de Mg²⁺ da molécula de clorofila, que é um

composto diretamente relacionado com a qualidade da hortaliça (COSTA et al., 2006; MARTÍNEZ-HERNÁNDEZ et al., 2011).

2.4 Metabólitos e análises de conservação de brócolis

O brócolis (*Brassica oleracea* L. var. *italica*) pertence à família Brassicaceae, que inclui espécies vegetais importantes economicamente e também o organismo modelo *Arabidopsis thaliana*. Muitos membros desta família possuem características de acumulação de compostos bioativos como carotenoides, ácido ascórbico e glicosinolatos (ROBBINS et al., 2005; MANH; REYES, 2012), discutidos a seguir. Anteriormente, foram relatados diversos efeitos de aumento dos teores destes compostos pelos tratamentos propostos neste estudo.

Porém, um dos principais aspectos relacionados à pós-colheita da hortaliça é a ocorrência de senescência avançada, consumindo água e outros metabólitos durante o armazenamento (HASPERUÉ; CHAVES; MARTÍNEZ, 2011). Tal processo é detectado principalmente pelo amarelecimento, devido à degradação de clorofilas. Concomitantemente, são observadas perdas de turgor e de açúcares, ácidos orgânicos e proteínas (EASON et al., 2007). O cultivo em aporte hídrico reduzido e aplicação de radiações também foram relacionados nesta revisão com o aumento do período de conservação de brócolis.

Os métodos utilizados na literatura para determinar a vida de prateleira incluem a análise sensorial, através de parâmetros tais como firmeza, coloração verde/amarelada e compactação das inflorescências (WURR et al., 2002). Porém, é usual sua substituição pela determinação da cor e cálculo de ângulo Hue a partir das coordenadas L, *a e *b, uma vez que a técnica apresenta resposta objetiva e é de mais fácil execução. Diversos trabalhos utilizam como parâmetro para determinação da vida de prateleira o declínio em 30% do valor de ângulo Hue observado logo após a colheita (JIN et al., 2015; YUAN et al., 2010; KU; WILLS, 1999). Os valores de ângulo Hue próximos ao eixo de 180° em um gráfico correspondem à coloração verde, enquanto valores próximos a 90° representam a coloração amarela. Entre esta faixa de valores, de 90° a 180°, valores mais altos de ângulo Hue são observados em brócolis com maior conteúdo de clorofilas (COSTA et al., 2006).

2.4.1 Clorofilas e Carotenoides

A estrutura tetrapirrólica encontrada nas clorofilas é sintetizada a partir do glutamato, produzindo ácido aminolevulínico que, após reações sequenciais, produz fotoforirina IX. A partir daí, Mg-quelatações catalizam a inserção de Magnésio na molécula, produzindo Mg-protoporfirina e, sequencialmente, protoclorofilida, que é reduzida a clorofilida também por via enzimática (TERRY;KENDRICK, 1999). Já a cadeia hidrofóbica é sintetizada a partir de geranylgeranyl difosfato, um terpeno envolvido na biossíntese de outros compostos, como carotenoides e tocoferóis. A ação de geranylgeranyl reductase produz clorofila fitilada. A degradação da molécula pode ocorrer pela perda de Magnésio, produzindo feofitina, que por sua vez resulta em fitol após a ação de feofitinasas; o fitol pode ainda ser produzido diretamente a partir da molécula de clorofila pela ação de clorofilases, acarretando na perda de clorofilida (ZHANG et al., 2014, ZHANG et al., 2015).

As moléculas de clorofila são responsáveis pela absorção de energia solar nos fotossistemas, que pode ser convertida em energia bioquímica durante a fotossíntese ou ser dissipada para fotoproteção, ou ainda reemitida como fluorescência (EVANS, 2013; FRYDENVANG et al., 2015).

A formação de ROS durante o processo de fotossíntese ocorre pela transferência de elétrons da cadeia transportadora de elétrons ou de energia de moléculas de clorofila excitadas, à molécula de oxigênio durante a fase fotoquímica. Quando em estresse, o processo é intensificado pela inibição parcial da fotossíntese, e os carotenoides atuam como agentes de *quenching* das moléculas de clorofilas triplete e de oxigênio singlete. Tal processo pode ocorrer pelo ganho de energia a partir das moléculas excitadas, que após é dissipada ao ambiente, ou pela reação de oxidação em sua molécula, reversível apenas por interações com enzimas (RAMEL et al., 2012). Os carotenoides são capazes de agir deste modo pois estão presentes no fotossistema II, complexo que absorve a luz do sol e a transfere para o centro da reação ou dissipa o excesso de energia, por mecanismo de fotoproteção (RUBAN et al., 2007).

A síntese dos carotenoides é originada na rota MEP (2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato) localizada nos plastídeos, a partir de gliceraldeído-3-fosfato e piruvato; as moléculas de isopentenil difosfato (IPP) edimetilalil difosfato (DMAPP) formadas são então condensadas, produzindo geranylgeranyl difosfato. Quando duas destas

moléculas são condensadas, forma-se o fitoeno e, que por ação de diferentes enzimas da rota metabólica, dão origem aos diferentes compostos, tais como licopeno, δ - e α - carotenos e, posteriormente zeinoxantina e luteína ou γ - e β - carotenos, zeaxantina, cantaxantina, astaxantina ou anteraxantina, violaxantina e neoxantina (HOSSAIN, 2011; CAZZONELLI et al., 2010). Os principais carotenoides encontrados em brócolis são luteína, β -caroteno e violaxantina (Figura 1) (ZHANG et al., 2004).

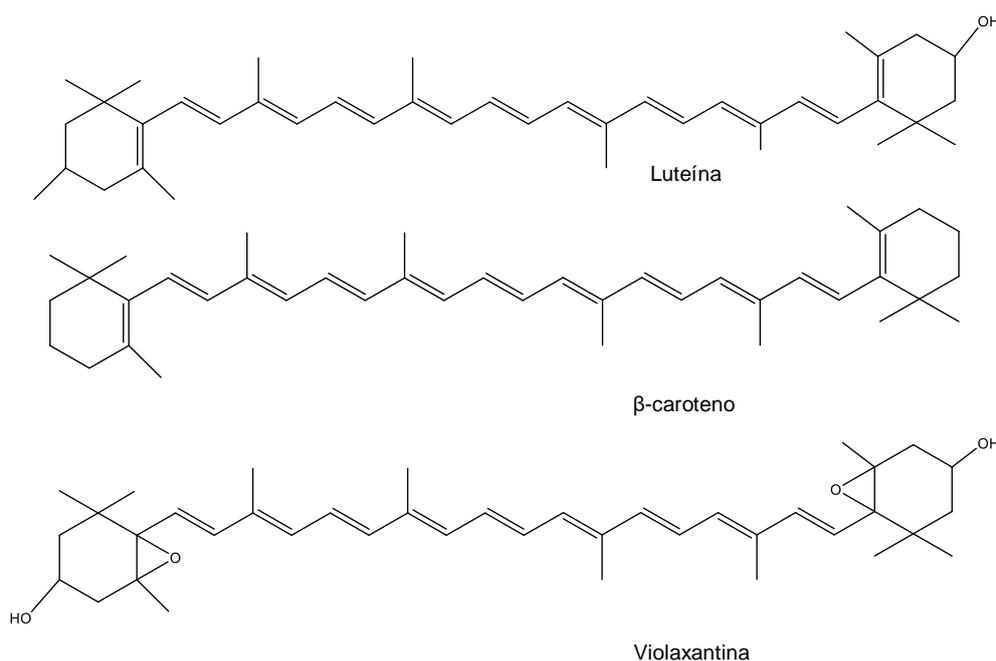


Figura 1 - Estrutura dos carotenoides luteína, β -caroteno e violaxantina

2.4.2 Ácido Ascórbico

Assim como os carotenoides, o ácido ascórbico também está envolvido na detoxificação de ROS, atuando como cofator de enzimas cujas atividades aumentam em situações de estresse. Com esta função, interfere nas atividades de 1-aminocicloprapano-1-carboxilato-oxidase (biossíntese de etileno), giberelina 3- β -dioxigenase (biossíntese de giberelina), timina dioxigenase e pirimidina deoxinucleosídeo (metabolismo de pirimidina), violaxantina de-epoxidase (biossíntese de zeaxantina) e tioglicosídeo glicohidrolase (catabolismo de glicosinolatos) (KHAN; MAZID; MOHAMMAD, 2011).

O ascorbato é o antioxidante majoritário em células vegetais, podendo atuar juntamente com a ascorbato peroxidase (APX) na redução de H_2O_2 citosólico,

produzindo monodehidroascorbato radical (MDHA) e dehidroascorbato (DHA), que pode ser reconvertido a ascorbato por NAD(P)-dependente MDHA redutase e glutatona (GSH)-dependente redutase (SMIRNOFF, 2000).

O ânion L-ascorbato e o ácido dehidroascórbico fazem parte da rota de catabolismo do ácido L-ascórbico (BÁNHEGYI; LOEWUS, 2003) (Figura 2).

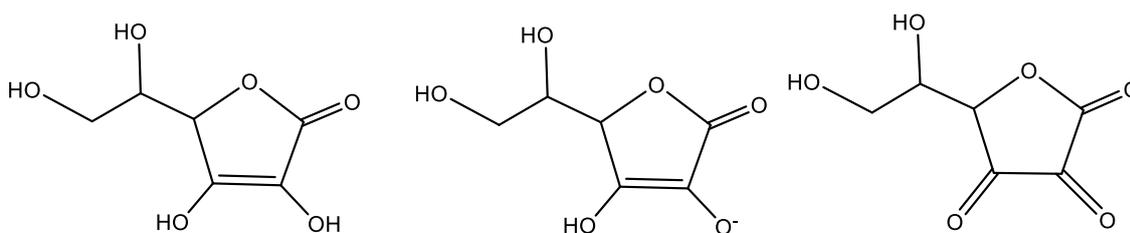


Figura 2 - Estrutura do ácido L-ascórbico, ânion L-ascorbato e ácido dehidroascórbico

O ácido ascórbico pode atuar como antioxidante isoladamente por meio da doação de um elétron, regenerando moléculas que haviam se tornado radicais após ter atuado como antioxidantes, tais como α -tocoferol. A partir de uma série de reações de oxidação, a partir do ácido L-ascórbico são produzidos MDHA, DHA e ácido 2,3-cetoglucônico, quando ocorre a ruptura do anel. A biossíntese do ácido L-ascórbico ocorre a partir de açúcares como D-galactose e D-glicose e de ácidos urônicos (DAVEY et al., 2010).

Os compostos ácido ascórbico e ácido dehidroascórbico são altamente instáveis ao aquecimento, que reduz seus teores a menos da metade do conteúdo original após o cozimento de brócolis e outros vegetais. Além disso, altas temperaturas durante o armazenamento e cortes severos durante a pós-colheita são responsáveis por reduções consideráveis (LEE; KADER, 2000).

2.4.3 Glicosinolatos e Isotiocianatos

A rota metabólica dos glicosinolatos (Figura 3), compostos encontrados em plantas da família Brassicaceae, pode ter sua expressão alterada pelos estresses provocados por fatores bióticos como patógenos e herbívoros, ou abióticos, como temperatura, luz, radiação UV, aplicação de hormônios, uso de fertilizantes e presença de metais (JAHANGIR et al., 2009; MEWIS et al., 2012).

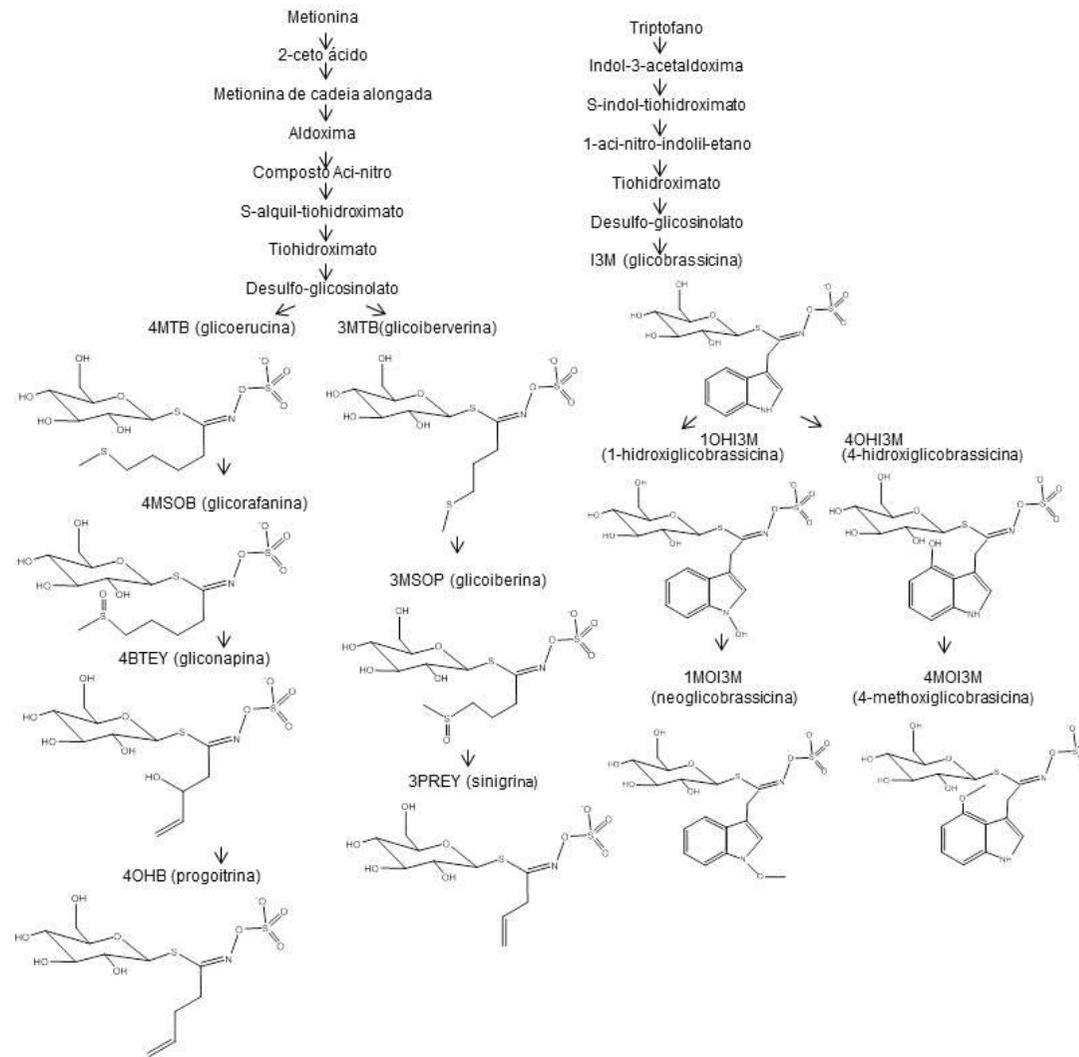


Figura 3 - Rotas de biossíntese de glicosinolatos alifáticos e indólicos provenientes de metionina e triptofano

Fonte: Adaptado de HANSCHEN et al., 2012; LIU et al., 2014

Porém, segundo Rosseto et al. (2013), existem poucos estudos sobre alterações pós-transcricionais e traducionais de enzimas envolvidas nas rotas de glicosinolatos, inclusive de mirosinases, que promovem a hidrólise de glicose dos glicosinolatos gerando subsequentemente isotiocianatos e outros compostos.

Os benefícios causados pelo aumento de glicosinolatos seriam principalmente relativos ao maior potencial bioativo do alimento, uma vez que um dos produtos da hidrólise desses compostos, os isotiocianatos, possuem atividade anticarcinogênica, sendo o sulforafano o principal destes compostos em brócolis (MAHN; REYES, 2012). Alguns outros compostos que podem ser produzidos, dependendo de características intrínsecas do alimento, são tiocianatos, nitrilas, epitionitrilas e tionas (GHAWI; METHVEN; NIRANJAN, 2013).

Mutações nos genes que codificam para as enzimas envolvidas na rota de biossíntese, além de alterar os metabólitos alvo, podem também alterar a formação de hormônios vegetais (GRUB; ABEL, 2006). Segundo Mikkelsen et al. (2003), a rota de formação de glicosinolatos está relacionada aos hormônios ácido salicílico, ácido jasmônico e etileno. Estes compostos têm sua quantidade aumentada em plantas cultivadas sob estresse salino, o que pode ocorrer também em plantas cultivadas com limitação do aporte hídrico (ZAGHDOUD et al., 2012). A perda de função da enzima CYP79F1 em plantas mutantes, responsável pela conversão de dihomometionina (metionina com cadeia alongada) à aldoxima, por exemplo, leva à inativação da formação de glicosinolatos alifáticos, como os provenientes de metionina, e aumento de ácido indol-3-acético e citocininas em *Arabidopsis thaliana* (TANTIKANJANA et al., 2004).

Muitos compostos formados pelas enzimas citocromo P450s, entre as quais as enzimas CYP79, são parte de mecanismos de defesas das plantas contra toxinas e estresses bióticos por insetos e outros herbívoros. A biossíntese destes compostos de defesa tem como sinalizadores metabólitos cujas rotas também possuem P450s, tais como jasmonatos (SCHULER, 2011). Quando não estão em condições adversas, os vegetais armazenam compostos de defesa em sua forma inativa, muitas vezes pela ligação com glicose. Havendo uma ruptura do tecido pela provável ameaça, enzimas agem para

quebrar a ligação com a molécula, o que a torna ativa. Como exemplo, os cianosídeos glicogênicos, também ligados à glicose, possuem a capacidade de, pela quebra da ligação com esta molécula quando entram em contato com β -glicosidases e α -hidroxinitrilolases, liberar cianeto de hidrogênio (HCN), que inativa o complexo citocromo oxidase da respiração celular e é tóxico aos organismos predadores (MORANT et al., 2008; ZAGROBELNY et al., 2004). Já no caso dos glicosinolatos, a presença de enzimas β -tioglicosidases, chamadas mirosinases, nas plantas e microbiota intestinal dos animais que os consomem, propiciam a hidrólise dos mesmos à isotiocianatos (CLARKE et al., 2011). Ku et al. (2016) salientam que hortaliças consumidas cruas podem ser uma fonte potencial de isotiocianatos, uma vez que as mirosinases se encontram intactas, assim possivelmente ativas.

Os principais glicosinolatos presentes em brócolis são glicorafanina e glicobrassicina, que dão origem ao isotiocianato sulforafano e indol-3-carbinol (Fig. 4), respectivamente (JONES et al., 2010).

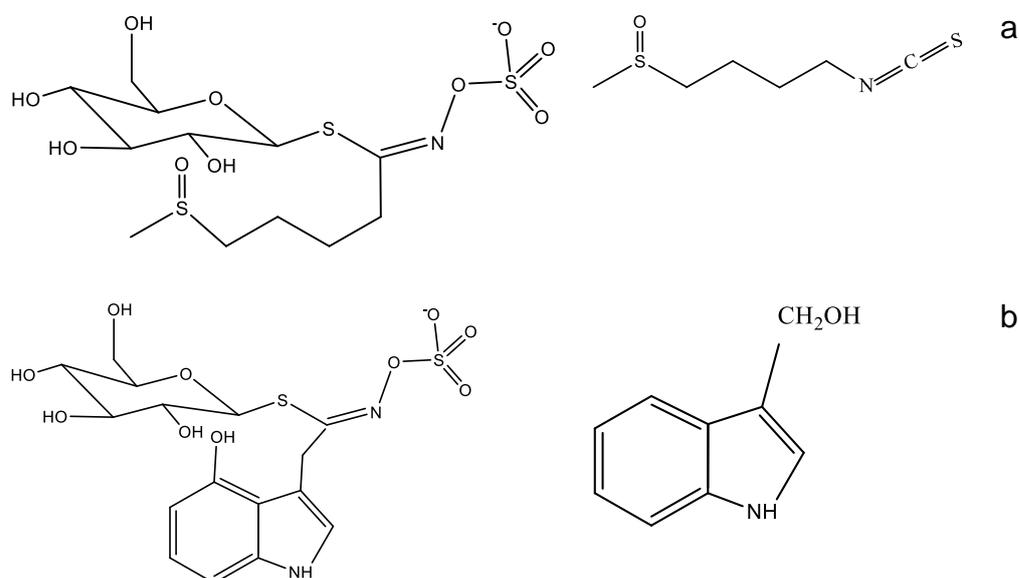


Figura 4 - Glicosinolato glicorafanina e isotiocianato sulforafano (a) e glicobrassicina e indol-3-carbinol (b)

2.2.4.1 Análises de glicosinolatos e isotiocianatos

As técnicas utilizadas para a análise destes compostos incluem cromatografia líquida acoplada a detector UV por arranjo de diodos, em que os

glicosinolatos são analisados em sua forma dessulfatada, após reação realizada por enzimas sulfatases purificadas comerciais (OMIROU et al., 2013; VALLEJO et al., 2003), cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas, para análise de glicosinolatos intactos (ARES et al., 2014;) e de glicosinolatos dessulfatados (JIA et al., 2009; RAMOS et al., 2011) e espectrometria de infravermelho próximo (NIR, do inglês *Near InfraRed spectroscopy*) (HERNÁNDEZ-HIERRO et al., 2014; HERNÁNDEZ-HIERRO et al., 2012) onde é possível determinar o conteúdo total de glicosinolatos, assim como prever sua localização nos vegetais. Em brócolis, concentrações superiores a $10 \mu\text{mol.g}^{-1}$ em matéria-seca são observadas nas extremidades dos floretes (HERNÁNDEZ-HIERRO et al., 2014).

A análise de isotiocianatos totais pode ser realizada por cromatografia líquida e cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (MATERA et al., 2012; CHOI et al., 2004), pela quantificação de 1,3 benzoditiol-2-tiona, produto formado pela reação entre o grupamento C=S pertencente aos diferentes isotiocianatos, tanto alifáticos quanto aromáticos e o reagente 1,2 benzenoditiol (ZHANG, 2012). Neste tipo de técnica, é possível realizar também a determinação dos glicosinolatos totais, promovendo a ação de mirosinases de modo a transformar todos os glicosinolatos presentes nos vegetais em isotiocianatos (GUO et al., 2013).

A análise direcionada de alguns isotiocianatos conjuntamente com seus glicosinolatos precursores, tais como alil e benzil isotiocianatos e sinigrina, sinalbina, (HERZALLAH; HOLLEY, 2012) e de glucorafanina e sulforafano (BUDNOWSKI et al., 2013) pode ser realizada por cromatógrafo líquido acoplado a detector UV-Vis utilizando padrões de todos os componentes desejados para construção de curvas de calibração e identificação do analito através de comparação entre seus tempos de retenção.

3 Materiais e Métodos

3.1 Condições de estresse pré-colheita e caracterização dos solos por experimento

O desenho experimental previa o cultivo da hortaliça sobre três tensões de água no solo – regular, com valor máximo de tensão de água no solo de 15 kPa, e redução de aporte hídrico moderado e intenso, com tensões máximas de 45 e 75 kPa, com delineamento experimental de blocos casualizados com três unidades experimentais de cada um dos três níveis do tratamento pré-colheita (regular, moderado, intenso), sendo considerada uma unidade experimental um canteiro de 12 plantas (experimento verão) ou 20 plantas (experimentos inverno), totalizando 9 canteiros por experimento (Fig. 5). Após a colheita, os brócolis de todas as unidades experimentais seriam minimamente processados a floretes, e receberiam as doses de 0, 7 e 10 $\text{kJ}\cdot\text{m}^{-2}$ de radiação UV-C.



Figura 5 - Cultivo de brócolis em três níveis de tensão de água no solo - 15, 45 e 75 kPa - e esquema demonstrativo (direita abaixo) de processamento dos brócolis de cada unidade experimental a floretes e aplicação de radiação UV-C -0, 7 e 10 $\text{kJ}\cdot\text{m}^{-2}$

Porém, no decorrer dos experimentos, não foram obtidas duas tensões de água no solo que representam valores de estresse, deste modo, foram considerados os brócolis com aporte hídrico reduzido aqueles com tensão de até 75 kPa e sem estresse hídrico aqueles cuja tensão média não ultrapassou 15 kPa. Segundo Tangune (2016), o aumento da tensão de água no solo, de

30 kPa, 45 kPa, 60 kPa, 75 kPa até 90 kPa diminui o tamanho de brócolis em relação às plantas cultivadas sob 15 kPa (condição controle).

As colheitas foram apresentadas como realizadas no verão (fevereiro e março de 2014 – Experimento 1) e no inverno (outubro de 2014 e 2015 – Experimento 2 e 3). Devido à complexidade nas respostas obtidas, optou-se por discutir separadamente os tratamentos como pré-colheita (disponibilidade hídrica) e pós-colheita (aplicação de UV-C). No tratamento pré-colheita, quando similares as respostas em ambas colheitas da estação, os resultados foram apresentados em dois gráficos, um para cada. No tratamento pós-colheita, quando não significativas as diferenças entre os resultados das colheitas 1 e 2 do Experimento 1 ou dos Experimentos 2 e 3, foram tratados como repetições e apresentados em um único gráfico. Quando os efeitos divergiram em todos os casos, os resultados foram apresentados separadamente em tabelas.

3.1.1 Experimento 1 – 2013/2014 verão

Sementes de brócolis (*Brassica oleraceae* L. var. *italica* cv. Legacy) foram colocadas para germinar em 25 de outubro de 2013, transplantadas aos 27 dias de novembro do mesmo ano para canteiros medindo 3 x 1 m, localizados no município de Capão do Leão – RS (31°52'00" S; 52°21'24" O - altitude 13.24 m), espaçamento entre plantas de 50 cm e entre canteiros de 40 cm. O solo possuía a característica de composição 123 g.dm⁻³ de argila, 205 g.dm⁻³ de silte e 672 g.dm⁻³ de areia, além de 28 g.dm⁻³ de matéria-orgânica, com nitrogênio estimado de 1,4 g.dm⁻³, 47,3 mg.dm⁻³ de P; 32 mg.dm⁻³ de K; 3,54 cmol_c.dm⁻³ de Ca, 0,884 cmol_c.dm⁻³ de Mg, pH de 5,5 e CTC 4,5 cmol_c.dm⁻³. A irrigação foi realizada por gotejamento e, anteriormente à formação da inflorescência, manteve-se a tensão de água no solo em nível inferior a 15 kPa, através de controle manual, permitindo que a irrigação fosse realizada sempre que atingida a leitura equivalente a esta tensão. Após esse período, os tratamentos estresse hídrico e controle foram diferenciados, com tensões de água no solo de até 75 e 15 kPa, respectivamente. A irrigação, então, passou a ser aplicada apenas quando os valores de tensão atingiam os valores citados.

Foram utilizados três canteiros em linha reta para cada um dos dois tratamentos (controle e estresse hídrico). Os canteiros continham, cada um, doze plantas, utilizando-se um tensiômetro no canteiro central para o controle das condições de tensão de água no solo. Os brócolis apresentaram crescimento desigual, sendo por este motivo colhidos em duas datas distintas: 18 de fevereiro de 2014 (denominado Colheita 1) e 4 de março de 2014 (denominado Colheita 2). Na Tabela 1 estão as datas pertinentes para o experimento 1, tais como o transplante, florescimento, período em que houve diferenciação entre tratamentos e data de colheita.

Tabela 1 - Datas de transplante, florescimento, colheita e períodos de estresse hídrico em plantas pertencentes ao primeiro experimento

Colheita	Transplante	Florescimento	Estresse Hídrico	Colheita	DSE
1	27/11/13	26/01/14	06 a 12/02/14	18/02/14	6
2	27/11/13	26/01/14	06a 12/02/14; 19a 23/02/14	04/03/14	9

* DSE – Número de dias sem estresse até a colheita

Na Figura 6 estão as tensões de água no solo obtidas para as plantas com estresse hídrico e controle durante os períodos em que houve diferenciação entre os tratamentos, apresentados na Tabela 1.

Para os brócolis colhidos em fevereiro (Colheita 1 do Experimento 1), foram alcançadas tensões de água no solo médias de $72,80 \pm 7,07$ kPa para a condição de estresse hídrico e de $8,19 \pm 5,18$ kPa para o controle durante sete dias, sendo a colheita realizada seis dias após este período de diferenciação de tratamentos. Para os brócolis colhidos em março (Colheita 2 do Experimento 1), as tensões do segundo período de estresse foram de $55,13 \pm 12,03$ kPa e $15,00 \pm 13,20$ kPa, respectivamente, aplicadas por cinco dias, ocorrendo a colheita nove dias após.

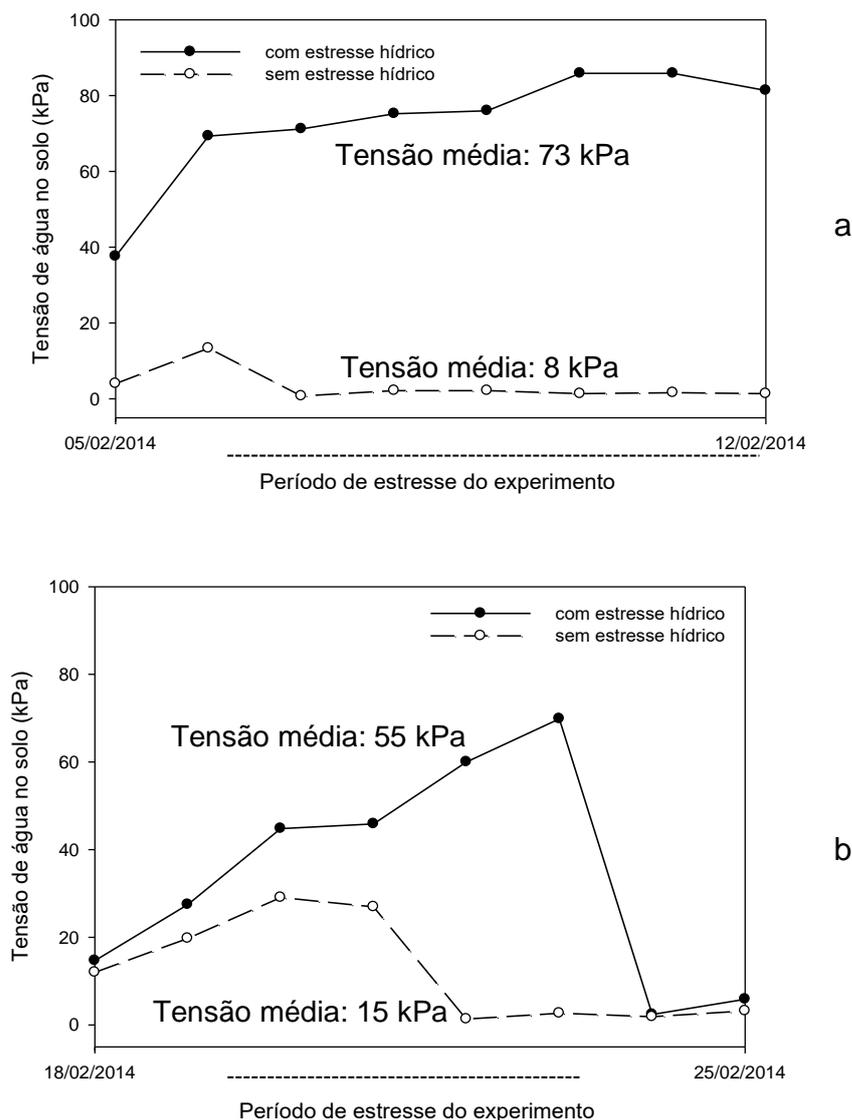


Figura 6 - Tensões de água no solo durante o primeiro cultivo de brócolis, mostrando o primeiro período de estresse (a) e o segundo período de estresse (b).

*A linha pontilhada no extremo inferior do gráfico refere-se aos dias contabilizados para determinação da tensão média do período.

A curva de retenção de água no solo (Fig. 7) foi construída após coleta de amostras de solo dos canteiros centrais dos tratamentos, a 0,2m de profundidade, determinando-se a umidade volumétrica nos pontos de tensões aplicados (0, 10, 60, 102, 340, 1020 e 15300 mm de H₂O) e gerada através do software on-line SWRC Fit (SEKI, 2007), que demonstra o comportamento da umidade do solo em função da tensão de água. A partir desta, as tensões médias de água no solo durante os períodos de estresse já mencionados, de 72,80 kPa e de 8,19 kPa na colheita realizada em fevereiro e de 55,13 kPa e

15,00 kPa na colheita realizada em março, representam percentuais de água no solo de 21 e 28% e de 22 e 26%, respectivamente.

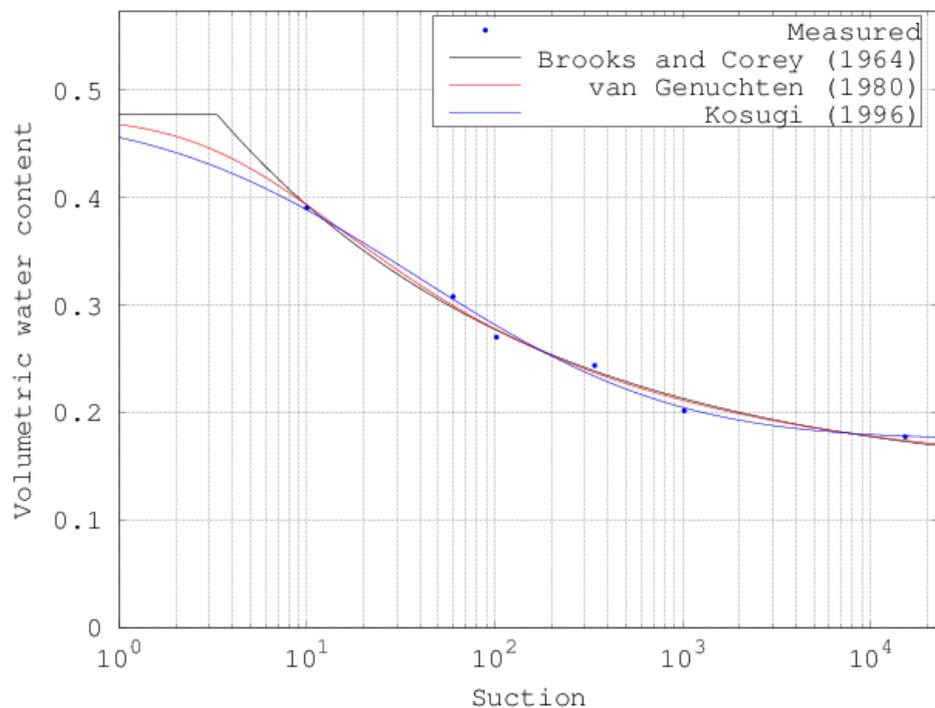


Figura 7 - Curva de retenção de água do solo onde foram desenvolvidos os experimentos, no município de Capão do Leão-RS
 Fonte: <http://swrcfit.sourceforge.net/>, 2015.

3.1.2 Experimento 2 – 2014 inverno

A semeadura ocorreu em 2 de maio de 2014, sendo as plantas transplantadas em 11 de agosto do mesmo ano. A partir deste experimento, diferentemente do anterior, foi aumentada a área de cultivo das plantas, onde cada um dos três níveis do tratamento pré-colheita foi cultivado em um canteiro único, porém com área equivalente a três unidades experimentais de 20 plantas, com espaçamento entre plantas de 0,6 m e entre as duas linhas de plantas por canteiro, também de 0,6 m. Foi aplicada cobertura sobre os canteiros, consistindo de sistema de túnel baixo com arcos de 1,80 m de comprimento, cobertos por polietileno transparente de baixa densidade (PEBD) e plástico mulching como cobertura do solo (Figura 8). De acordo com o Manual de adubação e calagem para o RS, quando fósforo ou potássio se encontram em altas concentrações no solo, recomenda-se a aplicação de 180

e $220 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ de P_2O_5 e K_2O no primeiro cultivo e nos subsequentes. Pela análise do solo realizada durante a condução do experimento 1, o potássio se encontrava em concentrações altas, maiores do que $42 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$, de modo que foi aplicado fertilizante misto constituído por Nitrogênio, Fósforo, Potássio (NPK) que possuía a proporção de 4-10-11, na quantidade de aproximadamente 30 g por sulco aberto para a transferência das mudas de brócolis, ou de $5,5 \text{ kg}\cdot 124 \text{ m}^{-2}$, que representa a área total onde o experimento foi implantado.



Figura 8 - Sistema de plantio de túnel baixo (a) e cobertura do solo com plástico mulching (b) para o cultivo de brócolis nos experimentos (2 e 3) conduzidos no inverno de 2014 e 2015

Foram considerados os valores de tensão de água no solo obtidos a partir do dia 17/10/2014 para o cálculo da média no período de estresse, uma vez que anteriormente a esta data, por problemas no tensiômetro instalado no canteiro central do tratamento de estresse hídrico, não há leituras para o tratamento. Deste modo, as tensões de água no solo médias alcançadas durante o experimento foram $16,15 \pm 5,99 \text{ kPa}$ e $50,93 \pm 13,95 \text{ kPa}$ para os tratamentos sem e com estresse hídrico (Figura 9). A colheita ocorreu dia 27 de outubro de 2014, seis dias após o período de diferenciação entre tratamentos pré-colheita. O surgimento das primeiras inflorescências se deu em 30 de setembro de 2014.

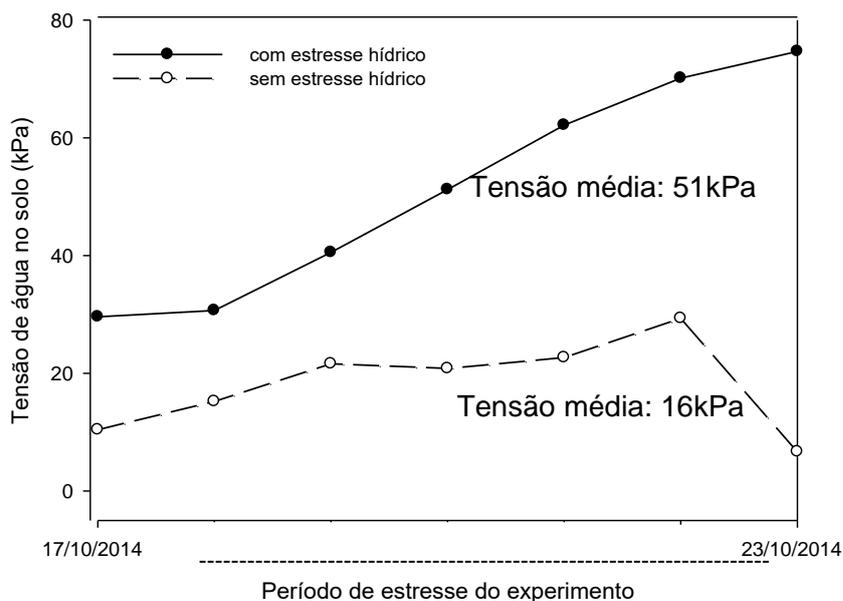


Figura 9 - Tensões de água no solo durante o cultivo de brócolis pertencente ao experimento 2, colhidos em 27 de outubro de 2014. A linha pontilhada no extremo inferior do gráfico refere-se aos dias contabilizados para determinação da tensão média do período

*A linha pontilhada no extremo inferior do gráfico refere-se aos dias contabilizados para determinação da tensão média do período.

As médias de valores de tensão de água no solo quando inseridas na curva de retenção de água determinaram os valores de 22 e 26% de conteúdo volumétrico de água no solo, respectivamente, para os tratamentos estresse hídrico e sem estresse hídrico.

3.1.3 Experimento 3 – 2015 inverno

A semeadura ocorreu em 4 de maio de 2015 e o transplante em 16 de julho de 2015, ocorrendo o florescimento em 25 de setembro e a colheita em 12 de outubro de 2015. Foi analisado o solo anteriormente ao cultivo, que possuía as características de composição de 27 g.dm^{-3} de matéria-orgânica, N estimado de $1,35 \text{ g.dm}^{-3}$, $94,8 \text{ mg.dm}^{-3}$ de P; $40,0 \text{ mg.dm}^{-3}$ de K; $5,4 \text{ cmol}_c.\text{dm}^{-3}$ de Ca, $1,3 \text{ cmol}_c.\text{dm}^{-3}$ de Mg, pH de 5,5 e CTC $7,0 \text{ cmol}_c.\text{dm}^{-3}$. Com o aumento do fósforo em relação à análise anterior do solo, que era de $47,3 \text{ mg.dm}^{-3}$, ao invés de aplicar fertilizante para a complementação com 180 e 200 kg.ha^{-1} de P e K para os cultivos subsequentes de brócolis, aplicou-se fertilizante misto com

proporção de fósforo diminuída, sendo o mesmo constituído por Nitrogênio, Fósforo e Potássio com a proporção 4-10-20, utilizando-se 30 g por sulco e 5,5 kg.124 m⁻² da área total. As tensões de água estão mostradas na Figura 10, possuindo médias de 11,86 ± 5,05 kPa e 49,76 ± 9,64 kPa na semana correspondente ao período de estresse, que equivalem a conteúdos de água no solo de 27 e 22%, para os tratamentos sem e com estresse hídrico. A colheita foi realizada em período de dois dias após o final do período de diferenciação entre os tratamentos.

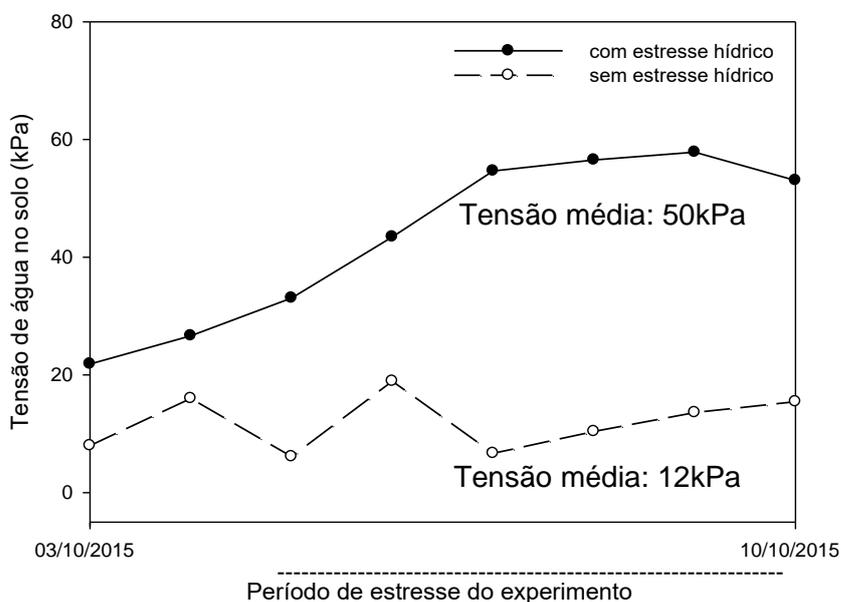


Figura 10 - Tensões de água no solo durante o cultivo de brócolis durante o experimento 3, colhidos em 12 de outubro de 2015

* A linha pontilhada no extremo inferior do gráfico refere-se aos dias contabilizados para determinação da tensão média do período

3.2 Condições de estresse pós-colheita

Após as colheitas, os brócolis foram primeiramente medidos e pesados, conforme descrito posteriormente.

Após, processou-se as inflorescências a floretes com aproximadamente 6 cm de altura, que foram higienizados durante 10 minutos em solução de hipoclorito de sódio 150 ppm com pH ajustado a 5,5. Após, o “pool” de floretes, proveniente dos três canteiros, foi redividido em três partes nos experimentos 2 e 3, que por sua vez foram dispostos em bandejas de modo que a superfície dos floretes recebesse as diferentes doses de radiação UV-C, que representa o

tratamento pós-colheita (Fig. 11). Deste modo, obtiveram-se três bandejas com cada uma das doses de UV-C utilizadas nos experimentos 2 e 3 e, pela quantidade reduzida de plantas, uma bandeja para cada tratamento no experimento 1.



Figura 11 - Disposição dos floretes de brócolis nas bandejas para aplicação de tratamento com radiação UV-C

Para aplicação de radiação UV-C, as bandejas foram dispostas em câmara que possui as dimensões de 95 x 80 X 60 cm distantes 45 cm de lâmpadas UV-C de 30 W Phillips®. A intensidade da radiação foi determinada utilizando um medidor de luz ultravioleta digital “Instrutherm” RS-232 Modelo MRUR-203, sendo calculado o tempo de permanência dos brócolis na câmara para que fossem aplicadas as doses de 0 kJ.m⁻², 7 kJ.m⁻² e 10 kJ.m⁻² de radiação, condições que apresentaram as melhores respostas metabólicas para a cultura segundo a literatura (COSTA et al., 2006; LEMOINE et al., 2008; BÜCHERT; CIVELLO; MARTÍNEZ, 2011; GOMEZ-LOBATO; CIVELLO; MARTÍNEZ, 2012).

Para o armazenamento, as bandejas foram envoltas em filme de PVC transparente de 11,34 mg.m⁻² e mantidas sob refrigeração a 4°C ± 1 °C. O Experimento 1 foi mantido em armazenamento por até 7 dias, realizando-se amostragens a cada 2 dias. Já nos Experimento 2 e 3, pela maior quantidade de plantas em relação ao primeiro experimento, as amostragens foram realizadas nos dias 1, 3, 5, 7, 9, 11 e 15 de armazenamento. As amostras foram liofilizadas (Liofilizador Liotop L 101, Brasil), trituradas em moinho de bola (Marconi® MA 350, Brasil) e novamente liofilizadas para eliminar umidade

possivelmente incorporada durante o processo de moagem. Todas as análises realizadas com o pó obtido foram realizadas em triplicata.

3.3 Análises

3.3.1 Análises de crescimento

Após a colheita, as inflorescências de brócolis foram caracterizadas segundo seu peso, altura e diâmetro inferior e diâmetro superior (Figura 12).

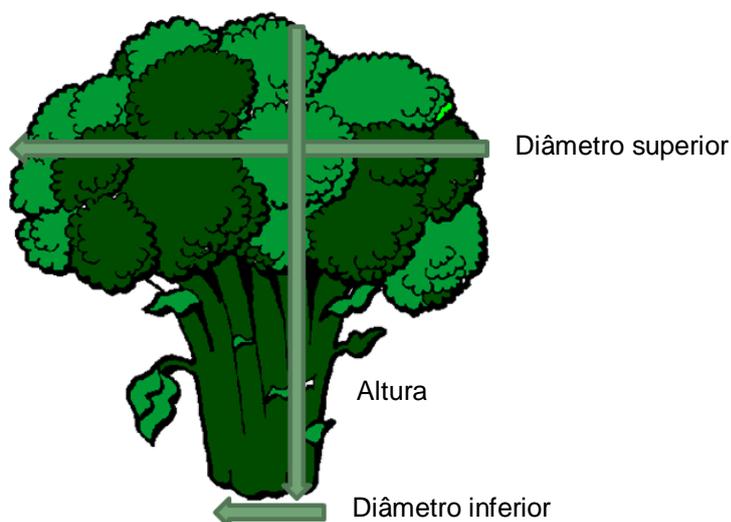


Figura 1 - Demonstração de medição dos diâmetros superior, inferior e altura de brócolis

Para a padronização das medições das inflorescências, foi considerada a parte do pedúnculo a partir da qual se observa a primeira ramificação para formação dos floretes. O diâmetro superior consistiu da distância, em centímetros, entre uma extremidade a outra da inflorescência; o diâmetro inferior, da distância, em centímetros, entre as extremidades do pedúnculo cortado. E a altura, em centímetros, consistiu da distância entre a base do pedúnculo ajustado até os floretes superiores da inflorescência.

3.3.2 Potencial osmótico

Esta análise foi realizada nos brócolis cultivados nos experimentos 2 e 3. Utilizou-se osmômetro de pressão de vapor modelo 5600 VAPRO (Wescor, Logan, Utah, EUA). Amostras das inflorescências de aproximadamente 500 mg foram maceradas em tubos de centrífuga de 1,5 mL com auxílio de bastão de vidro. Posteriormente, o extrato obtido foi centrifugado a 3000 g, à temperatura de 4°C durante 2 minutos, utilizando-se 10 µL para realização das leituras. Para conversão dos valores de osmolalidade em mmol kg⁻¹ a potencial osmótico (Ψ_s), utilizou-se a equação de Van't Hoff em que $\Psi_s = -C \times 2,58 \times 10^{-3}$, na qual C é o valor de osmolalidade.

3.3.3 Análise de cor da superfície

A análise de cor foi realizada em quinze floretes de cada tratamento, logo após sua retirada do armazenamento, anteriormente à liofilização. Foi utilizado colorímetro Minolta CR300 (Osaka, Japão), que forneceu as coordenadas de cor L*, a* e b*. A partir destas coordenadas foi calculado o parâmetro ângulo Hue segundo a equação $^{\circ}\text{Hue} = \tan^{-1}(b/a)$ para “a” e “b” maiores que zero ou $^{\circ}\text{Hue} = 180^{\circ} + \tan^{-1}(b/a)$ para “a” menor que zero e “b” maior que zero (LEMOINE et al., 2008).

3.3.4 Teor de carotenoides e clorofilas a e b

Foram pesados aproximadamente 0,05 g de brócolis em pó, diluídos em 5 mL de acetona 80%, seguido de agitação em “vortex” durante 1 minuto. A seguir foram centrifugadas a 6,000 x g por 10 minutos, sendo em seguida separado o sobrenadante para leitura em espectrofotômetro Jenway 6705 UV/Vis. Os comprimentos de onda utilizados para leitura foram 646,6 nm, 663,6 nm e 440,5 nm. Os componentes foram determinados segundo as equações propostas por PORRA et al. (1989), sendo os resultados expressos em µg do componente por grama de amostra.

3.3.5 Açúcares redutores

Os açúcares redutores foram determinados através da reação por 5 minutos a 100 °C de 0,5 mL de extrato com 1 mL de ácido 3,5-dinitrosalicílico, seguida de ajuste do volume da solução a 10 mL. Os extratos foram obtidos pela homogeneização de aproximadamente 0,2 g de brócolis liofilizados com 12 mL de etanol, seguida de centrifugação a 12.000 g por 15 minutos a 4 °C (LEMOINE et al., 2008). Os limites de detecção e de quantificação obtidos após construção da curva de calibração utilizando solução padrão de glicose foram de 0,042 e 0,139 mM de glicose, respectivamente. Os resultados foram expressos em mmol de açúcares por quilo de amostra liofilizada.

3.3.6 pH e acidez total

Para as análises de pH e acidez total, foi pesado aproximadamente 0,2 g de brócolis em pó, que foi misturado em 4 mL de água. Procedeu-se à mensuração do pH e após a amostra foi titulada com solução de NaOH 0,1 N utilizando fenolftaleína como indicador. A acidez foi calculada em percentual de ácido cítrico das amostras liofilizadas.

3.3.7 Ácido Ascórbico

A extração foi realizada utilizando ácido metafosfórico 5% como solvente e 0,5 g de brócolis em pó, seguida de filtração em papel filtro qualitativo e ajuste do volume da solução (PATRAS; TIWARI; BRUNTON, 2011). A determinação foi realizada em HPLC-DAD segundo o método adaptado por Quirós et al., (2009), onde se utilizou o comprimento de onda de maior absorção, de 254 nm, para a quantificação das amostras e durante a validação do método. A curva de calibração foi construída utilizando padrão de ácido L-ascórbico, obtendo-se a equação $y = 101356x - 42460$ a partir da média de três áreas obtidas para cada ponto da curva, pela injeção de soluções padrão com concentração variando de 0,39 a 50,00 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. Os limites de detecção e

de quantificação para o método foram de 0,08 e de 0,25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e o percentual de recuperação para a amostra foi de 103,06%. Os resultados foram expressos em grama de ácido ascórbico por quilo de amostra liofilizada.

3.3.8 Atividade de mirosinases

As enzimas foram extraídas segundo metodologia adaptada de Kleinwächter, Selmar (2004). Brevemente, pesou-se 0,2 g de brócolis em pó liofilizado e adicionou-se 8 mL de tampão fosfato 0,1 M, pH 5,7, sendo homogeneizadas durante 15 segundos em agitador vortex. Prosseguiu-se então à filtração dos extratos em papel-filtro qualitativo de 11 cm de diâmetro, gramatura de $80\text{ g}\cdot\text{m}^{-2}$ e 205 μm de espessura, com maioria dos poros de 14 μm . O filtrado foi então aplicado à coluna constituída de Sephadex A-25 (preparada pela suspensão de aproximadamente 100 mg de reagente para 2,5 mL de tampão fosfato pH 5,7, 0,1 M). Após essa etapa para remoção dos compostos de baixo peso molecular dos extratos, lavou-se as colunas com mais 1 mL de tampão fosfato pH 5,7, 0,1 M, tendo-se então a amostra resultante para os testes enzimáticos. A metodologia de atividade enzimática baseia-se na quantificação da glicose liberada do substrato (adaptados de CHEN et al. 2000; HARA; ETO; KUBOI, 2001; WANG et al., 2009). Foi adicionado 50 μL do extrato enzimático a 950 μL de meio constituído por sinigrina 100 μM e ácido ascórbico 0,8 mM em tampão citrato de sódio pH 6,0, 0,1 M. A mistura reativa foi incubada à 37 °C por 30 minutos. Para a quantificação foi adicionado 1 mL de ácido 3,5-dinitrosalicílico às amostras, que foram aquecidas a 100 °C durante 5 minutos. Após os tubos serem resfriados em água corrente, procedeu-se à diluição de 1:10, sendo realizada a leitura das absorbâncias a 540 nm em espectrofotômetro Jenway 6705 UV/Vis. A curva padrão foi feita utilizando glicose anidra. O teor de proteína foi determinado segundo método descrito por Bradford (1976), utilizando-se albumina de soro bovina para construção da curva de calibração. Os resultados foram expressos em mol de glicose formada por quilo de proteína presente nos extratos.

3.3.9 Glicosinolatos totais e isotiocianatos

Glicosinolatos totais e isotiocianatos foram analisados utilizando cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massas (GC-MS) no modo de monitoramento de íons selecionados (SIM). A curva de calibração foi construída pela reação de 0,1 mL de diferentes concentrações de alil isotiocianato com 0,1 mL de 1,2-benzenoditiol e 0,5 mL de tampão fosfato pH 8,5, 0,07 M, promovendo a formação de 1,3-benzoditiol-2-tiona, composto de massa molecular $184,307 \text{ g.mol}^{-1}$, identificado previamente utilizando o modo SCAN. Para a análise dos isotiocianatos, 0,5 g de brócolis em pó foram adicionados de 10 mL de água destilada, ocorrendo a inativação das mirosinases a $100 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 30 minutos. Em seguida, o extrato foi filtrado em papel filtro qualitativo e 0,2 mL deste foram adicionados de 0,5 mL de 1,2-benzenoditiol 7 mM e 0,5 mL de tampão fosfato pH 8,5, 0,07 M, para promover uma reação de ciclocondensação com os isotiocianatos, que ocorreu a $65 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 2 horas, segundo Choi et al. (2004).

Para a determinação dos glicosinolatos totais, que incluiu os compostos sulfurados presentes nas formas de glicosinolatos (isotiocianatos ligados) e os isotiocianatos, anteriormente à reação de ciclocondensação com 1,2-benzenoditiol, 0,5 g de amostra liofilizada foram incubadas por 3 horas a $40 \text{ }^\circ\text{C}$ com 10 mL de solução tampão fosfato-citrato pH 4,0, 0,1 M com adição de $0,005 \text{ mmol.mL}^{-1}$ EDTA e $0,05 \text{ mg.mL}^{-1}$ de ácido ascórbico, de modo a promover a completa liberação dos isotiocianatos pelas mirosinases endógenas do vegetal, a partir dos glicosinolatos, que podem ser determinados através do produto de reação 1,3-benzoditiol-2-tiona (GUO et al., 2013).

Obteve-se a equação $y = 1979,8x - 2330,8$ a partir da média de três áreas obtidas para cada ponto da curva, pela injeção de soluções padrão com concentração variando de 0,2 a $50 \text{ } \mu\text{M}$ de alil isotiocianato. Os limites de detecção e de quantificação para o método foram de 0,0034 e $0,0104 \text{ } \mu\text{M}$ e o percentual de recuperação foi de 97,5%. Os resultados foram expressos em mmol de equivalente a alil isotiocianato por quilo de amostra liofilizada.

3.3.10 Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA). Os tratamentos foram comparados através do teste Fischer ($p \leq 0,05$). Nas figuras, foi utilizado o intervalo de confiança para comparar diferenças entre os tempos de análise de um mesmo tratamento, e através do teste Fischer (letras, acima das barras), entre os tratamentos diferentes no mesmo tempo.

4 Resultados

4.1 Experimento 1 – 2013/2014 verão

4.1.1 Análises de crescimento

Durante o primeiro experimento, colhido em datas distintas no verão de 2014 (Colheita 1 - fevereiro de 2014 e Colheita 2 - março de 2014), os diâmetros superiores e inferiores não apresentaram diferenças significativas devido à colheita ou ao tratamento com estresse hídrico (Tabela 2).

Tabela 2 - Parâmetros de tamanho das inflorescências de brócolis, através das colheitas do verão de 2014, cultivados sobre tensão regular de água no solo e de estresse

Irrigação	Diâmetro superior (cm)	Diâmetro inferior (cm)
Regular	15,0 A	3,9 A
Estresse	16,3 A	4,4 A

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna não diferem pelo teste Fisher ($p \leq 0,05$).

No entanto, o peso e altura diferiram devido à época de colheita (Tabela 3).

Tabela 3 - Parâmetros de tamanho de brócolis cultivados sobre tensão regular de água no solo e de estresse colhidos em fevereiro de 2014 (Colheita 1) e março de 2014 (Colheita 2)

	Irrigação	Colheita 1	Colheita 2
Peso (g)	Regular	538,0 Aa	335,8 Bb
	Estresse	424,2 Bb	508,0 Aa
Altura (cm)	Regular	17,8 Aa	16,8 Aa
	Estresse	15,2 Ab	19,6 Aa

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna e pela mesma letra minúscula na linha não diferem por cada variável pelo teste Fisher ($p \leq 0,05$).

Os brócolis colhidos em fevereiro (colheita 1) cultivados sob aporte hídrico regular apresentaram peso maiores que os cultivados sob estresse, e os colhidos em março (colheita 2) apresentaram o oposto, com média de peso maior nas plantas cultivadas sobre estresse

Apesar de não se ter observado diferenças quanto à altura das inflorescências nos tratamentos com e sem estresse hídrico de ambas as colheitas, os brócolis colhidos em março apresentaram maior altura do que aqueles colhidos em fevereiro, analisando somente as plantas cultivadas sob estresse.

4.1.2 Análise de Cor Superficial

No experimento 1, obtiveram-se maiores valores de ângulo Hue no tratamento estresse hídrico (Tabela 4) apenas após a primeira colheita, anteriormente ao armazenamento.

Tabela 4 - Ângulo Hue ($^{\circ}$ h) anteriormente ao armazenamento de floretes de brócolis das duas colheitas do Experimento 1, cultivados sob aporte hídrico regular e estresse

Irrigação	Colheita 1	Colheita 2
Regular	109,6 B	105,9 A
Estresse	118,5 A	105,4 A

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna não diferem pelo teste Fisher ($p \leq 0,05$).

Após o armazenamento, os valores passaram a não diferir.

Em ambas as colheitas, a aplicação de doses de radiação UV-C de 0, 7 e 10 kJ.m^{-2} resultou em alterações de ângulo Hue apenas aos 7 dias de armazenamento (Tabela 5), porém de maneiras diferentes. Na colheita 1, a aplicação de 7 kJ.m^{-2} ocasionou diminuição no parâmetro apenas nos brócolis cultivados sob aporte hídrico regular. Na colheita 2 observou-se comportamento oposto, sendo este o único tratamento que apresentou maior valor de ângulo Hue nos brócolis cultivados sob aporte hídrico regular. Nos brócolis com estresse hídrico, 7 e 10 kJ.m^{-2} não diferiram dos brócolis não tratados com UV-C na colheita 1, porém na colheita 2, a dose de 7 kJ.m^{-2} apresentou valor significativamente superior ao dos não tratados.

Tabela 5 - Ângulo Hue ($^{\circ}$ h) de brócolis tratados com radiação UV-C após 7 dias de armazenamento refrigerado a 4 $^{\circ}$ C colhidos em fevereiro de 2014 (Colheita 1) e março de 2014 (Colheita 2)

	Irrigação	0 kJ.m ⁻²		7 kJ.m ⁻²		10 kJ.m ⁻²	
Colheita 1	Regular	111,9	Aa	106,3	Bb	113,8	Ba
	Estresse	112,5	Aa	111,5	Aa	111,4	Aa
Colheita 2	Regular	99,4	Ab	110,1	Aa	102,7	Ab
	Estresse	105,0	Ab	111,7	Aa	108,9	Aab

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna para cada colheita e pela mesma letra minúscula na linha não diferem por cada colheita pelo teste Fisher ($p \leq 0.05$).

4.1.3 Clorofilas a e b e carotenoides

A aplicação de estresse hídrico levou à diminuição do teor dos pigmentos em ambas as colheitas anteriormente ao armazenamento (Figura 13).

Durante o armazenamento, entretanto, houve o aumento de clorofilas e carotenoides nos brócolis tratados com estresse, enquanto nos cultivados sob condições regulares de aporte hídrico, observa-se a degradação dos pigmentos na colheita 1 e conservação dos valores iniciais na colheita 2.

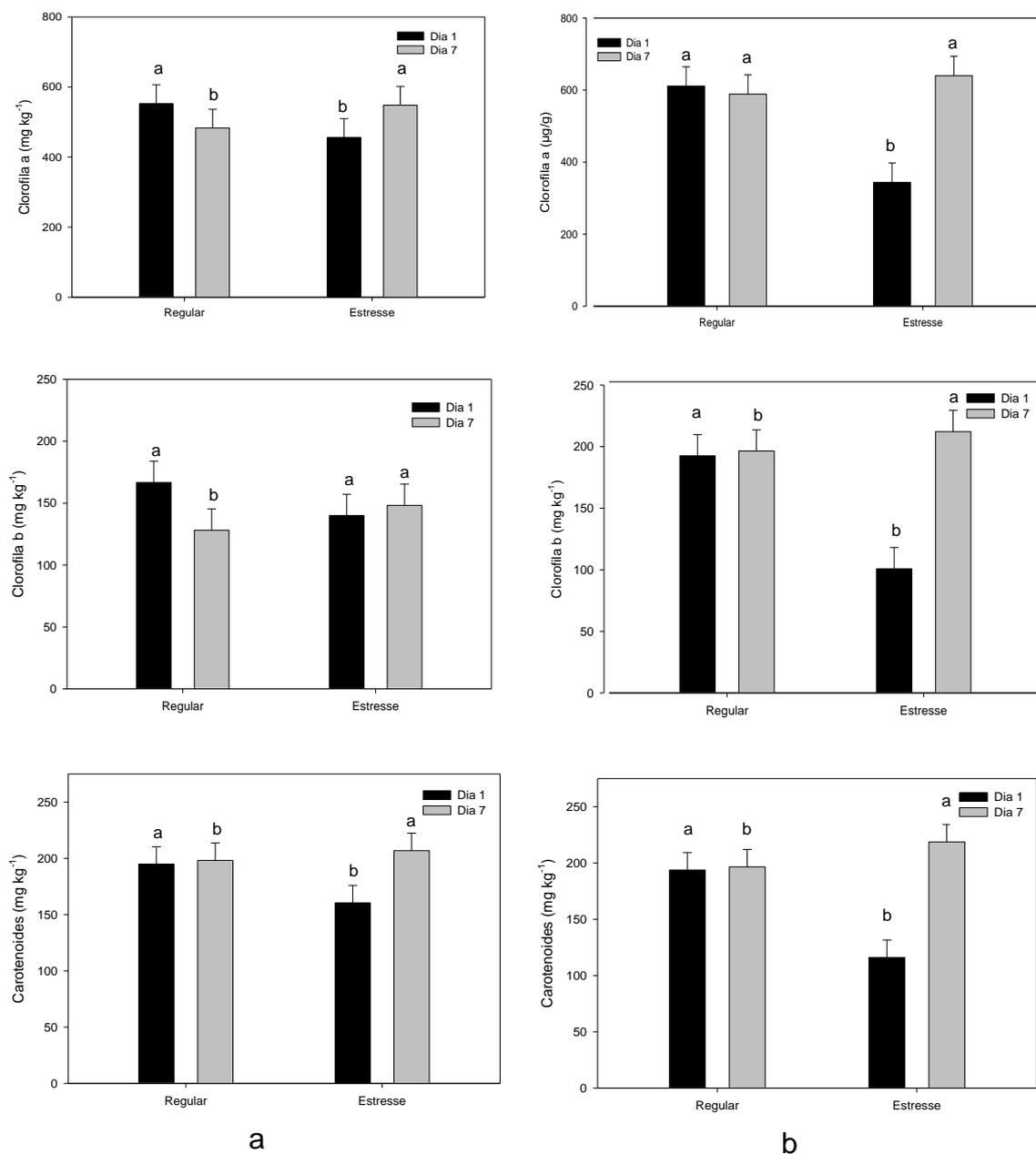


Figura 13 - Teor de clorofila a, clorofila b e de carotenoides de brócolis cultivados sob aporte hídrico regular e com estresse hídrico e colhidos em fevereiro de 2014 (a) e março de 2014 (b) As barras de erro representam o intervalo de confiança e comparam o mesmo tratamento entre os períodos de armazenamento. As letras sobre as barras comparam tratamentos distintos no mesmo período, pelo teste Fischer ($p \leq 0.05$).

A aplicação de radiação UV-C levou a diferenças significativas de clorofilas e carotenoides entre os tratamentos para ambas as colheitas (Figura 14). Houve aumento dos teores de clorofilas e carotenoides nos brócolis cultivados sob aporte hídrico regular durante o armazenamento quando estes foram tratados com a dose de 7 kJ.m⁻² na pós-colheita. Os cultivados sob

estresse hídrico tiveram um aumento do teor de carotenoides totais pela aplicação da dose.

Quando utilizado o tratamento com 10 kJ.m⁻² de UV-C após a colheita, observou-se a redução de todos os pigmentos após o armazenamento em plantas cultivadas sob estresse hídrico, enquanto nas cultivadas sob aporte hídrico regular, o efeito somente é observado para carotenoides totais.

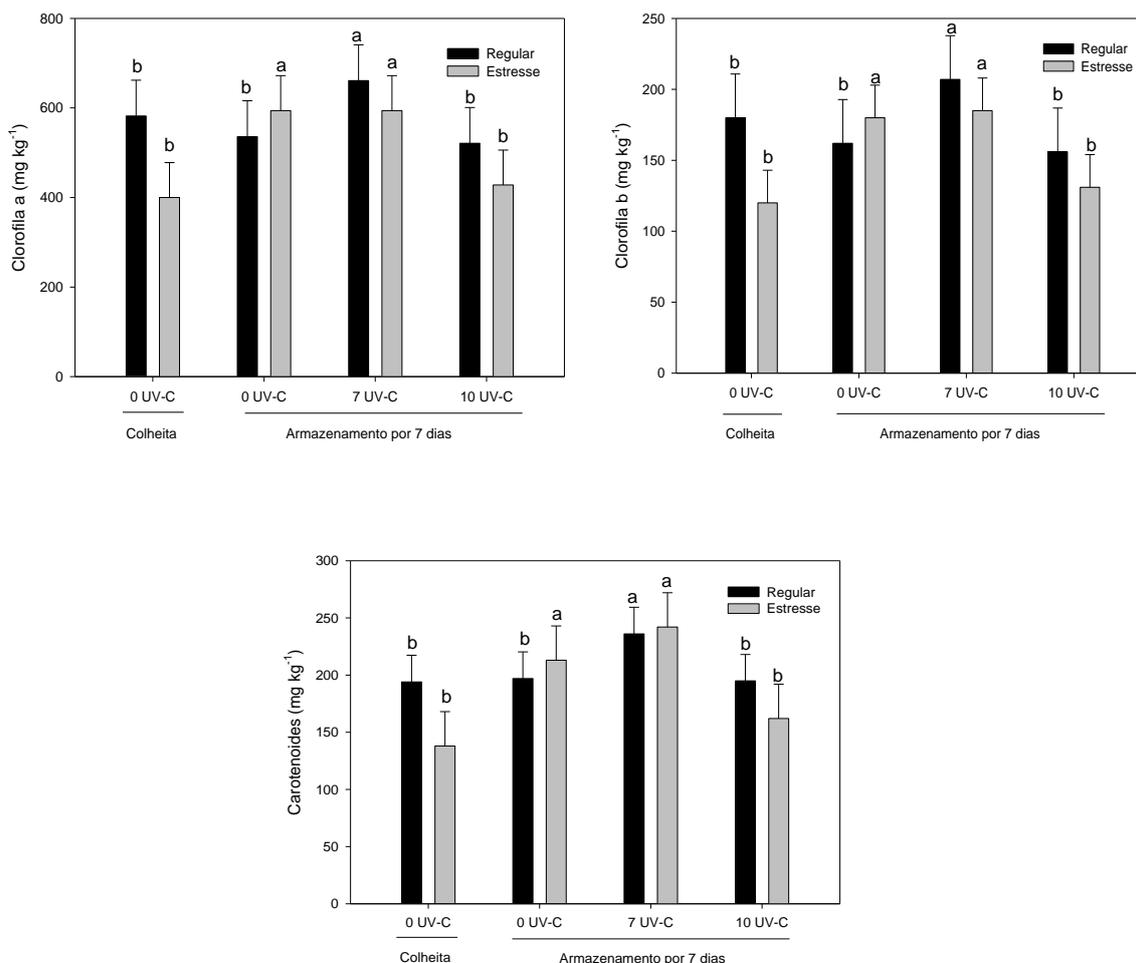


Figura 14 - Média das colheitas do Experimento 1 de clorofilas a e b e carotenoides de brócolis cultivados sob aporte hídrico regular e estresse após a colheita e o armazenamento por 7 dias, tratados com 0, 7 e 10 kJ.m⁻² de UV-C

As barras de erro representam o intervalo de confiança e comparam brócolis cultivados sob aporte hídrico regular ou estresse hídrico aplicados com a mesma dose de UV-C. As letras sobre as barras comparam tratamentos (dose de UV-C) distintos ($p \leq 0.05$).

4.1.4 Açúcares redutores

Na colheita de fevereiro de 2014, as plantas cultivadas sem estresse hídrico apresentaram maiores teores de açúcares redutores do que as cultivadas com estresse hídrico, porém tal não foi observado nos brócolis

colhidos em março, onde não houve diferença significativa (Figura 15). Aos sete dias de armazenamento, houve redução dos teores nos brócolis sem estresse colhidos em fevereiro, enquanto nos colhidos em março, os brócolis com estresse hídrico apresentaram aumento de açúcares redutores em relação ao observado após a colheita.

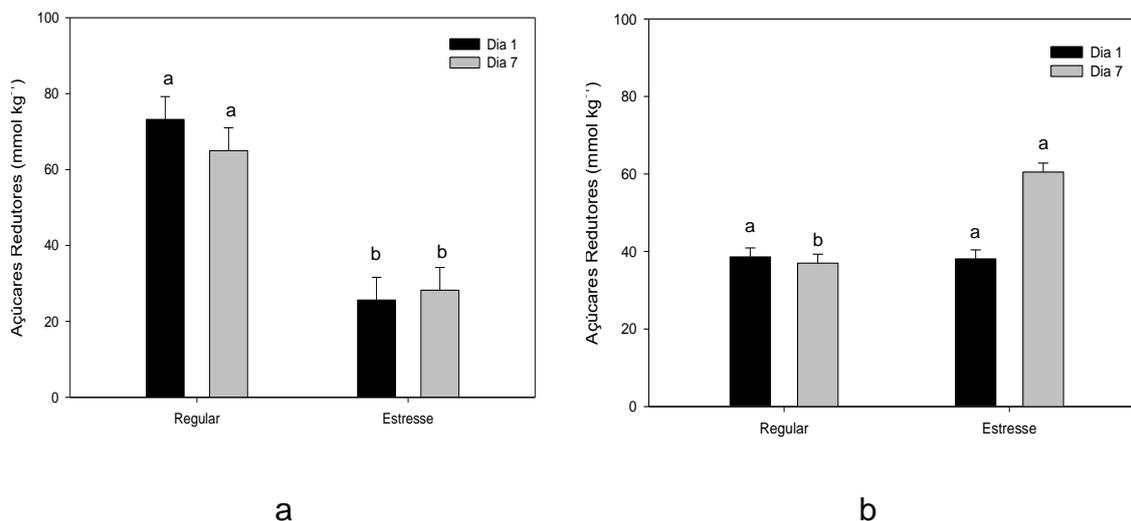


Figura 15 - Teor de açúcares redutores de brócolis cultivados sob aporte hídrico regular e com estresse hídrico e colhidos em fevereiro de 2014 (a) e março de 2014 (b)

As barras de erro representam o intervalo de confiança e comparam o mesmo tratamento entre os períodos de armazenamento. As letras sobre as barras comparam tratamentos distintos no mesmo período, pelo teste Fischer ($p \leq 0.05$).

A aplicação de UV-C levou à redução dos teores de açúcares redutores durante o armazenamento nas plantas cultivadas sob aporte hídrico regular, com efeito oposto nas cultivadas sob estresse, na colheita 1. Na colheita 2, os brócolis cultivados sem estresse hídrico tratados com a dose de 7 kJ.m⁻² apresentaram maiores teores de açúcares, porém nos com estresse, ambas as doses de UV-C aplicadas resultaram na diminuição dos teores (Tabela 6).

Tabela 6 - Açúcares redutores (mmol de glicose.kg⁻¹) de brócolis cultivados com aplicação de 0, 7 e 10 kJ.m⁻² de UV-C colhidos em fevereiro de 2014 (Colheita 1) e março de 2014 (Colheita 2) aos 7 dias de armazenamento

	Irrigação	0 kJ.m ⁻²	7 kJ.m ⁻²	10 kJ.m ⁻²
Colheita 1	Regular	65,3 Aa	48,4 Ab	37,1 Ac
	Estresse	29,2 Bb	40,2 Ba	38,4 Aa
Colheita 2	Regular	37,0 Bb	46,7 Aa	31,5 Bb
	Estresse	61,5 Aa	42,9 Ab	42,5 Ab

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna, por colheita, e pela mesma letra minúscula na linha não diferem pelo teste Fisher ($p \leq 0.05$).

4.1.5 Acidez e pH

A acidez das amostras apresentou valor de 0,1% de ácido cítrico neste primeiro experimento, independentemente do dia de armazenamento ou tratamento realizado.

O estresse hídrico e o tempo de armazenamento não ocasionaram efeitos no pH de brócolis colhidos em fevereiro de 2014, com valor médio de 6,5. Na colheita posterior, houve diferença apenas considerando o tempo de armazenagem, independentemente do tratamento pré-colheita, com menor valor logo após a colheita, 6,22, e de 6,61 após o armazenamento.

A radiação aplicação de UV-C na dose de 7kJ m⁻² resultou na acidificação do vegetal após o armazenamento na colheita 1 para ambos os brócolis cultivados com e sem estresse hídrico, enquanto na colheita 2 não foi observado efeito nos brócolis pela aplicação de UV-C (Tabela 7).

Tabela 7 - pH de plantas de brócolis cultivadas com aplicação de 0, 7 e 10 kJ.m⁻² de UV-C colhidos em fevereiro de 2014 (Colheita 1) e março de 2014 (Colheita 2)

	Irrigação	0 kJ.m ⁻²		7 kJ.m ⁻²		10 kJ.m ⁻²	
Colheita 1	Regular	6,51	Aa	6,26	Ab	6,36	Aab
	Estresse	6,46	Aa	6,15	Ab	6,50	Aa
Colheita 2	Regular	6,54	Aa	6,62	Aa	6,67	Aa
	Estresse	6,66	Aa	6,42	Aa	6,46	Ba

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna por colheita e pela mesma letra minúscula na linha não diferem pelo teste Fisher ($p \leq 0,05$).

Deste modo, não houve tendência de aumento ou diminuição de pH consistente entre as colheitas do experimento 1.

4.1.6 Ácido ascórbico

O efeito do cultivo sob estresse hídrico foi a diminuição de ácido ascórbico em ambas as colheitas realizadas no verão de 2014 no período inicial. Entretanto, o armazenamento reduziu os teores do componente na colheita 1, o que não foi observado nos brócolis colhidos posteriormente (Figura 16).

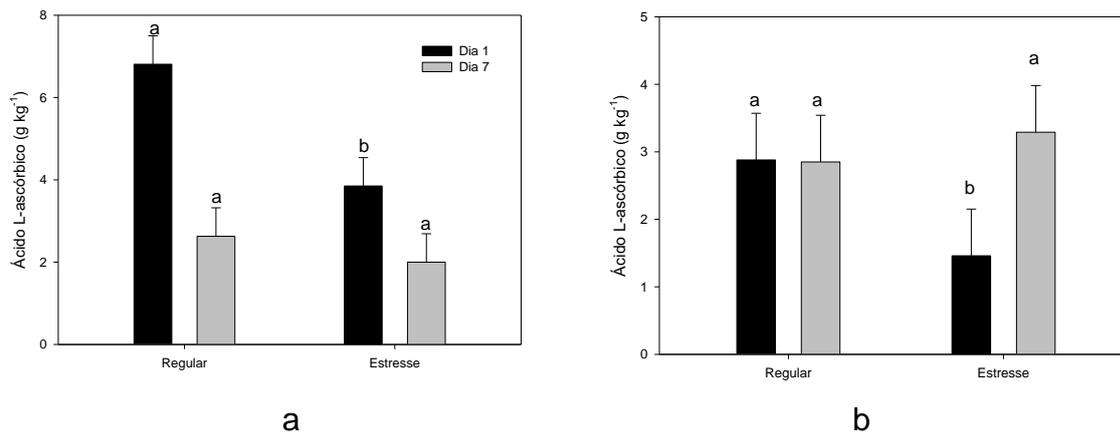


Figura 26 - Ácido ascórbico de brócolis cultivados sob tensão regular de água no solo e estresse colhidos em fevereiro de 2014 (a) e março de 2014 (b)

As barras de erro representam o intervalo de confiança e comparam o mesmo tratamento entre os períodos de armazenamento. As letras sobre as barras comparam tratamentos distintos no mesmo período, pelo teste Fischer ($p \leq 0.05$).

A aplicação de UV-C resultou na diminuição dos teores de ácido ascórbico após o armazenamento em ambas as colheitas, quando os brócolis foram cultivados sob aporte hídrico regular, enquanto nos cultivados com estresse a redução somente foi observada quando a dose de 10 kJ.m^{-2} foi aplicada (Figura 17).

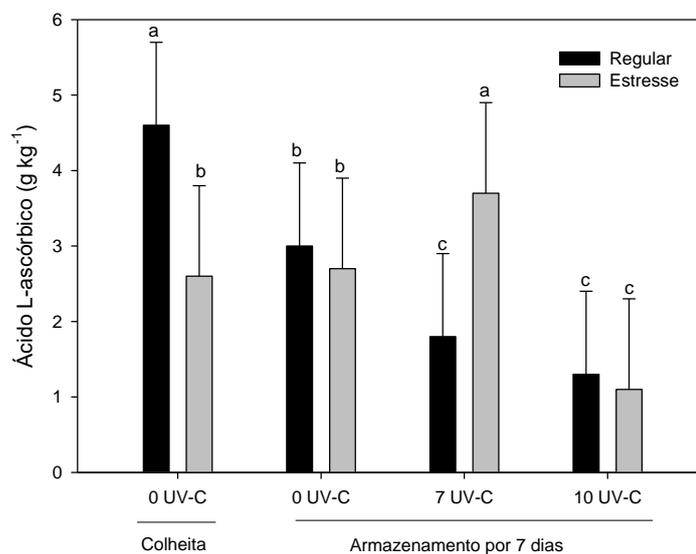


Figura 3 - Média das colheitas do Experimento 1 do teor de ácido L-ascórbico de brócolis cultivados sob aporte hídrico regular e estresse após a colheita e o armazenamento por 7 dias tratados com 0, 7 e 10 kJ.m^{-2} de UV-C

As barras de erro representam o intervalo de confiança e comparam brócolis cultivados sob aporte hídrico regular ou estresse hídrico aplicados com a mesma dose de UV-C. As letras sobre as barras comparam tratamentos (dose de UV-C) distintos ($p \leq 0.05$).

Observou-se redução significativa do componente entre as colheitas, com valores médios para todos os tratamentos anteriormente ao armazenamento, de 6,3 g.kg⁻¹ na colheita 1 e de 3,1 g.kg⁻¹ na colheita 2.

4.1.7 Atividade de mirosinases

Apenas na colheita 1 o estresse hídrico induziu a diminuição da atividade de mirosinases. Tanto os brócolis cultivados com estresse hídrico quanto os com aporte hídrico regular apresentaram redução da atividade de mirosinases na colheita 1 após o armazenamento por 7 dias (Figura 18). Na colheita 2, apenas houve redução de atividade ao longo do armazenamento nos brócolis cultivados sob aporte hídrico regular.

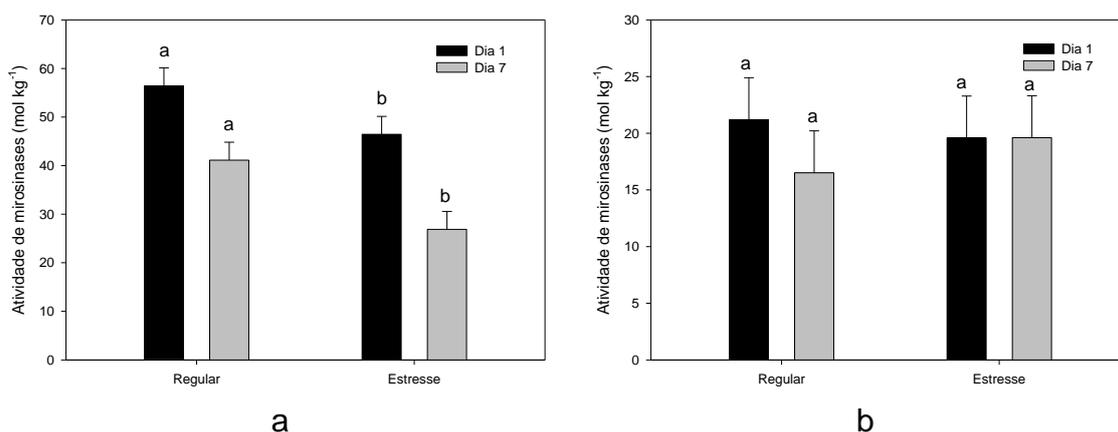


Figura 48 - Atividade de mirosinases de brócolis cultivados sob condições normais de água no solo e estresse colhidos em fevereiro de 2014 (a) e março de 2014 (b). As barras de erro representam o intervalo de confiança e comparam o mesmo tratamento entre os períodos de armazenamento. As letras sobre as barras comparam tratamentos distintos no mesmo período, pelo teste Fischer ($p \leq 0.05$).

Os efeitos da aplicação de UV-C ao longo do armazenamento foram diferentes para as duas colheitas. Em fevereiro, a atividade de mirosinases foi reduzida, nos brócolis cultivados sob aporte hídrico regular, quando aplicada a dose de 10 kJ.m⁻². Nos tratamentos com estresse hídrico, o aumento da atividade das enzimas foi intensificado proporcionalmente à dose de UV-C aplicada. Em março, os brócolis não apresentaram diferenças significativas pela aplicação de UV-C (Tabela 8).

Tabela 8 - Atividade de mirosinases (mol de glicose.kg⁻¹ de proteína) de brócolis cultivados com aplicação de 0, 7 e 10 kJ.m⁻² de UV-C colhidos em fevereiro de 2014 (Colheita 1) e março de 2014 (Colheita 2)

	Irrigação	0 kJ.m ⁻²	7 kJ.m ⁻²	10 kJ.m ⁻²
Colheita 1	Regular	41,1 Aa	40,2 Aa	36,0 Bb
	Estresse	26,9 Bc	33,4 Bb	42,8 Aa
Colheita 2	Regular	16,5 Aa	17,3 Aa	16,1 Aa
	Estresse	19,6 Aa	21,5 Aa	19,4 Aa

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna por colheita e pela mesma letra minúscula na linha não diferem pelo teste Fisher ($p \leq 0,05$).

4.1.8 Glicosinolatos totais

Houve redução nos teores de glicosinolatos totais pelo cultivo sob estresse hídrico em ambas as colheitas (Figura 19). Durante o armazenamento, observou-se diminuição dos teores nos brócolis cultivados sob estresse hídrico na colheita 1 e sob aporte hídrico regular na colheita 2.

Os teores diferiram significativamente também entre as colheitas, uma vez que em fevereiro o teor médio de glicosinolatos totais, através dos tratamentos, foi de 137 mmol.kg⁻¹, enquanto em março, foi de 355 mmol.kg⁻¹.

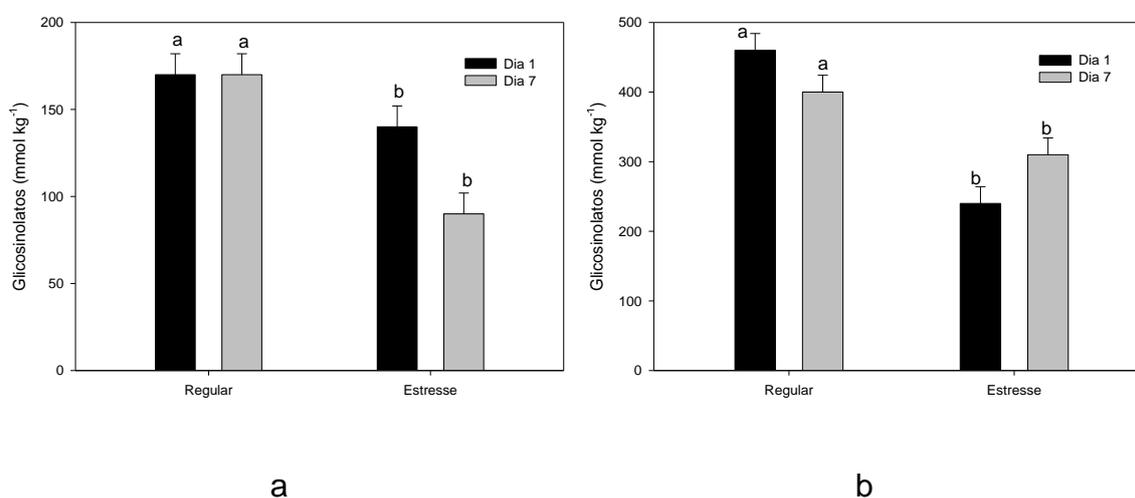


Figura 19 - Glicosinolatos totais de brócolis cultivados com e sem estresse hídrico ao primeiro e sétimo dia de armazenamento, colhidos em fevereiro de 2014 (a) e março de 2014 (b)

As barras de erro representam o intervalo de confiança e comparam o mesmo tratamento entre os períodos de armazenamento. As letras sobre as barras comparam tratamentos distintos no mesmo período, pelo teste Fischer ($p \leq 0.05$).

A aplicação de UV-C teve efeitos que não diferiram significativamente entre as colheitas. Ao longo do armazenamento, houve aumento de

glicosinatos totais pela aplicação de 10 kJ.m^{-2} de UV-C nos brócolis cultivados sob estresse hídrico (Figura 20).

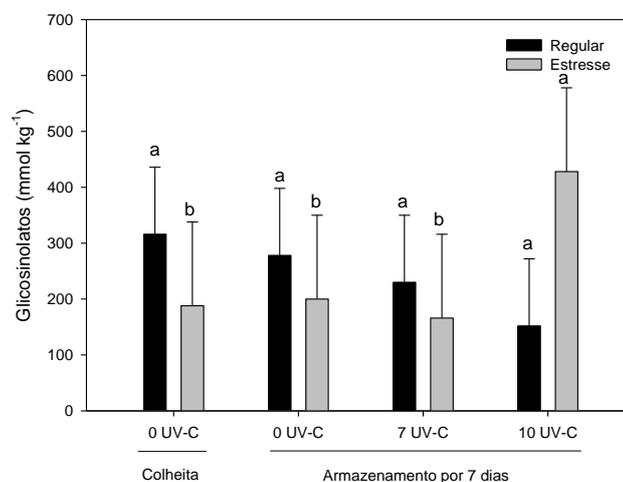


Figura 50 - Média das colheitas do Experimento 1 de glicosinatos totais de brócolis cultivados sob aporte hídrico regular e estresse após a colheita e 7 dias de armazenamento tratados com 0, 7 e 10 kJ.m^{-2} de UV-C

As barras de erro representam o intervalo de confiança e comparam brócolis cultivados sob aporte hídrico regular ou estresse hídrico aplicados com a mesma dose de UV-C. As letras sobre as barras comparam tratamentos (dose de UV-C) distintos ($p \leq 0.05$).

4.1.9 Isotiocianatos

O estresse hídrico não acarretou em alterações no teor de isotiocianatos no período inicial analisado em ambas as colheitas, com média entre os tratamentos de $61,78 \text{ mmol.kg}^{-1}$ na colheita de fevereiro, e de $111,80 \text{ mmol.kg}^{-1}$ na colheita de março de 2014, o que, entretanto, representa diferença significativa entre as colheitas. Nos brócolis armazenados durante 7 dias, houve menor teor de isotiocianatos nos brócolis cultivados sob estresse hídrico apenas nas plantas colhidas em fevereiro, como pode ser visto na coluna 0 kJ.m^{-2} da Tabela 9.

Já a aplicação de UV-C resultou em efeitos opostos entre as colheitas (Tabela 9), após 7 dias de armazenamento. Na colheita 1, levou à diminuição dos teores de isotiocianatos nos brócolis cultivados sob aporte hídrico regular, não tendo efeito nas plantas cultivadas deste modo na colheita 2. Nas plantas cultivadas sob estresse hídrico, a aplicação de 7 kJ.m^{-2} de UV-C levou ao aumento dos teores na colheita 1, porém este valor não difere ao dos brócolis sem estresse hídrico tratados com a mesma dose. Na colheita 2, a aplicação

de 10 kJ.m⁻² de UV-C ocasionou o aumento do teor de isotiocianatos em relação aos demais tratamentos.

Tabela 9 - Teor de isotiocianatos (mmol.kg⁻¹) de brócolis cultivados com aplicação de 0, 7 e 10 kJ.m⁻² de UV-C colhidos em fevereiro de 2014 (Colheita 1) e março de 2014 (Colheita 2)

	Irrigação	0 kJ.m ⁻²		7 kJ.m ⁻²		10 kJ.m ⁻²	
Colheita 1	Regular	140,2	Aa	104,3	Ab	101,8	Ab
	Estresse	74,9	Bb	100,3	Aa	77,6	Bb
Colheita 2	Regular	63,5	Aab	67,3	Aa	60,2	Bb
	Estresse	63,5	Ab	59,6	Ac	111,4	Aa

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna por colheita e pela mesma letra minúscula na linha não diferem pelo teste Fisher ($p \leq 0,05$).

Houve, deste modo, aumento do teor de glicosinolatos totais durante o cultivo no verão pela aplicação de 10 kJ.m⁻² de UV-C a plantas cultivadas sob estresse hídrico, porém o aumento concomitante de isotiocianatos foi observado somente na colheita realizada em março.

4.2 Experimento 2 e 3 – 2014 e 2015 (ambos no inverno)

4.2.1 Análises de crescimento

As plantas pertencentes aos experimentos colhidos em outubro de 2014 e de 2015, respectivamente, apresentaram diferença significativa nos parâmetros peso, diâmetro superior e altura quando comparados os tratamentos sem e com estresse hídrico, independentemente do ano de colheita, deste modo os valores dos experimentos 2 e 3 foram apresentados conjuntamente (Tabela 10). A colheita foi realizada quando mais de 90% das plantas apresentaram inflorescências maduras, com ausência de flores, segundas inflorescências ou folhas (DOMINGUEZ-PERLES et al., 2011), não havendo desenvolvimento desigual nas plantas que justificasse a colheita em datas distintas.

Tabela 10 - Parâmetros médios de tamanho das inflorescências de brócolis, através das colheitas dos invernos de 2014 e 2015, cultivados sobre tensão regular de água no solo e de estresse

Irrigação	Peso (g)	Diâmetro superior (cm)	Altura (cm)
Regular	553.4 A	18.6 A	16.0 A
Estresse	409.2 B	17.5 B	13.3 B

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna não diferem pelo teste Fisher ($p \leq 0,05$).

O diâmetro inferior apresentou medidas menores para plantas cultivadas sob estresse hídrico apenas no experimento colhido em 2014 (Tabela 11).

Tabela 11 - Diâmetro inferior (cm) de brócolis cultivados sobre tensão regular de água no solo e estresse colhidos no inverno de 2014 (Experimento 2) e 2015 (Experimento 3)

Irrigação	Experimento 2	Experimento 3
Regular	4,9 Aa	4,0 Aa
Estresse	4,3 Ba	3,8 Aa

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna e pela mesma letra minúscula na linha por colheita não diferem por cada variável pelo teste Fisher ($p \leq 0,05$).

4.2.2 Potencial osmótico

Nos experimentos colhidos no inverno, foi realizada análise de potencial osmótico nos brócolis no tempo inicial (0), aos 7 e 15 dias de armazenamento. Em ambos os anos até o tempo de 7 dias de armazenamento os brócolis apresentaram diferença significativa entre as plantas sem estresse hídrico e com estresse hídrico (Tabela 12). Como será discutido posteriormente, a diminuição do valor de potencial osmótico é característica identificadora de plantas que foram cultivadas sob estresse.

Ao longo do armazenamento, no experimento 2, observou-se redução dos valores iniciais das plantas cultivadas sob aporte hídrico regular aos 15 dias de armazenamento, porém no experimento 3 há uma diminuição já aos 7 dias, para ambos os tratamentos, aporte hídrico regular e estresse hídrico.

Tabela 12 - Potencial osmótico durante 15 dias de armazenamento de brócolis cultivados sobre tensão regular de água no solo e estresse colhidos no inverno de 2014 (Experimento 2) e 2015 (Experimento 3).

	Dia 1	Dia 7	Dia 15
Experimento 2			
Regular	-0,75 Aa	-0,77 Aa	-0,93 Ab
Estresse	-0,97 Ba	-0,99 Ba	-0,93 Aa
Experimento 3			
Regular	-0,66 Aa	-0,81 Ac	-0,72 Ab
Estresse	-0,71 Ba	-0,85 Bc	-0,77 Bb

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna, por experimento, e pela mesma letra minúscula na linha, por armazenamento, não diferem pelo teste Fisher ($p \leq 0.05$).

A aplicação de UV-C não alterou o potencial osmótico dos brócolis.

4.2.3 Cor

No Experimento 3, observou-se que as plantas cultivadas com estresse hídrico apresentaram valor de ângulo Hue maior do que as cultivadas sob condições regulares de água no solo apenas anteriormente ao armazenamento. No experimento 2, não foram observadas diferenças entre os tratamentos (Tabela 13).

Tabela 13 - Ângulo Hue ($^{\circ}$ h) de brócolis cultivados sobre tensão regular de água no solo e estresse colhidos no inverno de 2014 (Experimento 2) e 2015 (Experimento 3) anteriormente ao armazenamento

Irrigação	Experimento 2	Experimento 3
Regular	120,66 Aa	124,09 Ba
Estresse	116,61 Aa	129,06 Aa

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna, por tratamento, e pela mesma letra minúscula na linha não diferem por cada variável pelo teste Fisher ($p \leq 0,05$).

Ao longo do armazenamento, não há influência dos fatores estresse hídrico, radiação UV-C e ano de cultivo dos experimentos, porém observa-se que houve decréscimo de ângulo Hue após 7 e 15 dias (Figura 21).

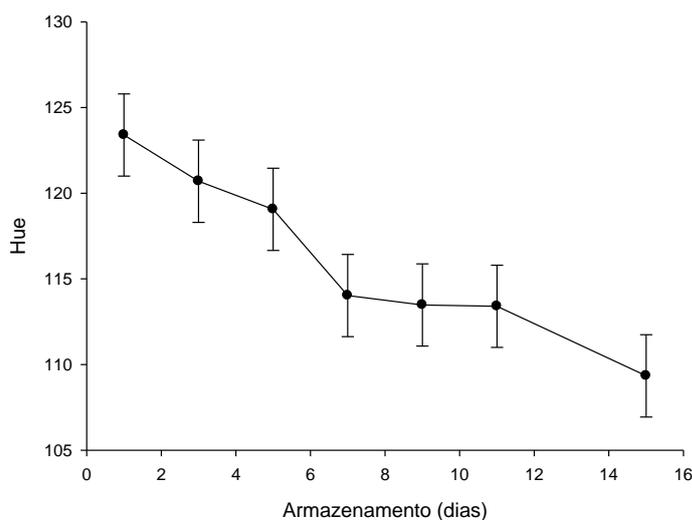


Figura 61 - Média dos Experimentos 2 e 3, cultivados ou não com estresse hídrico e aplicados ou não com radiação UV-C, do ângulo Hue de brócolis durante 15 dias de armazenamento. As barras de erro representam o intervalo de confiança e comparam o mesmo tratamento entre os períodos de armazenamento.

Nos experimentos 2 e 3 foi analisado o ângulo Hue dos brócolis até os 15 dias de armazenamento para determinação da vida de prateleira. Entretanto, até o período analisado, os brócolis apresentaram redução de aproximadamente 15% do ângulo Hue, inferior a 30%, a partir do qual a hortaliça é considerada inapta para consumo.

4.2.4 Carotenoides e clorofilas a e b

Os brócolis cultivados sob estresse apresentaram maiores teores de clorofilas a e b e de carotenoides do que os cultivados sob condições normais de água no solo no Experimento 2, ao início do armazenamento. No Experimento 3, houve diferenças significativas apenas para clorofila b, em que o cultivo sob estresse hídrico levou à redução dos teores (Tabela 14).

Aos 7 dias de armazenamento, observou-se a ocorrência de padrões opostos entre os experimentos. O estresse hídrico levou à redução dos teores de clorofila a no experimento 2 e ao aumento, no experimento 3. No experimento 2, além da redução de clorofila a pelo cultivo sob estresse hídrico, houve redução de teores de clorofila b e carotenoides, porém no experimento 3 não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos.

Tabela 14 - Clorofilas e carotenoides de brócolis cultivados com e sem estresse hídrico e colhidos nos invernos de 2014 (Experimento 2) e 2015 (Experimento 3)

		Experimento 2				Experimento 3			
		Dia 1		Dia 7		Dia 1		Dia 7	
Clorofila a (mg.kg ⁻¹)	Regular	327,2	Bb	562,9	Aa	494,1	Aa	311,9	Bb
	Estresse	421,8	Aa	313,1	Bb	427,9	Ba	341,8	Ab
Clorofila b (mg.kg ⁻¹)	Regular	81,3	Bb	150,5	Aa	164,5	Aa	90,1	Ab
	Estresse	112,7	Aa	97,4	Ba	131,9	Bb	103,2	Ab
Carotenoides (mg.kg ⁻¹)	Regular	122,0	Bb	186,1	Aa	156,8	Aa	112,1	Ab
	Estresse	167,5	Aa	108,5	Bb	153,7	Aa	114,9	Ab

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna, por pigmento, e pela mesma letra minúscula na linha, por experimento, não diferem por cada variável pelo teste Fisher ($p \leq 0,05$).

A aplicação de UV-C levou ao acúmulo de clorofila a e carotenoides no experimento 2, após o armazenamento, somente quando a dose de 7 kJ.m⁻² foi aplicada aos brócolis cultivados com estresse hídrico (Tabela 15). Já ao analisar-se o experimento 3, os maiores teores dos pigmentos foram observados nos brócolis tratados com a dose de 7 kJ.m⁻² de UV-C, somente nas plantas cultivadas sob condições regulares de aporte hídrico. Nas cultivadas com estresse hídrico, o efeito foi oposto e a dose de 7 kJ.m⁻² de UV-C levou à diminuição dos teores dos pigmentos.

Tabela 15 - Teores de clorofilas (a e b) e de carotenoides aos 7 dias de armazenamento de brócolis submetidos a radiação UV-C colhidos em outubro de 2014 (Experimento 2) e 2015 (Experimento 3)

	UV-C (kJ.m ⁻²)	Experimento 2				Experimento 3			
		Regular		Estresse		Regular		Estresse	
Clorofila a (mg.kg ⁻¹)	0	562,9	Aa	313,1	Bb	311,9	Cb	341,8	Ba
	7	531,8	Aa	454,0	Ab	386,0	Ba	199,5	Cb
	10	470,6	Aa	380,4	Bb	614,1	Ab	727,1	Aa
Clorofila b (mg.kg ⁻¹)	0	150,5	Aa	97,4	Ab	90,1	Cb	103,2	Ba
	7	146,4	Aa	128,1	Aa	106,4	Ba	62,1	Cb
	10	138,2	Aa	109,4	Ab	178,4	Ab	207,9	Aa
Carotenoides (mg.kg ⁻¹)	0	186,1	Aa	108,5	Cb	112,1	Cb	144,9	Ba
	7	182,1	Aa	169,7	Aa	143,7	Ba	68,7	Cb
	10	165,4	Aa	142,5	Bb	224,0	Ab	275,0	Aa

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna, por pigmento, e pela mesma letra minúscula na linha, por experimento, não diferem por cada variável pelo teste Fisher ($p \leq 0,05$).

4.2.5 Açúcares Redutores

Não houve diferenças significativas entre os teores de açúcares redutores dos brócolis cultivados sob estresse hídrico e aporte hídrico regular no experimento 2. Já no experimento 3, os brócolis com estresse hídrico apresentaram maior teor após a colheita e menor após o armazenamento por 7 dias em relação aos cultivados sob aporte hídrico regular.

Tabela16 - Açúcares redutores (mmol de glicose.kg⁻¹) de brócolis cultivados sob aporte hídrico regular e estresse colhidos em outubro de 2014 (Experimento 2) e 2015 (Experimento 3)

	Irrigação	Dia 1		Dia 7	
Experimento 2	Regular	253,7	Aa	209,0	Ab
	Estresse	248,5	Aa	179,6	Ab
Experimento 3	Regular	54,7	Bb	87,7	Aa
	Estresse	102,3	Aa	64,9	Bb

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna, por experimento, e pela mesma letra minúscula na linha não diferem pelo teste Fisher ($p \leq 0.05$).

Houve redução significativa nos açúcares redutores entre o experimento 2 e 3 (Apêndice A).

A aplicação de UV-C resultou em efeitos semelhantes entre os anos analisados, de modo que foram apresentados no mesmo gráfico (Figura 22). A dose de 10 kJ.m⁻² de UV-C levou a reduções nos teores de açúcares redutores aos 7 dias de armazenamento nos brócolis cultivados com estresse hídrico em relação aos teores observados após a colheita.

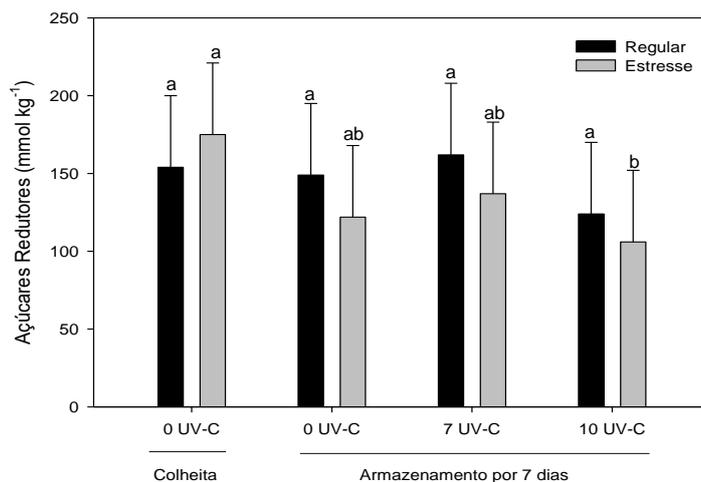


Figura 72 - Média dos Experimentos 2 e 3 de açúcares redutores (mmol glicose), de brócolis cultivados sob aporte hídrico regular e estresse após a colheita e 7 dias de armazenamento tratados com 0, 7 e 10 kJ.m⁻² de UV-C

As barras de erro representam o intervalo de confiança e comparam a mesma dose de UV-C cultivados sob aporte hídrico regular ou estresse. As letras sobre as barras comparam tratamentos (dose de UV-C) distintos ($p \leq 0.05$).

4.2.6 pH

Os brócolis apresentaram pH mais baixo quando cultivados com estresse hídrico em ambos os períodos de armazenamento no Experimento 2, porém no Experimento 3 o padrão observado foi inverso aos 7 dias. Enquanto no Experimento 2 houve uma diminuição no valor do pH ao longo do armazenamento, no Experimento 3 o valor aumentou (Figura 23).

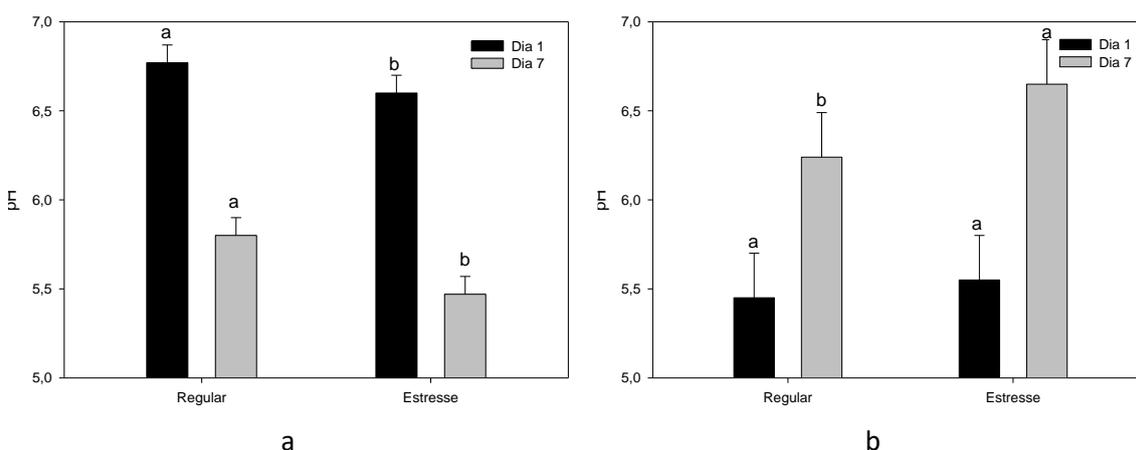


Figura 83 - pH de brócolis cultivados com e sem estresse hídrico ao primeiro e sétimo dia de armazenamento, colhidos em outubro de 2014 (a) e 2015 (b)

As barras de erro representam o intervalo de confiança e comparam o mesmo tratamento entre os períodos de armazenamento. As letras sobre as barras comparam tratamentos distintos no mesmo período, pelo teste Fischer ($p \leq 0.05$).

A aplicação de UV-C levou ao aumento do valor de pH após o armazenamento nas plantas sem estresse hídrico em ambos os cultivos de brócolis no inverno. Nos brócolis cultivados com estresse hídrico, este comportamento foi observado nas plantas colhidas no experimento 2 (Tabela 17).

Tabela 17 -pH de brócolis cultivados com aplicação de 0, 7 e 10 kJ.m⁻² de UV-C, aos 7 dias de armazenamento, dos Experimentos 2 e 3

	Irrigação	0 kJ.m ⁻²		7 kJ.m ⁻²		10 kJ.m ⁻²	
Experimento 2	Regular	5,80	Ac	6,01	Ab	6,03	Aa
	Estresse	5,47	Bb	5,96	Ba	5,94	Ba
Experimento 3	Regular	6,24	Bc	6,66	Ba	6,50	Bb
	Estresse	6,65	Aa	6,75	Aa	6,76	Aa

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna, por experimento, e pela mesma letra minúscula na linha não diferem pelo teste Fisher ($p \leq 0.05$).

4.2.7 Ácido ascórbico

Ao início do armazenamento, o cultivo sob estresse hídrico levou à redução do teor de ácido ascórbico em ambos os experimentos (Figura 24).

Aos 7 dias de armazenamento houve redução próxima a 90% do conteúdo inicial no experimento 2, em que os brócolis cultivados sob estresse continuaram apresentando o menor teor do componente em relação aos cultivados sob aporte hídrico regular. Já no experimento 3, houve maior teor de ácido ascórbico nas plantas cultivadas com estresse, havendo nestas redução superior a 70% do conteúdo inicial, enquanto naquelas cultivadas sob condições regulares de fornecimento de água, a redução foi superior a 90% entre os períodos analisados.

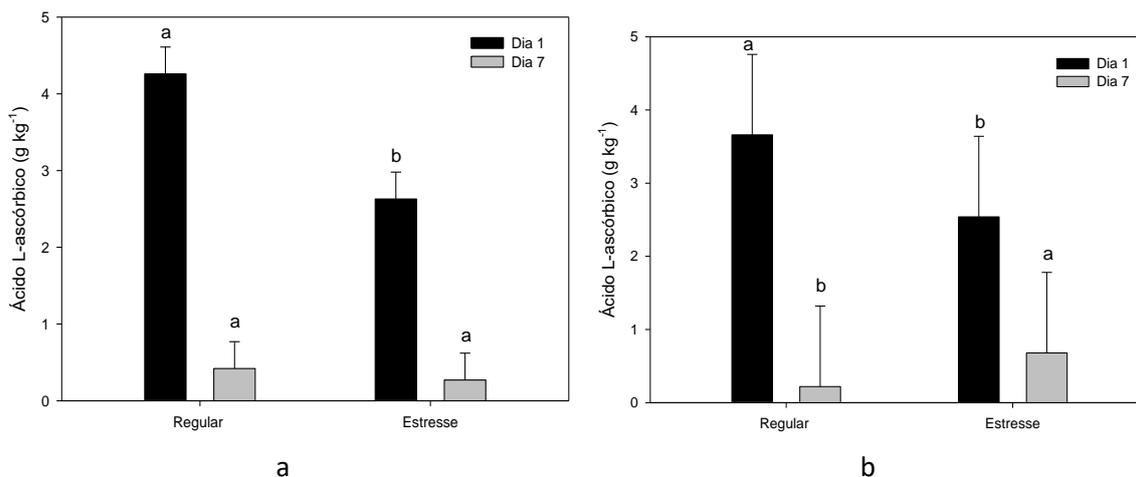


Figura 94 - Ácido ascórbico de brócolis cultivados sob aporte hídrico regular e estresse colhidos em outubro de 2014 (Experimento 2) e 2015 (Experimento 3) As barras de erro representam o intervalo de confiança e comparam o mesmo tratamento entre os períodos de armazenamento. As letras sobre as barras comparam tratamentos distintos no mesmo período, pelo teste Fischer ($p \leq 0.05$).

Com relação à aplicação de radiação UV-C, observou-se que brócolis cultivados com estresse hídrico e tratados com UV-C apresentaram teores menores do que aqueles cultivados sob aporte hídrico regular e tratados com UV-C, em ambas as doses utilizadas (Figura 25).

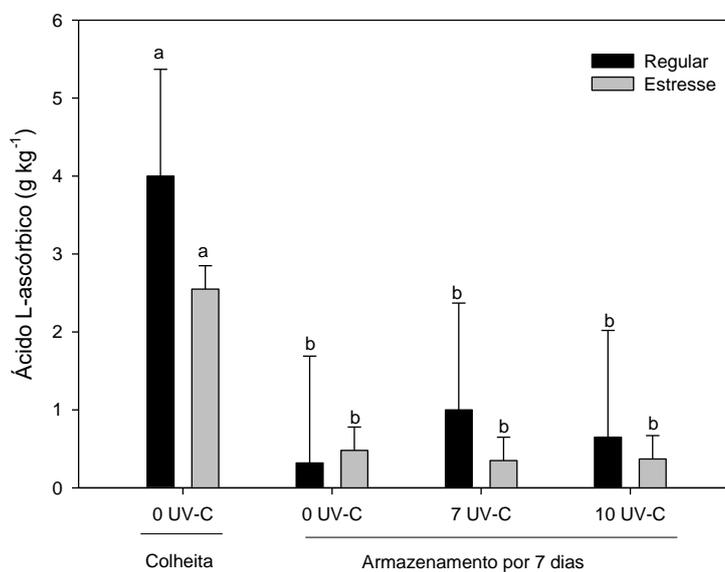


Figura 105 - Média dos Experimentos 2 e 3 de ácido ascórbico de brócolis cultivados sob aporte hídrico regular e estresse, após a colheita e 7 dias de armazenamento, tratados com 0, 7 e 10 kJ m⁻² de UV-C As barras de erro representam o intervalo de confiança e comparam brócolis cultivados sob aporte hídrico regular ou estresse hídrico aplicados com a mesma dose de UV-C. As letras sobre as barras comparam tratamentos (dose de UV-C) distintos ($p \leq 0.05$).

4.2.8 Atividade de Mirosinases

No experimento 2 houve redução da atividade de mirosinases pelo cultivo com estresse hídrico após a colheita, porém durante o armazenamento as enzimas apresentaram maior atividade neste tratamento. No experimento 3, entretanto, não houve diferença significativa na atividade enzimática após a colheita, e após 7 dias de armazenamento, as plantas cultivadas com estresse apresentam menor atividade (Tabela 18).

Tabela 18 - Atividade de mirosinases (mol de glicose.kg⁻¹ de proteína) de brócolis cultivados sob aporte hídrico regular e estresse após a colheita e aos sete dias de armazenamento, colhidos em outubro de 2014 (Experimento 2) e 2015 (Experimento 3).

	Irrigação	Dia 1		Dia 7	
Experimento 2	Regular	35,9	Aa	30,54	Bb
	Estresse	18,12	Bb	70,50	Aa
Experimento 3	Regular	20,28	Ab	32,73	Aa
	Estresse	21,29	Aa	17,99	Bb

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna por experimento e pela mesma letra minúscula na linha não diferem pelo teste Fisher ($p \leq 0.05$).

A aplicação de UV-C não resultou em diferenças entre os anos analisados, de modo que os resultados das colheitas de 2014 e 2015 são apresentados na Figura 26.

Durante o armazenamento por 7 dias, a atividade de mirosinases, entre os brócolis cultivados sob aporte hídrico regular, foi maior naqueles tratados com 10 kJ.m⁻² de UV-C. Comparando este tratamento aos brócolis cultivados sob estresse hídrico tratados com a mesma dose (10 kJ.m⁻² de UV-C), não houve diferença significativa entre os tratamentos.

Entre os brócolis cultivados sob estresse hídrico, a maior atividade foi observada naquelas plantas tratadas com 7 kJ.m⁻² de UV-C.

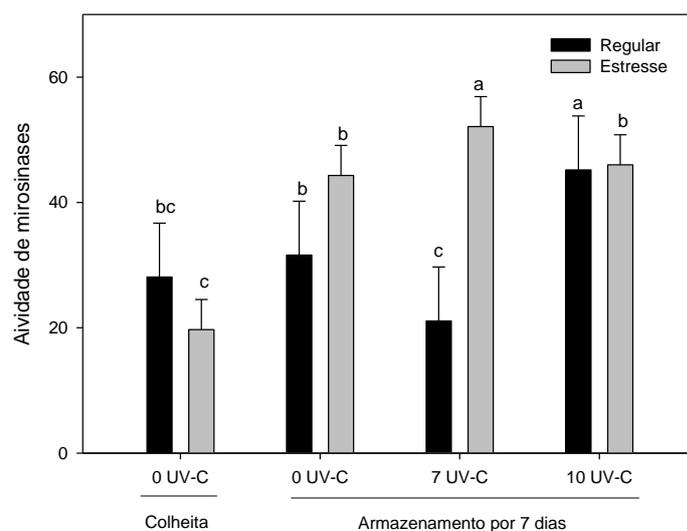


Figura 116 - Média dos Experimentos 2 e 3 de atividade de mirosinases (mol.kg^{-1}) de brócolis cultivados sob aporte hídrico regular e estresse após a colheita e 7 dias de armazenamento, tratados com 0, 7 e 10 kJ.m^{-2} de UV-C

As barras de erro representam o intervalo de confiança e comparam brócolis cultivados sob aporte hídrico regular ou estresse hídrico aplicados com a mesma dose de UV-C. As letras sobre as barras comparam tratamentos (dose de UV-C) distintos ($p \leq 0.05$).

4.2.9 Glicosinolatos totais

Os glicosinolatos totais não apresentaram diferenças significativas pelo cultivo com ou sem estresse hídrico, quando analisados anteriormente ao armazenamento.

Houve diferenças nos teores dos glicosinolatos entre os anos de cultivo, com média dos tratamentos de $108,4 \text{ mmol.kg}^{-1}$ no experimento 2 e $226,4 \text{ mmol.kg}^{-1}$ no experimento 3.

Após o período de armazenamento de 7 dias, os brócolis cultivados sob estresse hídrico apresentaram aumento do teor de glicosinolatos totais, como pode ser visto na Figura 27 nos tratamentos colheita 0 UV-C e armazenamento 0 UV-C. O tratamento com UV-C não resultou em diferenças entre os anos analisados, de modo que foram apresentados no mesmo gráfico (Figura 27).

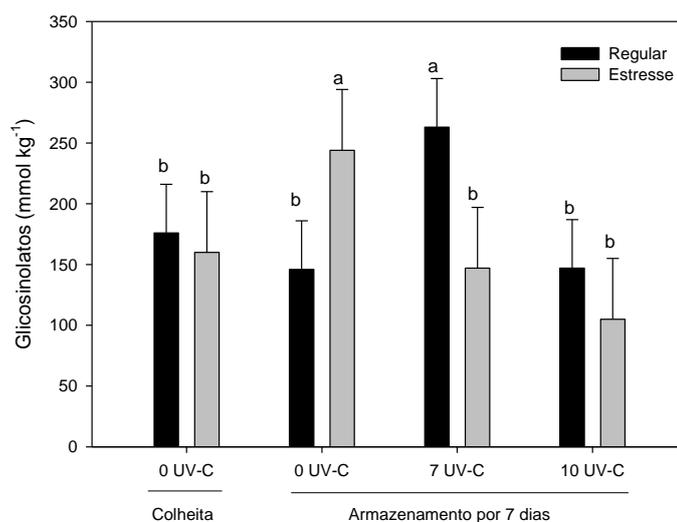


Figura 127 - Média dos Experimentos 2 e 3 de glicosinolatos totais de brócolis cultivados sob aporte hídrico regular e estresse hídrico após a colheita e 7 dias de armazenamento, tratados com 0, 7 e 10 kJ m⁻² de UV-C

As barras de erro representam o intervalo de confiança e comparam brócolis cultivados sob aporte hídrico regular ou estresse hídrico aplicados com a mesma dose de UV-C. As letras sobre as barras comparam tratamentos (dose de UV-C) distintos ($p \leq 0.05$).

O tratamento com 7 kJ.m⁻² de UV-C levou ao aumento do teor de glicosinolatos totais aos 7 dias de armazenamento, comparado aos brócolis não tratados e aqueles que receberam a dose de 10 kJ.m⁻², nas plantas cultivadas sob condições regulares de fornecimento de água. Estas plantas, tratadas com 7 kJ.m⁻² de UV-C, apresentaram a menor atividade de mirosinases aos 7 dias de armazenamento, o que pode ter propiciado o acúmulo dos glicosinolatos.

Já entre as plantas cultivadas com estresse hídrico, a aplicação de UV-C reduziu os valores de glicosinolatos totais independentemente da dose.

4.2.10 Isotiocianatos

O cultivo sob estresse hídrico levou a diferenças significativas, nos teores de isotiocianatos, nas plantas cultivadas sob aporte hídrico regular após a colheita, porém foram observados padrões opostos entre os experimentos (Tabela 19). Enquanto no experimento 2 houve uma redução do teor de isotiocianatos pelo cultivo sob estresse hídrico, no experimento 3 houve um aumento do teor. Os valores após armazenamento não diferiram pelo emprego

do tratamento pré-colheita ou experimento analisado , com média de 65,71 mmol.kg⁻¹.

Tabela 19 – Isotiocianatos (mmol.kg⁻¹) após a colheita de brócolis cultivados sob aporte hídrico regular e estresse colhidos em outubro de 2014 (Experimento 2) e 2015 (Experimento 3).

	Experimento 2	Experimento 3
Regular	73,77 Aa	40,50 Bb
Estresse	61,46 Ba	67,00 Aa

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna e pela mesma letra minúscula na linha não diferem pelo teste Fisher ($p \leq 0,05$).

A aplicação de UV-C levou ao aumento dos teores de isotiocianatos somente nas plantas cultivadas com estresse hídrico quando aplicada a dose de 10 kJ.m⁻² de UV-C (Figura 28) em ambas as safras analisadas.

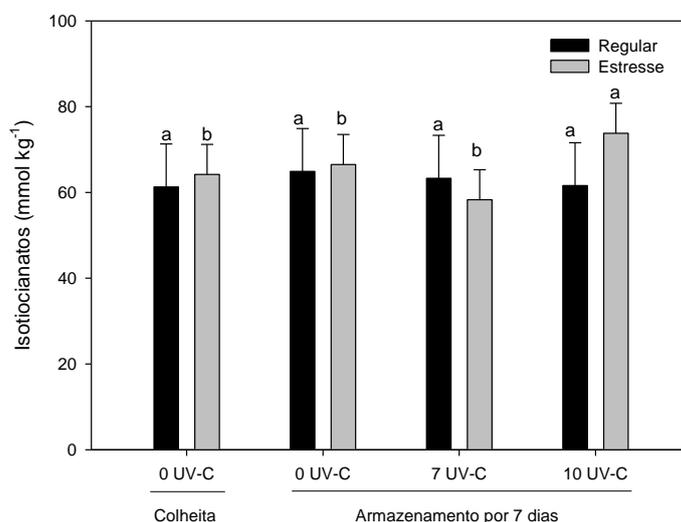


Figura 138 - Média dos Experimentos 2 e 3 de isotiocianatos de brócolis cultivados sob aporte hídrico regular e estresse após a colheita e 7 dias de armazenamento, tratados com 0, 7 e 10 kJ.m⁻² de UV-C

As barras de erro representam o intervalo de confiança e comparam brócolis cultivados sob aporte hídrico regular ou estresse hídrico aplicados com a mesma dose de UV-C. As letras sobre as barras comparam tratamentos (dose de UV-C) distintos ($p \leq 0,05$).

5 Discussão

5.1 Análises de crescimento

5.1.1 Efeitos do Estresse Hídrico

Analisando o Experimento 1 separadamente pelas colheitas realizadas em fevereiro e março de 2014, observaram-se diferenças significativas entre os

tratamentos com e sem estresse hídrico no parâmetro peso. No entanto, apresentaram padrões opostos, com maiores valores nas plantas sem estresse hídrico na primeira colheita e nas plantas com estresse hídrico na segunda. As demais variáveis de crescimento dos brócolis colhidos no Experimento 1, entretanto, não apresentaram diferenças significativas.

As diferenças no peso podem ter ocorrido porque as condições de estresse entre as colheitas foram diferentes; enquanto as primeiras foram colhidas num período menor de dias após o período de estresse hídrico, as colhidas posteriormente foram submetidas a um segundo período de estresse, menos intenso e a uma quantidade maior de dias sem estresse até a colheita. O critério para a escolha dos brócolis a serem colhidos em fevereiro ou março não foi aleatório, mas sim por apresentarem crescimento completo da inflorescência. Cultivares de brócolis que apresentam inflorescência podem ser produzidas durante o verão, porém apresentam menor produtividade e maior incidência de crescimento de inflorescências prematuras devido à ocorrência de menos frio do que no inverno (FERREIRA; SOUZA; GOMES et al., 2013). O cultivo de brássicas no verão é possível devido à obtenção de cultivares que não necessitam de vernalização, processo pelo qual o florescimento começa ou é intensificado pela exposição a um determinado período de frio, prevenindo o florescimento prematuro (BLACKMAN, 2017).

Nos experimentos 2 e 3, entretanto, o estresse hídrico diminuiu significativamente o peso, diâmetro da inflorescência e altura independentemente do ano de colheita.

Este tipo de estresse já foi identificado como fator que diminui parâmetros de crescimento em diversos trabalhos. Após uma a duas semanas de permanência sob estresse hídrico no nível de disponibilidade de água de aproximadamente 40% e em plantas cultivadas sob condição de saturação, cujo nível chega a 80%, já foi observado diferença negativa no peso seco de brócolis comparado com o controle, em que há disponibilidade de 70% (KHAN; ULRICH; MEWIS, 2011). Em contraste, Cogo et al. (2011), não observaram redução de rendimento quando brócolis foram cultivados sob estresse hídrico moderado. Discrepâncias entre resultados podem ocorrer devido às diferentes intensidades de estresse. Segundo Tangune et al. (2016), inflorescências de brócolis apresentam desenvolvimento ótimo quando as tensões de água no

solo durante o cultivo são de 15 kPa, e rendimentos menores são observados com tensões de água no solo superiores a 45 kPa. Para evitar a diminuição de inflorescência durante o cultivo com estresse, uma alternativa é obter maior controle das condições agrônômicas, tais como tensão de água no solo, luz, temperatura e umidade (COGO et al., 2011), o que é mais facilmente controlável durante cultivos em estufas. Com exceção da tensão de água no solo, as demais variáveis foram medidas, mas não controladas neste estudo.

Além disso, outras diferenças entre os brócolis dos três experimentos aqui analisados podem ter ocorrido devido a variações das condições climáticas (Figura 29).

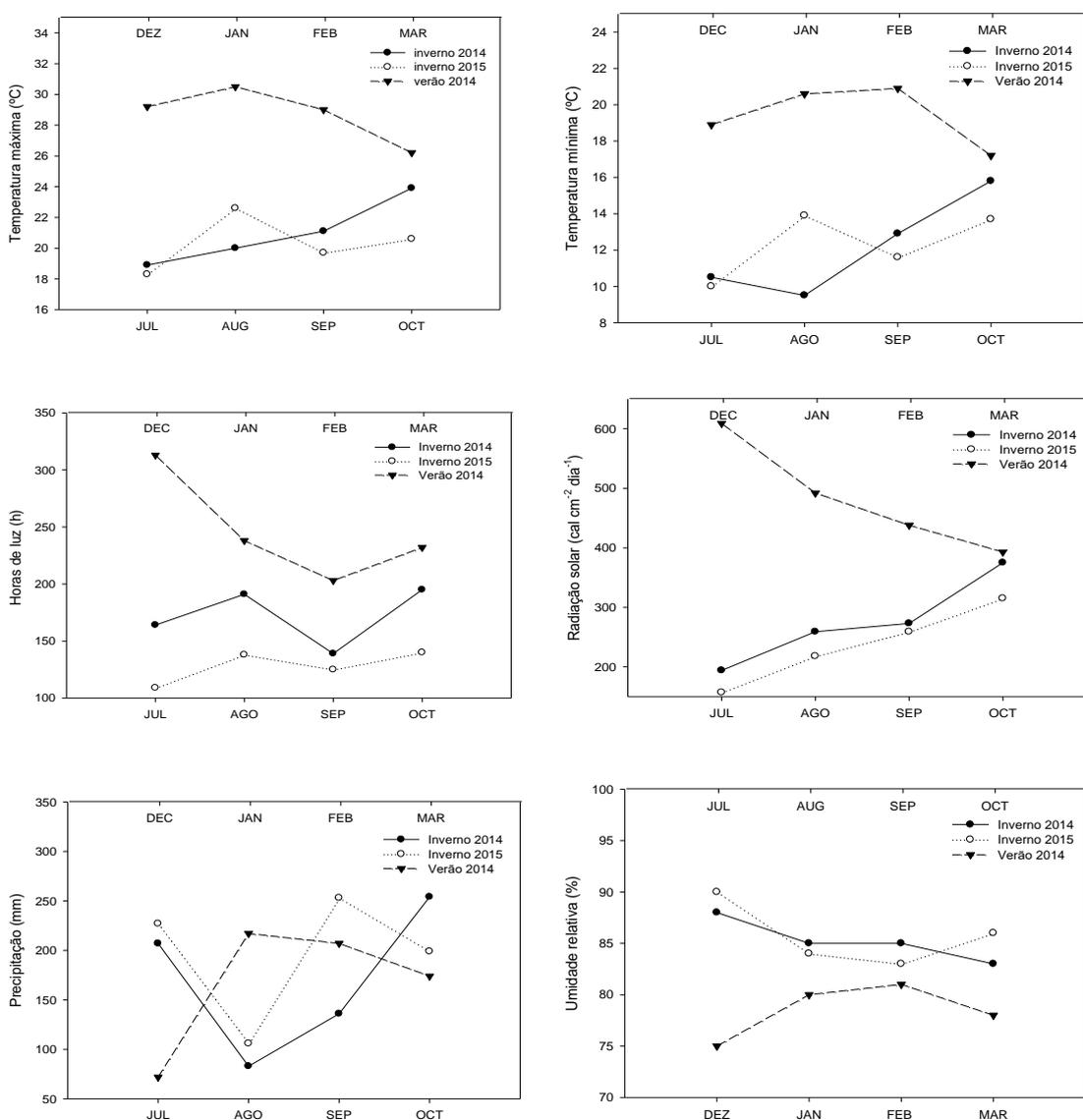


Figura 29 - Dados climáticos do Capão do Leão referentes aos meses em que houve o cultivo de brócolis nos experimentos 1 (Verão 2014), 2 (Inverno 2014) e 3 (Inverno 2015)

De modo geral, os brócolis colhidos no verão foram submetidos a maiores temperaturas durante o período a campo, além de mais horas de luz, radiação solar e menor umidade relativa do que os cultivados no inverno.

Analisando-se o acumulado de insolação e radiação total nos quinze dias anteriores a colheita, que compreendem o período em que todos os experimentos tiveram estresse hídrico associados a intervalos de dias sem estresse (como foi exposto nos materiais e métodos), observou-se divergências entre as colheitas do verão e os experimentos do inverno (Tabela 20).

Tabela 20 - Insolação e radiação total em quinze dias anteriores às colheitas realizadas nos experimentos 1, 2 e 3

	Colheita 1 Experimento 1	Colheita 2 Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3
Insolação total em 15 dias (horas e décimos)	119,5	78,7	121,6	60,6
Radiação total (cal.cm ⁻² .15 dias ⁻¹)	6784	5034	6454	4108

Para as plantas colhidas no verão, observa-se que durante fevereiro estiveram expostas a uma maior insolação e radiação total nos quinze dias anteriores à colheita com relação às colhidas em março. Já durante o inverno de 2014, semelhantemente à primeira colheita de verão, houve maior incidência de radiação e horas de sol, enquanto em 2015 foram encontrados os menores valores. Estas duas variáveis ambientais podem estar relacionadas com os resultados obtidos, uma vez que confirmam que a colheita 1 do experimento 1 e o experimento 2 tiveram condições ambientais semelhantes, o que pode explicar acúmulos semelhantes de algumas variáveis dependentes, como açúcares, ácido ascórbico, atividade de mirosinases e glicosinolatos, discutidas posteriormente.

Em experimentos a campo, apesar de se buscar reduzir o efeito de variáveis ambientais, tais como irrigação controlada, monitoramento da tensão de água no solo e cobertura dos canteiros com plástico, estas devem ser consideradas para a construção dos resultados, uma vez que podem estar diretamente relacionadas com os resultados obtidos, influenciando os

tratamentos utilizados. Variabilidades ambientais influenciam o desenvolvimento de brócolis em produções comerciais, podendo alterar a data de colheita de um ano para outro, comumente, em até duas semanas (LINDEMANN-ZUTZ; FRICKE, 2016).

5.2 Potencial Osmótico

5.2.1 Efeitos do Estresse Hídrico

O potencial osmótico foi menor em plantas cultivadas sob condições de estresse hídrico. Estudos mostram que mudas de brócolis com 20 dias tratadas com soluções salinas de 40 e 80 mM apresentam decréscimos no coeficiente de permeabilidade osmótica principalmente ao primeiro dia de tratamento (LÓPEZ-BERENGUER et al., 2008). Decréscimos no potencial osmótico em plantas que foram cultivadas sob estresse salino ou hídrico são observados, devido à acumulação de solutos como açúcares, prolina, glicina, betaína e polióis no citoplasma, como mecanismo para adaptação após a percepção da condição adversa (ZHIFANG; LOESCHER, 2003), sendo utilizados como indicadores de estresse hídrico.

Foi visto nos experimentos 2 e 3 que, após 15 dias de armazenamento, os valores dos brócolis cultivados sob aporte hídrico regular decaem enquanto as plantas cultivadas sob estresse hídrico permanecem com valores constantes ou apresentam aumento, dependendo do tratamento. Possivelmente este aumento do potencial osmótico durante o armazenamento pode ter ocorrido pela perda de água durante o armazenamento, evento comum durante a pós-colheita de brócolis (LEMOINE et al., 2008).

Deste modo, a análise de potencial osmótico confirmou a ocorrência de estresse hídrico neste estudo.

5.3 Cor e clorofilas a e b e carotenoides

5.3.1 Efeitos do Estresse Hídrico

Na colheita 1 do experimento 1 observou-se maiores valores de ângulo Hue nos brócolis cultivados sob estresse hídrico após a colheita, porém durante o armazenamento por 7 dias a 4 °C não houve diferença entre os valores. Entretanto, os teores das clorofilas a e b e carotenoides foram maiores nos brócolis com estresse hídrico apenas após o armazenamento. Deste modo, mesmo que não perceptível visualmente, o cultivo com estresse hídrico levou a uma acumulação de pigmentos.

Aumentos de teores de clorofilas ao longo do armazenamento podem ocorrer devido à manutenção de transcritos de genes que codificam para proteínas CAB (do inglês *Chlorophyll a/b-binding precursor protein*), que normalmente são reduzidos após a colheita (GAPPER et al., 2005).

Já nos experimentos 2 e 3, apenas no período anterior ao armazenamento no ano de 2015 (experimento 3) o estresse hídrico promoveu aumentos de ângulo Hue. O cultivo sob condições de estresse hídrico próximo ao desenvolvimento completo das inflorescências promove o aumento dos valores de ângulo Hue e conseqüentemente da intensificação da coloração verde de brócolis (WURR et al., 2002), além de preservar a retenção da cor por mais tempo durante o armazenamento refrigerado (COGO et al., 2011).

Nas plantas com estresse hídrico do experimento 3, em que se observou maior ângulo Hue pelo tratamento pré-colheita, não foi observado aumento nos teores de clorofilas a e b após a colheita. Após o armazenamento, entretanto, observou-se maior teor de clorofila a pelo cultivo sob estresse hídrico.

No Experimento 2, em que não há diferenças no ângulo Hue, há maiores teores de pigmentos após a colheita nas plantas cultivadas sob estresse, porém após o armazenamento o padrão é inverso. Deste modo, se observou que aumentos de ângulo Hue não estiveram diretamente relacionados a maiores teores de pigmentos em brócolis e que o acúmulo de pigmentos devido aos tratamentos pré-colheita variou entre os experimentos.

Os experimentos 2 e 3 apresentaram redução no valor de ângulo Hue independente dos tratamentos durante o armazenamento por até 15 dias. A redução observada não representa o final do período de vida de prateleira da hortaliça, uma vez que para tal, deve-se observar redução superior a 30% do valor de ângulo Hue obtido após a colheita (YUAN et al., 2010). Reduções de valor de ângulo Hue durante o armazenamento a 20 °C, acompanham outras

alterações metabólicas tais como degradação de clorofilas, redução de açúcares redutores, glicosinolatos totais e sulforafano (LI et al., 2016). Neste estudo, houve alterações metabólicas durante o armazenamento refrigerado que acompanharam o decréscimo de ângulo Hue.

Teores de clorofilas em *Arabidopsis thaliana* podem ser reduzidos devido à baixa incidência de horas de luz. Quando isto ocorre, aumenta a proporção de clorofila b em relação à clorofila a, reduzindo o valor da relação clorofila a/ clorofila b (MISHRA et al., 2012). Nas colheitas de verão, quando a incidência de luz foi maior considerando todo o período de cultivo, os brócolis sob aporte hídrico regular apresentaram maiores teores de clorofila a do que os brócolis cultivados no inverno (Apêndice A). Já quando as plantas foram cultivadas com estresse hídrico não foi observado tal relação, pois o estresse reduziu os valores de clorofilas a no cultivo de verão, analisado após a colheita.

De modo geral, aumentos de pigmentos ocorreram provavelmente devido à maior incidência de horas de luz, radiação e temperaturas durante todo o período a campo, uma vez que os maiores valores foram encontrados nos brócolis cultivados no verão.

5.3.2 Efeitos da Radiação UV-C

O tratamento com UV-C levou à alteração na coloração de brócolis, medida através do ângulo Hue, somente após o armazenamento no experimento 1, porém com padrões opostos entre as colheitas. A aplicação da dose de 7 kJ.m^{-2} ocasionou a diminuição dos valores nos brócolis colhidos em fevereiro, cultivados sob aporte hídrico regular, e o aumento do ângulo Hue nos colhidos em março, cultivados nas ambas condições pré-colheita.

Nos experimentos 2 e 3, a aplicação de UV-C não influenciou a coloração dos floretes de brócolis. Estudos reportam que a combinação de exposição à luz solar e armazenamento sob $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e $7 \text{ }^{\circ}\text{C}$ prolongam a vida de prateleira por até três dias e diminuem a deterioração sensorial (ZHAN et al., 2012). Brócolis tratados com UV-C e armazenados a $20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ apresentam uma maior vida de prateleira pela retenção da cor verde na hortaliça, o que pode ocorrer devido à redução da atividade de clorofilase e da taxa de respiração,

observadas concomitantemente (COSTA et al., 2006). Ainda que não tenham sido observados maiores valores de ângulo Hue pela aplicação de radiação UV-C, com relação aos pigmentos, de modo geral, houve maiores teores nas plantas tratadas com UV-C do que nas não tratadas após o armazenamento.

No Experimento 1, em ambas as colheitas se observou aumento de carotenoides pela aplicação de 7 kJ.m^{-2} de UV-C em plantas cultivadas sob aporte hídrico regular e com estresse, além de se ter observado aumento também de clorofilas a e b pela mesma dose nas plantas sem estresse hídrico. No Experimento 2, a mesma dose de UV-C levou a aumento de teores de pigmentos apenas nos brócolis cultivados sob estresse hídrico e no Experimento 3, houve aumento do teor pela aplicação das duas doses nos brócolis cultivados sob aporte hídrico regular, porém apenas 10 kJ.m^{-2} levou ao aumento dos teores nos brócolis cultivados sob estresse.

O acúmulo de pigmentos devido à aplicação de 10 kJ.m^{-2} de radiação UV-C provavelmente não está relacionado à diminuição da expressão de clorofilases, uma vez que os genes *BoCLH1* e *BoCLH2* aumentam significativamente nas plantas tratadas com radiação, em relação ao controle, durante o armazenamento, havendo diminuição na expressão apenas da feofitinasase *BoPPH* (BÜCHERT; CIVELLO; MARTÍNEZ, 2011). Porém, já foi demonstrada a diminuição da atividade de clorofilases de plantas tratadas com radiação UV-C, no período de 2 a 6 dias após a aplicação (COSTA et al., 2006).

Neste estudo, as condições ambientais durante o cultivo dos brócolis combinadas à aplicação de radiação UV-C podem ter levado a respostas diferentes entre os experimentos. Os experimentos 2 e 3 foram cultivados no inverno, com condições mais brandas de insolação e temperaturas durante o período de cultivo com relação ao verão (Figura 29), porém as características entre um ano e outro também diferiram (Tabela 20).

Assim, de modo geral observou-se aumento dos teores de pigmentos pela aplicação de radiação UV-C, mas não foi possível determinar uma dose que, aplicada a brócolis cultivados sob aporte hídrico regular ou sob estresse, leve a aumento dos teores independentemente de outras condições ambientais de cultivo.

5.4 Açúcares redutores

5.4.1 Efeitos do Estresse hídrico

O estresse hídrico não levou a respostas homogêneas quanto aos teores de açúcares redutores entre os experimentos. Na colheita realizada em fevereiro de 2014 do experimento 1, houve diminuição anteriormente e após 7 dias de armazenamento pelo cultivo com estresse hídrico, o que não ocorreu nas plantas colhidas em março de 2014, em que se observou aumento ao longo do tempo pelo cultivo com estresse.

No Experimento 2, não foram observadas diferenças nos teores de açúcares em brócolis cultivados com ou sem estresse, enquanto no experimento 3, o maior teor foi observado nas plantas cultivadas com estresse hídrico apenas anteriormente ao armazenamento. Já foi relatado que, em *Arabidopsis thaliana* submetidas à seca, com conteúdo relativo de água de 70 a 75% por 6-7 dias, ou ao aumento de 16 °C/ 6 h na temperatura habitual de cultivo, ou a estas duas condições combinadas, há o aumento de sacarose e outros açúcares como glicose e maltose, principalmente nas plantas submetidas apenas ao estresse hídrico (RIZHSKY et al., 2004). A combinação de tipos de estresse, tais como o osmótico, diferentes tipos de irradiação, temperaturas extremas, pode submeter a planta a uma reorganização de seu metabolismo diferente daquela observada quando apenas uma situação adversa é aplicada, pois um composto que funciona como resposta à uma situação adversa, pode se tornar tóxico às células quando há outro tipo de estresse associado, quando por exemplo não há sua remoção adequada após a ação como metabólito de defesa ou se há acúmulos de intermediários de sua biossíntese ou degradação que são tóxicos (RIZHSKY et al., 2004). Os brócolis cultivados com estresse hídrico apresentaram menores teores de açúcares redutores no verão do que no inverno (Apêndice A), provavelmente porque estas condições ambientais de radiação, insolação e temperaturas elevadas durante todo o cultivo representaram um fator de estresse adicional ao hídrico, levando a maiores necessidades de rearranjo do metabolismo do que nas plantas sem cultivo com estresse hídrico.

Os brócolis que foram expostos a maior quantidade de horas de insolação e doses de radiação durante quinze dias antes da colheita (visto na Tabela 20), como no experimento 2 (Apêndice A), apresentaram acúmulo de açúcares redutores após a colheita. Este comportamento foi encontrado em outras variáveis que se relacionam com o metabolismo de glicosinolatos, como pH e ácido ascórbico.

5.4.2 Efeitos da Radiação UV-C

A dose de 10 kJ.m⁻² de UV-C levou à diminuição dos teores de açúcares redutores ao longo dos armazenamento nas plantas colhidas em fevereiro de 2014 do experimento 1 e nos experimentos 2 e 3, nas plantas cultivadas com estresse. Brócolis tratados com 8 kJ.m⁻² de UV-C e aquecidos por 3 h a 45 °C apresentam maiores reduções de açúcares durante o armazenamento do que os não tratados (LEMOINE et al., 2008). A aplicação de radiação UV-B leva ao decréscimo menos acentuado de açúcares totais e redutores durante o armazenamento, provavelmente porque o tratamento retarda a ocorrência da senescência (BÜCHERT et al., 2011), porém pode ocorrer que em condições mais elevadas de radiação, como 10 kJ.m⁻², combinada a outro fator estressor, promovam efeito contrário de indução de senescência.

A dose de 7 kJ.m⁻² levou ao aumento dos teores de açúcares ao longo do armazenamento apenas na colheita 2 do experimento 1. Não foi encontrada uma dose de UV-C que tenha promovido o acúmulo de açúcares redutores nos demais experimentos.

5.5 pH

5.5.1 Efeitos do Estresse Hídrico

No experimento 1, o estresse hídrico não levou a alterações nos valores de pH, enquanto nos experimentos 2 e 3 o efeito não foi consistente entre os anos. Sob condições de seca, a seiva de plantas pode aumentar o pH em até uma unidade, fenômeno possivelmente envolvido tanto na indução de ácido

abscísico quanto fechamento estomático (WILKINSON, 1992). Apesar deste fenômeno não ter sido observado neste trabalho, semelhantemente ao que ocorreu para açúcares redutores e ácido ascórbico, os maiores valores de pH foram observados nos experimentos em que houve maior incidência de insolação e radiação total nos quinze dias anteriores à colheita (observado na Tabela 20).

O pH é um dos fatores relacionados à conversão dos glicosinolatos a isotiocianatos, devendo o vegetal estar na faixa de 6 a 7 para que não sejam formados os demais compostos resultantes do metabolismo de glicosinolatos, tais como tiocianatos, 5-oxazolidina-2-tionas, epitionitrilas e nitrilas (LATTÉ; APPEL; LAMPEN, 2011). Entre as colheitas realizadas, a do Experimento 3, de outubro de 2015, foi aquela em que as plantas apresentaram o menor valor de pH, inferior a 6, e as plantas cultivadas sob aporte hídrico regular apresentaram o menor teor de isotiocianatos, o que pode estar relacionado (Apêndice A). Houve também baixa atividade de mirosinases, se comparado aos demais experimentos.

5.5.2 Efeitos da Radiação UV-C

A aplicação de UV-C não levou a modificações no pH que tenham se mantido entre as colheitas do experimento 1 ou entre os experimentos 2 e 3. Os valores de pH de todos os tratamentos, entretanto, são os adequados para que ocorra a formação de isotiocianatos.

5.6 Ácido Ascórbico

5.6.1 Efeitos do Estresse Hídrico

No experimento 1, o estresse hídrico levou à redução do conteúdo de ácido ascórbico após a colheita, porém após o armazenamento não houve diferença significativa entre os resultados. Após a colheita dos Experimentos 2 e 3 também se observou-se a redução dos teores de ácido ascórbico.

O estresse salino, que como a redução do aporte hídrico possui efeitos osmóticos sobre vegetais, reduz os teores de ácido ascórbico em trigo, possivelmente pela sua ação como antioxidante de espécies reativas de oxigênio produzidas pela condição adversa de cultivo (ATHAR; KHAN; ASHRAF, 2008). Nos cloroplastos, o ácido ascórbico pode atuar sobre espécies reativas de oxigênio, evitando a oxidação de carotenoides e tocoferóis ou reduzindo estes compostos quando oxidados (REDDY et al., 2004). O ascorbato e outros compostos como tocoferol, glutatona reduzida e os carotenoides reagem com as substâncias formadas pelo estresse oxidativo induzido pela radiação (GARTIA et al., 2003).

Na colheita de março do experimento 1, os brócolis cultivados sob estresse hídrico apresentaram os menores teores de ácido ascórbico dentre todos os experimentos (Apêndice A), e estas plantas foram aquelas com os menores teores de carotenoides totais. Na colheita de fevereiro do experimento 1, observaram-se os maiores teores de ácido ascórbico dentre todos os cultivos, e nestas plantas os carotenoides estavam também em concentração elevada, podendo ter havido um aumento dos antioxidantes devido a um aumento de espécies reativas de oxigênio (EROs) induzida pela radiação e outras condições ambientais mais extremas observadas no verão.

5.6.2 Efeitos da Radiação UV-C

A aplicação de 7 e 10 kJ.m⁻² ocasionou a redução dos teores de ácido ascórbico após o armazenamento em ambas as colheitas do experimento 1 nas plantas cultivadas sob aporte hídrico regular. Já entre as plantas cultivadas com estresse hídrico, a dose de 7 kJ.m⁻² levou ao aumento dos teores do composto enquanto 10 kJ.m⁻², à redução. Relacionando a degradação do ácido ascórbico à sua capacidade antioxidante de carotenoides, quando aplicada a dose de 7 kJ.m⁻², se observou aumento de teores de carotenoides totais em relação às demais doses, enquanto 10 kJ.m⁻² também levou à diminuição dos teores nas plantas cultivadas sob estresse. Pode ter ocorrido que a combinação de duas situações de estresse, a dose mais elevada de UV-C e a

redução do aporte hídrico, tenha induzido a degradação concomitante de ambos os antioxidantes.

Nos experimentos 2 e 3 houve uma acentuada degradação de ácido ascórbico pelo armazenamento por 7 dias independente do tratamento com UV-C, de mais de 80% do teor inicial. Estudos prévios encontraram perdas de aproximadamente 75% de ácido L-ascórbico em brócolis após 6 dias de armazenamento a temperatura ambiente, independentemente se processados minimamente ou se mantidos como inflorescências intactas (RASEETHA et al., 2012). O armazenamento por períodos prolongados resulta em decréscimos de ácido L-ascórbico, atividade antioxidante, compostos fenólicos totais e flavonoides (TOPCU et al., 2015). O conteúdo de ácido ascórbico após o armazenamento de inflorescências de brócolis é dependente de condições de pré-estocagem e temperatura. Níveis mais altos do composto são mantidos quando a temperatura de pré-estocagem utilizada por 4 dias é de 0 °C, quando comparado às inflorescências mantidas por 7 dias à 4 °C (RYBARCZYK-PLONSKA et al., 2014). Apesar das temperaturas de estocagem entre os experimentos terem sido as mesmas, o padrão de degradação do ácido ascórbico diferiu entre o experimento 1 e os experimentos 2 e 3.

Deste modo, houve diferenças quanto às respostas após a aplicação de radiação UV-C dependendo da estação de cultivo de brócolis.

5.7 Mirosinases

5.7.1 Efeitos do Estresse Hídrico

O estresse hídrico levou à redução da atividade de mirosinases na colheita 1 do experimento 1 e no experimento 2, anteriormente ao armazenamento. Porém, este efeito não foi reprodutível na segunda colheita realizada no experimento 1 ou no experimento 3. A redução de atividade de mirosinases pelo estresse hídrico pode estar relacionada a fatores ambientais associados, como a dose radiação total e quantidade de horas de insolação nos dias anteriores à colheita (visto na Tabela 20), uma vez que somente ocorreu naqueles experimentos em que estas variáveis ambientais foram mais intensas durante o cultivo. Observou-se também que nas colheitas com menor

atividade de mirosinases, houve maior acúmulo de glicosinolatos entre os experimentos analisados (Apêndice A). A diminuição da atividade de mirosinases já foi previamente relacionada ao estresse salino, que fisiologicamente é similar ao estresse hídrico (YUAN et al., 2010).

O ácido ascórbico atua no metabolismo dos glicosinolatos como cofator enzimático das enzimas mirosinases, ligando-se de modo a alterar a região em que possivelmente estão os resíduos de aminoácidos (OHTSURU; HATA, 1979). Porém, os teores de ácido ascórbico encontrados no brócolis possivelmente não influenciam na atividade de mirosinases, visto que as quantidades necessárias para sua atuação como cofator são muito inferiores às encontradas no vegetal (KLEINWÄCHTER; SELMAR, 2004).

O estresse hídrico, deste modo, possivelmente ocasiona a redução da atividade de mirosinases apenas quando os brócolis são submetidos a outras condições ambientais em níveis mais intensos durante o cultivo.

5.7.2 Efeitos da Radiação UV-C

No experimento 1, os efeitos da aplicação de UV-C não foram reprodutíveis entre as colheitas. Nos experimentos 2 e 3, observou-se uma redução da atividade de mirosinases aos 7 dias de armazenamento pela aplicação de 7 kJ.m^{-2} de UV-C em brócolis cultivados sob aporte hídrico regular, porém a dose de 10 kJ.m^{-2} promoveu efeito oposto. O tratamento com 7 kJ m^{-2} de UV-C, além de possuir a menor atividade de mirosinases aos 7 dias, promoveu também o acúmulo de glicosinolatos. Em brócolis cujas mirosinases foram inativadas se encontra uma degradação menos acentuada de glicosinolatos (VAN EYLEN, 2009).

Já nos brócolis cultivados com estresse hídrico, a aplicação de UV-C em ambas as doses levou ao aumento da atividade de mirosinases em relação àquela observada após a colheita, sendo a dose 7 kJ.m^{-2} a que ocasionou o maior aumento da atividade da enzima. As mirosinases estão ligadas à resposta de vegetais em situações de ataques de patógenos. Pode ter ocorrido que a dose de 7 kJ. m^{-2} em plantas sob aporte hídrico regular não tenha ativado os mecanismos de defesa, porém 10 kJ m^{-2} tenha sido percebida como uma

condição mais extrema. Nos brócolis cultivados sob estresse hídrico combinado à aplicação de UV-C, provavelmente houve a ativação destes mecanismos já com a aplicação da menor dose.

5.8 Glicosinolatos

5.8.1 Efeitos do Estresse Hídrico

O estresse hídrico diminuiu o conteúdo de glicosinolatos em ambos períodos analisados no experimento 1. Khan, Ulrichs, Mewis, (2011) observaram que há redução nos glicosinolatos totais após brócolis serem submetidos a uma semana de estresse hídrico.

A redução de glicosinolatos totais observada nos cultivos de verão pode ter ocorrido porque estas plantas foram expostas a temperaturas mais elevadas, maior período de iluminação e incidência de radiação durante os meses de cultivo a campo, que por si podem ter sido percebidas como um fator adverso ao metabolismo dos compostos nos brócolis, representando o estresse hídrico um fator combinado a estas condições ambientais. Temperaturas e iluminação associadas com a latitude e estação do ano afetam a qualidade sensorial de floretes de brócolis (JOHANSEN et al., 2017).

Nos experimentos 2 e 3, colhidos no inverno, não houve diferenças entre plantas cultivadas com ambos os tratamentos pré-colheita ao início do armazenamento, porém após 7 dias houve aumento do teor de glicosinolatos nos brócolis cultivados sob estresse. López-Berenguer et al. (2008) observaram um aumento no teor de glicosinolatos totais de mudas de brócolis cultivadas sob diferentes condições de salinidade, de 40 e 80 mM. Segundo os autores, pode ocorrer um aumento de biossíntese de glicosinolatos como forma de adaptação ao estresse. Além disso, como discutido anteriormente, no inverno as condições climáticas durante o período de cultivo como um todo foram menos intensas (visto na Figura 29), o que pode ter levado à diferenças na acumulação de glicosinolatos entre as estações. Brócolis cultivados em maiores valores de latitude norte, menores temperaturas e fotoperíodos longos apresentam características diferentes daqueles cultivados em regiões mais ao sul, com teores de glicosinolatos individuais que são influenciados

diferentemente pela temperatura e horas de sol, com alifáticos sendo aumentados por cultivo a temperaturas menores e os indólicos, por temperaturas maiores (MØLMANN et al., 2015).

Independentemente do estresse hídrico, observando as características dos brócolis logo após a colheita (Apêndice A), os menores conteúdos de açúcares redutores foram encontrados na colheita 2 do Experimento 1, que apresentou os maiores teores de glicosinolatos. Relação contrária foi observada no Experimento 2, com concentração de açúcares redutores significativamente maior em relação aos demais experimentos e teores de glicosinolatos totais menor. Observando a insolação total e radiação acumulada apenas nos dias anteriores à colheita (apresentados Tabela 20), possivelmente baixos valores dos parâmetros estão relacionados com o acúmulo de glicosinolatos (e diminuição de açúcares). O aumento da concentração de glicosinolatos em brócolis é dependente não apenas da estação de cultivo, mas também de características climáticas que variam de um ano para outro (AIRES et al., 2011).

Em *Arabidopsis thaliana*, a exposição a concentrações de 1, 3 e 5% de glicose estimula o acúmulo dos glicosinolatos e de genes relacionados à sua rota. Em plantas mutantes insensíveis à glicose (*gin 2-1*) e a glicose e sacarose (*rgs 1-2*) ocorre a diminuição do conteúdo de glicosinolatos totais (MIAO et al., 2013). Entretanto, quando se trata de açúcares produzidos pelo vegetal, também é razoável que ocorra o aumento de açúcares redutores devido à diminuição de glicosinolatos, pois quando hidrolisados os glicosinolatos liberam glicose.

Neste estudo, observou-se que o estresse hídrico ocasionou a diminuição dos teores de glicosinolatos após a colheita no experimento conduzido no verão e que, no inverno, houve acúmulo de glicosinolatos pelo estresse durante o armazenamento. Glicosinolatos e compostos relacionados ao seu metabolismo, como açúcares, ácido ascórbico, atividade de mirosinases e glicosinolatos totais podem ser influenciados por características climáticas observadas anteriormente à colheita, e não apenas por características gerais da estação de cultivo.

5.8.2 Efeitos da Radiação UV-C

A aplicação da radiação UV-C levou ao aumento do teor de glicosinolatos no experimento 1 somente no tratamento com 10 kJ m^{-2} , aplicado aos brócolis com estresse hídrico. Já nos Experimentos 2 e 3, a mesma dose acarretou em diminuição de glicosinolatos, porém houve aumento de isotiocianatos. Nestes experimentos, o aumento de glicosinolatos aos 7 dias de armazenamento ocorreu quando foi aplicada a dose de 7 kJ m^{-2} de UV-C nas plantas cultivadas sob aporte hídrico regular. O tratamento com radiações ultravioleta tem sido demonstrado como um fator que aumenta os teores de glicosinolatos em brócolis (TARIQ et al., 2013; TOPCU et al., 2015; RYBARCZYK-PLONSKA et al., 2016).

Além de se observar acúmulo de glicosinolatos nos brócolis cultivados sob aporte hídrico regular tratados com 7 kJ.m^{-2} de UV-C, observou-se a diminuição da atividade de mirosinases. Nos brócolis com estresse hídrico, houve redução pela aplicação da mesma dose de UV-C, que ocorreu concomitantemente a uma atividade de mirosinases significativamente superior à encontrada nos outros tratamentos. Tratamentos pós-colheita influenciam o acúmulo de glicosinolatos ao longo do armazenamento e também em sua biodisponibilidade, uma vez que alguns podem inativar as mirosinases, fazendo com que, *in vivo*, eles sejam metabolizados a isotiocianatos apenas pela microbiota intestinal e não pelas enzimas do vegetal (BARBA et al., 2016). No tratamento com 7 kJ.m^{-2} de UV-C houve diminuição da atividade.

5.9 Isotiocianatos

5.9.1 Efeitos do Estresse Hídrico

No experimento 1 não houve diferenças nos teores de isotiocianatos entre as plantas cultivadas com e sem estresse hídrico após a colheita. Aos 7 dias de armazenamento, houve redução pelo cultivo com estresse hídrico apenas na colheita 1.

Nos experimentos 2 e 3, houve diferenças nos teores apenas anteriormente ao armazenamento, com efeitos opostos, com redução dos

teores em 2014 pelo estresse hídrico e aumento em 2015. Os isotiocianatos podem induzir o fechamento dos estômatos via produção de EROs, óxido nítrico e elevação de Ca^{2+} citosólico, para evitar perdas de água e também a invasão de fungos (KHOKON et al., 2011). Os estresses abióticos como seca e temperaturas elevadas afetam o teor de glicosinolatos possivelmente aumentando sua biossíntese, facilitando sua liberação do citoplasma para o vacúolo após a percepção do estresse pelo vegetal, ativando assim as mirosinases e a produção de isotiocianatos, que por sua vez podem regular as proteínas que realizam o transporte pela membrana celular (MARTÍNEZ-BALLESTA et al., 2013). Apesar de não se ter observado produção acentuada de isotiocianatos, o estresse hídrico levou ao acúmulo de glicosinolatos após o armazenamento nos Experimentos 2 e 3. Como será visto a seguir, a produção de isotiocianatos foi intensificada apenas no tratamento combinando estresse hídrico e 10 kJ m^{-2} de UV-C nos experimentos 2 e 3 e na segunda colheita do experimento 1, de modo que a cadeia completa de respostas metabólicas esperadas após a percepção do estresse pelo vegetal pode não ter sido ativada pelo cultivo com estresse hídrico isoladamente, aumentando apenas a biossíntese dos glicosinolatos.

5.9.2 Efeitos da Radiação UV-C

No Experimento 1, a aplicação de UV-C levou ao acúmulo de isotiocianatos durante o armazenamento somente nos brócolis cultivados com estresse hídrico, nas doses de 7 kJ m^{-2} de UV-C na colheita 1 e 10 kJ m^{-2} na colheita 2. Pode ter ocorrido que esta cadeia de respostas com relação aos glicosinolatos tenha sido intensificada, chegando à produção de isotiocianatos, apenas nas condições mais extremas de estresse aqui empregadas, como o UV-C combinado à redução do aporte hídrico.

Nos Experimentos 2 e 3, semelhantemente ao ocorrido na segunda colheita do Experimento 1, a combinação de estresse hídrico e 10 kJ m^{-2} de radiação UV-C foi o tratamento que promoveu uma liberação mais acentuada de isotiocianatos a partir dos glicosinolatos. Diferentemente do Experimento 1, onde o conteúdo de glicosinolatos encontrava-se em níveis elevados no tratamento, nos Experimentos 2 e 3 houve redução significativa de

glicosinolatos totais pela aplicação dos tratamentos combinados. Nestes experimentos, pode ter ocorrido, portanto, degradação de glicosinolatos para a produção de isotiocianatos, enquanto no Experimento 1, pode ter ocorrido uma ativação mais intensa da síntese de glicosinolatos do que de sua hidrólise a isotiocianatos. Porém, neste tratamento, outros indicativos de conservação da hortaliça, tais como pigmentos e antioxidantes, encontravam-se a níveis menores do que nos outros tratamentos após o armazenamento, possivelmente indicando uma diminuição do período de conservação.

Observando os dados obtidos neste estudo, provavelmente não é possível promover aumentos significativos de glicosinolatos e isotiocianatos ao mesmo tempo nos vegetais. Dado que os isotiocianatos não compostos que apresentam ação efetiva de defesa contra o estresse, também é provável que quando não estejam exercendo tal função sejam metabolizados a outros compostos, sendo preferível deste modo promover o acúmulo de glicosinolatos, observando conjuntamente outras variáveis indicativas da qualidade da hortaliça.

6 Conclusões

A ocorrência de estresse hídrico foi confirmada pelas análises de crescimento de brócolis e potencial osmótico após a colheita, nos experimentos colhidos no inverno. O estresse hídrico diminui o teor de ácido L-ascórbico independente da estação de cultivo, enquanto os glicosinolatos respondem diferentemente ao tratamento dependendo das características climáticas da estação. Já ângulo Hue, açúcares redutores e atividade de mirosinases apresentam respostas diferentes ao cultivo com estresse hídrico em cada colheita, mesmo que realizadas em períodos do ano com características climáticas semelhantes.

Os efeitos da aplicação de UV-C sobre os glicosinolatos também dependem da estação de cultivo. Durante os experimentos conduzidos no inverno, o acúmulo durante o armazenamento pela aplicação de 7 kJ.m^{-2} de UV-C ocorre concomitantemente a uma menor atividade de mirosinases. No verão, se observa o acúmulo quando os brócolis cultivados sob estresse

hídrico são tratados com 10 kJ.m⁻² de UV-C, porém se observa também diminuição de clorofilas, carotenoides e ácido ascórbico no tratamento, o que indica um menor período de conservação pós-colheita e perda da qualidade funcional da hortaliça.

O acúmulo de pigmentos é intensificado quando a colheita é realizada no verão. Além das características gerais da estação de cultivo, o acúmulo de glicosinolatos, açúcares redutores, ácido ascórbico, pH e atividade de mirosinases parecem estar relacionados às condições ambientais observadas no período próximo à colheita, tais como insolação e radiação total, devido à variação de valores que se observaram entre os experimentos.

Referências

ACOSTA-MOTOS, J. R.; ORTUÑO, M. F.; BERNAL-VICENTE, A.; DIAZ-VIVANCOS, P.; SANCHEZ-BLANCO, M. J.; HERNANDEZ, J. A. Plant responses to salt stress: adaptivemechanisms. **Agronomy Journal**, v. 7, n. 18, p. 38, 2017.

ALLENDE, A.; ARTÉS, F. UV-C radiation as a novel technique for keeping quality of fresh processed 'Lollo Rosso' lettuce. **Food Research International**, v. 36, n. 7, p. 739-746, 2003.

AIRES, A.; FERNANDES, C.; CARVALHO, R.; BENNETT, R. N.; SAAVEDRA, M. J.; ROSA, E. A. S. Seasonal effects on bioactive compounds and antioxidant capacity of six economically important Brassica vegetables. **Molecules**, v. 16, p. 6816-6832, 2011.

ARES, A. M.; BERNAL, J.; NOZAL, M. J.; TURNER, C.; PLAZA, M. Fast determination of intact glucosinolates in broccoli leaf by pressurized liquid extraction and ultra high performance liquid chromatography coupled to quadrupole time-of-flight mass spectrometry. **Food Research International**, v. 76, p. 498-505, 2015.

ATHAR, H. R.; KHAN, A.; ASHRAF, M. Exogenously applied ascorbic acid alleviates salt-induced oxidative stress in wheat. **Environmental and Experimental Botany**, v. 63, p. 224-231, 2008.

AYAS, S.; ORTA, H.; YAZGAN, S. Deficit irrigation effects on broccoli (*Brassica oleracea* L. var. Monet) yield in unheated greenhouse condition. **Bulgarian Journal of Agricultural Science**, v. 17, n. 4, p. 551-559, 2011.

BADAL, E.; EL-MAGEED, A.; BUESA, I.; GUERRA, D.; BONET, L.; INTRIGLILOLO, D. S. Moderate plant water stress reduces fruit drop of "RojoBrillante" persimmon (*Diospyros kaki*) in a Mediterranean climate. **Agricultural Water Management**, v. 119, p. 154-160, 2013.

BÁNHEGYI, G.; LOEWUS, F. A. Ascorbic acid catabolism: breakdown pathways in animals and plants. In: ASAD, H.; MAY, J. M.; SMIRNOFF, N. (Eds). **Vitamin C: Its functions and biochemistry in animals and plants**. London: BIOS Scientific Publishers, 2004.

BARBA, F. J.; NIKMARAM, N.; ROOHINEJAD, S.; KHELFA, A.; ZHU, Z.; KOUBAA, M. Bioavailability of glucosinolates and their breakdown products: impact of processing. **Frontiers in Nutrition**, v. 3, n. 24, 2016.
BINTSIS, T.; TZANETAKI, E. L.; ROBINSON, R. K. Existing and potential applications of ultraviolet light in the food industry – a critical review. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, n. 6, p. 637-645, 2000.

BINTSIS, T.; TZANETAKI, E. L.; ROBINSON, R. K. Existing and potential applications of ultraviolet light in the food industry – a critical review. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, n. 6, p. 637-645, 2000.

BIRMPA, A.; SFIKA, V.; VANTARAKIS, A. Ultraviolet light and ultrasound as non-thermal treatments for the inactivation of microorganisms in fresh ready-to-eat foods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 167, n. 1, p. 96-102, 2013.

BLACKMAN, B. K. Changing responses to changing seasons: natural variation in the plasticity of flowering time. **Plant Physiology**, v. 173, p. 16-26, 2017.

BOARETTO, L. F.; CARVALHO, G.; BORGIO, L. CRESTE, S.; LANDELL, M. G. A.; MAZZAFERA, P.; AZEVEDO, R. A. Water stress reveals differential antioxidant responses of tolerant and non-tolerant sugarcane genotypes. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 74, p. 165-175, 2014.

BRADFORD, M. M. A Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-354, 1976.

BÜCHERT, A. M.; CIVELLO, P. M.; MARTÍNEZ, G. A. Effect of hot air, UV-C, white light and modified atmosphere treatments on expression of chlorophyll degrading genes in postharvest broccoli (*Brassica oleracea*L.) florets. **Scientia Horticulturae**, v. 127, n. 3, p. 214-219, 2011.

BÜCHERT, A. M.; LOBATO, M. E. G.; VILLAREAL, N. M.; CIVELLO, P. M., MARTÍNEZ, G. A. Effect of visible treatments on postharvest senescence of broccoli (*Brassica oleracea*L.). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 91, n. 2, p. 335-361, 2011.

BUDNOWSKI, J.; HANSCHEN, F.; LEHMANN, C.; HAACK, M.; BRIGELIUS-FLOHÉ, R.; KROH, L. W.; BLAUT, M.; ROHN, S.; HANSKE, L. A derivatization method for the simultaneous detection of glucosinolates and isothiocyanates in biological samples. **Analytical Biochemistry**, v. 441, p. 199-207, 2013.

CAZZONELLI, C. I. Carotenoids in nature: insights from plants and beyond. **Functional Plant Biology**, v. 38, n. 11, p. 833-847, 2011.

CLARKE, J. D.; HSU, A.; RIEDL, K.; BELLA, D.; SCHWARTZ, S. J.; STEVENS, J. F.; HO, E. Bioavailability and inter-conversion of sulforaphane and erucin in human subjects consuming broccoli sprouts or broccoli supplement in a cross-over study design. **Pharmacological Research**, v. 64, p. 456-463, 2011.

CHEN, Q. X.; ZHANG, Z.; ZHOU, X. W.; ZHUANG, Z. L. Kinetics of inhibition of β -glucosidase from *Ampullarium crossean* by bromoacetic acid. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, 2000, v. 32, p. 717-723, 2000.

CHOI, M. M. F.; SHUANG, S.; LAI, H. Y.; CHENG, S. C.; CHENG, C. W.; CHEUNG, B. K. B.; LEE, A. W. M. Gas chromatography-mass spectrometric determination of total isothiocyanates in Chinese medicinal herbs. **Analytica Chimica Acta**, v.516, p. 155-163, 2004.

CLARKE, J. D.; HSU, A.; RIEDL, K.; BELLA, D.; SCHWARTZ, S. J.; STEVENS, J. F.; HO, E. Bioavailability and inter-conversion of sulforaphane and erucin in human subjects consuming broccoli sprouts or broccoli supplement in a cross-over study design. **Pharmacological research**, v. 64, n. 5, p. 456-463, 2011.

COGO, S. L. P.; CHAVES, F. C.; SCHIRMER, M. A.; ZAMBIAZI, R. C.; NORA, L.; SILVA, J. A.; ROMBALDI, C. V. Low soil water content during growth contributes to preservation of green colour and bioactive compounds of cold-

stored broccoli (*Brassica oleraceae* L.) florets. **Postharvest Biology and Technology**, v. 60, p. 158-163, 2011.

COSTA, L.; VICENTE, A. R.; CIVELLO, P. M.; CHAVES, A. R.; MARTÍNEZ, G. A. UV-C treatment delays postharvest senescence in broccoli florets. **Postharvest Biology and Technology**, v. 39, p. 204-210, 2006.

DAVEY, M. W.; MONTAGU, M. V.; INZÉ, D.; SANMARTIN, M.; KANELIS, A.; SMIRNOFF, N.; BENZIE, I. J. J.; STRAIN, J. J.; FAVELL, D.; FLETCHER, J. Plant L-ascorbic acid: chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.80, n. 7, p. 825-860, 2000.

DEL RÍO, L. A.; CORPAS, F. J.; SANDALIO, L. M.; PALMA, J. M.; GÓMEZ, M.; BARROSO, J. B. Reactive oxygen species, antioxidant systems and nitric oxide in peroxisomes. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, n. 372, 1255-1272, 2002.

DOMINGUEZ-PERLES, R.; MARTINEZ-BALLESTA, M. C.; RIQUELME, F.; CARVAJAL, M.; GARCIA-VIGUERA, C.; MORENO, D.A., Novel varieties of broccoli for optimal bioactive componentes under saline stress. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 91, p. 1638-1647, 2011.

EASON, J. R.; RYAN, D.; PAGE, B.; WATSON, L.; COUPE, S. A. Harvested broccoli (*Brassica oleracea*) responds to high carbon dioxide and low oxygen atmosphere by inducing stress-response genes. **Postharvest Biology and Technology**, v. 43, p. 358-365, 2007.

ELLIOT, J.; DERYNG, D.; MÜLLER, C., et al. Constraints and potentials of future irrigation water availability on agricultural production under climate change. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 9, p. 3239-3244, 2014.

EVANS, J.R. Improving photosynthesis. **Plant Physiology**, v. 162, p. 1780-1793, 2013.

FALGUERA, V.; PAGÁN, J.; GARZA, S.; GARVÍN, A.; IBARZ, A. Inactivation of polyphenol oxidase by ultraviolet irradiation: Protective effect of melanins. **Journal of Food Engineering**, v. 110, n. 2, p. 305-309, 2012.

FERREIRA, S.; SOUZA, R. J.; GOMES, L. A. A. Produtividade de brócolis de verão com diferentes doses de bokashi. **Revista Agrogeoambiental**, v.5, n. 2, p. 31-38, 2013.

FREITAS, A.; MOLDAO-MARTINS, M.; COSTA, H. S.; ALBUQUERQUE, T. G.; VALENTE, A.; SANCHES-SILVA, A. Effect of UV-C radiation on bioactive compounds of pineapple (*Ananas comosus* L. Merr.) by-products. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 95, n. 1, p. 44-49, 2015.

FRYDENVANG, J.; MAARSCHALKERWEERD, M.; CARSTENSEN, A.; MUNDUS, S.; SCHMIDT, S. B.; PEDAS, P. R.; LAURSEN, K. H.; SCHJOERRING, J. K.; HUSTED, S. Sensitive detection of Phosphorus deficiency in plants using chlorophyll a fluorescence. **Plant Physiology**, v. 169, p. 353-361, 2015.

GAPPER, N. E.; COUPE, S. A.; MCKENZIE, M. J.; SINCLAIR, B. K.; LILL, R. E.; JAMESON, P. E. Regulation of harvest-induced senescence in broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) by cytokinin, ethylene, and sucrose. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 24, p. 153-165, 2005.

GARTIA, S.; PRADHAN, M. K.; JOSHI, P. N.; BISWAL, U. C.; BISWAL, B. UV-A irradiation guards the photosynthetic apparatus against UV-B-induced damage. **Photosynthetica**, v. 41, n. 4, p. 545-549, 2003.

GHAWI, S. K.; METHVEN, L.; NIRANJAN, K. The potential to intensify sulforaphane formation in cooked broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) using mustard seeds (*Sinapis alba*). **Food Chemistry**, v. 138, p. 1734-1741, 2013.

GOMEZ-LOBATO, M. E.; CIVELLO, P. M.; MARTÍNEZ, G. A. Expression of a lipoxygenase encoding gene (*BoLOX1*) during postharvest senescence of broccoli. **Postharvest Biology and Technology**, v. 64, p. 146-153, 2012.

GROSS, S. M.; MARTIN, J. A.; SIMPSON, J.; ABRAHAM-JUAREZ, M. J.; WANG, Z.; VISEL, A. *De novo* transcriptome assembly of drought tolerant CAM plants, *Agave deserti* and *Agave tequilana*. **BMC Genomics**, v. 14, n. 563, 2013.

GRUB, C. D.; ABEL, S. Glucosinolate metabolism and its control. **Trends in Plant Science**, v. 11, n. 2, p. 89-100, 2006.

- GUO, Q.; GUO, L.; WANG, Z.; ZHUANG, Y.; GU, Z. Response surface optimization and identification of isothiocyanates produced from broccoli sprouts. **Food Chemistry**, v. 141, p. 1580-1586, 2013.
- HANSCHEN, F. S.; ROHN, S.; MEWIS, I.; SCHREINER, M.; KROH, L. W. Influence of the chemical structure on the thermal degradation of the glucosinolates in broccoli sprouts. **Food Chemistry**, v. 130, p. 1-8, 2012.
- HANSCHEN, F. S.; LAMY, E.; SCHREINER, M.; ROHN, S. Reactivity and stability of glucosinolates and their breakdown products in foods. **Angewandte Chemie**, p. 11430-11450, 2014.
- HARA, M.; ETO, H.; KUBOI, T. Tissue printing for myrosinase activity in roots of turnip and Japanese radish and horseradish: a technique for localizing myrosinases. **Plant Science**, v. 160, p. 425-431, 2001.
- HASPERUÉ, J. H.; CHAVES, A. R.; MARTÍNEZ, G. A. End of day harvest delays postharvest senescence of broccoli florets. **Postharvest Biology and Technology**, v. 59, n. 1, p. 64-70, 2011.
- HERNÁNDEZ-HIERRO, J.; VALVERDE, J.; VILLACRECES, J.; REILLY, K.; GAFFNEY, M.; GONZÁLEZ-MIRET, M. L.; HEREDIA, F. J.; DOWNEY, G. Feasibility study on the use of visible-near-infrared spectroscopy for the screening of individual and total glucosinolate contents in broccoli. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 7352-7358, 2012.
- HERNÁNDEZ-HIERRO, J.; ESQUERRE, C.; VALVERDE, J.; VILLACRECES, S. REILLY, K.; GAFFNEY, M.; GONZÁLEZ-MIRET, M. L.; HEREDIA, F. J.; O'DONNELL, C. P.; DOWNEY, G. Preliminary study on the use of near infrared hyperspectral imaging for quantitation and localization of total glucosinolates in freeze-dried broccoli. **Journal of Food Engineering**, v. 126, p. 107-112, 2014.
- HERZALLAH, S.; HOLLEY, R. Determination of sinigrin, sinalbin, allyl- and benzyl isothiocyanates by RP-HPLC in mustard powder extracts. **LWT – Food Science and Technology**, v. 47, p. 293-299, 2012.
- HOSSAIN, A. H. Z. Carotenoid Biosynthesis and Regulation in Plants. AOCs Lipid Library Website. Disponível em: <<http://lipidlibrary.aocs.org/Biochemistry/content.cfm?ItemNumber=40302>>. Acesso: 15 jun. 2017.

- HUANG, W. Y.; CAI, Y. Z.; ZHANG, Y. Natural phenolic compounds from medicinal herbs and dietary plants: Potential use for cancer prevention. **Nutrition and Cancer**, v. 62, n. 1, p. 1-20, 2009.
- JAHANGIR, M.; ABDEL-FARID, I. B.; KIM, H. K.; CHOI, Y. H.; VERPOORTE, R. Healthy and unhealthy plants: The effect of stress on the metabolism of Brassicaceae. **Environmental and Experimental Botany**, v. 67, p. 23-33, 2009.
- JIA, C. G.; XU, C. J.; WEI, J.; YUAN, J.; WANG, B. L.; WANG, Q.M. Effect of modified atmosphere packaging on visual quality and glucosinolates of broccoli florets. **Food Chemistry**, v. 114, n. 1, p. 28-37, 2009.
- JIN, P.; YAO, D.; XU, F.; WANG, H.; ZHENG, Y. Effect of light on quality and bioactive compounds in postharvest broccoli florets. **Food Chemistry**, v. 172, p. 705-709, 2015.
- JOHANSEN, T. J.; MØLMANN, J. A. B.; BENGTSSON, G.B.; SCHREINER, M.; VELASCO, P.; HYKKERUD, A. L.; CARTEA, E.; LEA, P.; SKARET, J.; SELJASENA, R. Temperature and light conditions at different latitudes affect sensory quality of broccoli florets (*Brassica oleracea* L. var. *italica*). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 97, p. 3500-3508, 2017.
- JONES, R. B.; FRISINA, C. L.; WINKLER, S.; IMSIC, M.; TOMKINS, R. B. Cooking method significantly effects glucosinolate content and sulforaphane production in broccoli florets. **Food Chemistry**, v. 123, n. 2, p. 237-242, 2010.
- KAR, R. K. Plant responses to water stress. **Plant signaling & Behavior**, v. 6, n. 11, p. 1741-1745, 2011.
- KHAN, T. A.; MAZID, M.; MOHAMMAD, F. A review of ascorbic acid potentialities against oxidative stress induced in plants. **Journal of Agrobiology**, v. 28, n. 2, p. 97-111, 2011.
- KHAN, M. A. M.; ULRICHS, C.; MEWIS, I. Effect of water stress and aphid herbivory on flavonoids in broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica* Plenck). **Journal of Applied Botany and Food Quality**, v. 84, p. 178-182, 2011.
- KHOKON, A. R.; JAHAN, S.; RAHMAN, T.; HOSSAIN, M. A.; MUROYAMA, D.; MINAMI, I.; MUNEMASA, S.; MORI, I. C.; NAKAMURA, Y.; MURATA, Y. Allyl

isothiocyanate (AITC) induces stomatal closure in Arabidopsis. **Plant Cell and Environment**, v. 34, p. 1900-1906, 2011.

KLEINWÄCHTER, M.; SELMAR, D. A novel approach for reliable activity determination of ascorbic acid depending myrosinases. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 59, p. 253–265, 2004.

KU, K.M.; KIM, J.; JEFFERY, E. H.; KANG, Y.K.; JUVIK, J. A. Profiles of glucosinolates, their hydrolysis products and quinone reductase inducing activity from 39 Arugula (*Eruca sativa* Mill.) accessions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, p. 6524-6532, 2016.

KU, V.V.V.; WILLS, R.B.H. Effect of 1-methylcyclopropene on the storage life of broccoli. **Postharvest Biology and Technology**, v. 17, p. 127-132, 1999.

LATTÉ, K. P.; APPEL, K. E.; LAMPEN, A. Health benefits and possible risks of broccoli – An overview. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, p. 3287-3309, 2011.

LEE, S. K.; KADER, A. A. Preharvest and postharvest factors influencing vitamin C content of horticultural crops. **Postharvest Biology and Technology**, v. 20, p. 207-220, 2000.

LEMOINE, M. L.; CIVELLO, P. M.; CHAVES, A. R.; MARTÍNEZ, G. A. Effect of combined treatment with hot air and UV-C on senescence and quality parameters of minimally processed broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*). **Postharvest Biology and Technology**, v. 48, p. 15-21, 2008.

LEVYA, R.; CONSTÁN-AGUILAR, C.; BLASCO, B.; SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ, E.; ROMERO, L.; SORIANO, T.; RUÍZ, J. M. Effects of climatic control on tomato yield and nutritional quality in Mediterranean screenhouse. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 94, n. 1, p. 63-70, 2014.

LI, L.; LV, F.; GUO, Y.; WANG, Z. Respiratory pathway metabolism and energy associated with senescence in postharvest Broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) florets in response to O₂/CO₂ controlled atmospheres. **Postharvest Biology and Technology**, v. 111, p. 330-336, 2016.

LIESE, A.; ROMEIS, T. Biochemical regulation of in vivo function of plant calcium-dependent protein kinases (CDPK). **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular Cell Research**, v. 1833, n. 7, p. 1582-1589, 2013.

- LINDEMANN-ZUTZ, K.; FRICKE, A. Prediction of time to harvest and its variability of broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) part II. Growth model description, parameterization and field evaluation. **Scientia Horticulturae**, v. 200, p. 151–160, 2016.
- LIU, C.; JAHANGIR, M. M.; YING, T. Alleviation of chilling injury in postharvest tomato fruit by preconditioning with ultraviolet irradiation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 92, n. 15, p. 3016-3022, 2012.
- LIU, S., et al. The *Brassica oleracea* genome reveals the asymmetrical evolution of polyploid genomes. **Nature communications**, v. 5, p. 11, 2014.
- LÓPEZ-BERENGUER, M.; MARTÍNEZ-BALLESTRA, C.; GARCÍA-VIGUERA, C.; CARVAJAL, M. Leaf water balance mediated by aquaporins under salt stress and associated glucosinolate synthesis in broccoli. **Plant Science**, v. 174, n. 3, p. 321-328, 2008.
- LUNA, M.; TUDELA, J.; MARTÍNEZ-SÁNCHEZ, A.; ALLENDE, A.; MARÍN, A.; GIL, M. I. Long-term deficit and excess of irrigation influences quality and browning related enzymes and phenolic metabolism of fresh-cut iceberg lettuce (*Lactuca sativa* L.). **Postharvest Biology and Technology**, v. 73, p. 37-45, 2012.
- MAHN, A.; REYES, A. An overview of health-promoting compounds of broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) and the effect of processing. **Food Science and Technology International**, v. 18, n. 6, p. 503-514, 2012.
- MARTÍNEZ-BALLESTA, M. C.; MORENO, D. A.; CARVAJAL, M. The physiological importance of glucosinolates on plant response to abiotic stress in *Brassica*. **International Journal of the Molecular Sciences**, v.14, p.11607-11625, 2013.
- MARTÍNEZ-HERNÁNDEZ, G. B.; GÓMEZ, P. A.; PRADAS, I.; ARTÉS, F.; ARTÉS-HERNÁNDEZ, F. Moderate UV-C pretreatment as a quality enhancement tool in fresh-cut Bimi® broccoli. **Postharvest Biology and Technology**, v. 62, n. 3, p. 327-337, 2011.
- MATERA, R.; GABBANINI, S.; NICOLA, G. R.; IORI, R. PETRILLO, G.; VALGIMIGLI, L. Identification and analysis of isothiocyanates and new acylated

anthocyanins in the juice of *Raphanus sativus* cv. Sango sprouts. **Food Chemistry**, v. 133, p. 563-572, 2012.

MEWIS, I.; SCHREINER, M.; NGUYEN, C. N.; KRUMBEIN, A.; ULRICHS, C.; LOHSE, M.; ZRENNER, R. UV-B irradiation changes specifically the secondary metabolite profile in broccoli sprouts: induced signaling overlaps with defense response to biotic stressors. **Plant Cell Physiology**, v. 53, n. 9, p. 1546-1560, 2012.

MIAO, H.; WEI, J.; ZHAO, Y.; YAN, H.; SUN, B.; HUANG, J.; WANG, Q. Glucose signaling positively regulates aliphatic glucosinolate biosynthesis. **Journal of Experimental Botany**, v. 64, n. 4, p. 1097-1109, 2013.

MIKKELSEN, M. D.; PETERSEN, B. L.; GLAWISCHNIG, E.; JENSEN, A. B.; ANDREASSON, E.; HALKIER, B. A. Modulation of CYP79 genes and glucosinolate profiles in *Arabidopsis* by defense signaling pathways. **Plant Physiology**, v. 131, p. 298-308, 2003.

MISHRA, Y.; JÄNKÄNPÄÄV, H. J.; KISS, A. Z.; FUNK, C.; SCHRÖDER, W. P.; JANSSON, S. Arabidopsis plants grown in the field and climate chambers significantly differ in leaf morphology and photosystem components. **BMC Plant Biology**, 12:6, 2012.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, v. 7, n. 9, p. 405-410, 2002.

MORANT, A. V.; JØRGENSEN, K.; JØRGENSEN, C.; PAQUETTE, S. M.; SÁNCHEZ-PÉREZ, R.; MØLLER, B. L.; BAK, S. β -Glucosidases as detonators of plant chemical defense. **Phytochemistry**, v. 69, n. 9, p. 1795-1813, 2008.

MORREY, J. D.; BOURN, S. M.; BUNCH, T. D.; JACKSON, M. K.; SIDWELL, R. W.; BARROWS, L. R.; DAYNES, R. A.; ROSEN, C. A. In vivo activation of human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat by UV type A (UV-A) light plus psoralen and UV-B light in the skin of transgenic mice. **Journal of Virology**, v. 65, n. 9, p. 5045-5051, 1991.

MØLMANN, J. A. B.; STEINDAL, A. L. H.; BENGTSSON, G. B.; SELJÅSEN, R.; LEA, P.; SKARET, J.; JOHANSEN, T. J. Effects of temperature and photoperiod on sensory quality and contents of glucosinolates, flavonols and vitamin C in broccoli florets. **Food Chemistry**, v. 172, p. 47-55, 2015.

OHTSURU, M.; HATA, T. The interaction of L-ascorbic acid with the active center of myrosinase. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 567, p. 384-391, 1979.

OMIROU, M.; KARPOUZAS, D. G.; PAPADOPOULOU, K. K.; EHALIOTIS, C. Dissipation of purê and broccoli-released glucosinolates in soil under high and low moisture content. **European Journal of Soil Biology**, v. 56, p. 49-55, 2013.

PATRAS, A.; TIWARI, B. K.; BRUNTON, N. P. Influence of blanching and low temperature preservation strategies on antioxidant activity and phytochemical content of carrots, green beans and broccoli. **LWT – Food Science and Technology**, v. 44, p. 299-306, 2011.

PORRA, R. J.; THOMPSON, W. A.; KRIEDEMANN, P. E. Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 975, p. 384-394, 1989.

QUIRÓS, A. R. B.; FERNÁNDEZ-ARIAS, M.; LÓPEZ-HERNÁNDEZ, J. A. A screening method for the determination of ascorbic acid in fruit juices and soft drinks. **Food Chemistry**, v. 116, p. 509-512, 2009.

RAMEL, F.; BIRTIC, S.; CUINÉ, S.; TRIANTAPHYLIDÈS, C.; RAVANAT, J. L.; HAVAUX, M. Chemical quenching of singlet oxygen by carotenoids in plants. **Plant Physiology**, v. 158, n. 3, p. 1267-1278, 2012.

RAMOS, S.; YUAN, Y. X.; FAQUIN, V.; GUILHERME, L. R. G.; LI, L. Evaluation of genotypic variation of broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*) in response to selenium treatment. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 3657-3665, 2011.

RAORANE, M. L.; MUTTE, S. K.; VARADARAJAN, A. R.; PABUAYON, I. M.; KOHLI, A. Protein SUMOylation and plant abiotic stress signaling: in silico case study of rice RLKs, heat-shock and Ca⁺² – binding proteins. **Plant Cell Reports**, v. 32, n. 7, p. 1053-1065, 2013.

RASEETHA, S.; LEONG, S. Y.; BURRITT, D. J.; OEY, I. Understanding the degradation of ascorbic acid and glutathione in relation to the levels of oxidative stress biomarkers in broccoli (*Brassica oleracea* L. *italica* cv. Bellstar) during storage and mechanical processing. **Food Chemistry**, v. 138, n. 2-3, p. 1360-1369, 2013.

REDDY, A. R.; CHAITANYA, K. V.; VIVEKANANDAN, M. Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. **Journal of Plant Physiology**, v. 161, n. 11, p. 1189-1202, 2004.

REN, J.; DAI, W.; XUAN, Z.; YAO, Y.; KORPELAINEN, H.; LI, C. The effect of drought and enhanced UV-B radiation on the growth and physiological traits of two contrasting poplar species. **Forest Ecology and Management**, v. 239, p. 112-119, 2007.

RIZHSKY, L.; LIANG, H.; SHUMAN, J.; SHULAEV, V.; DAVLETOVA, S.; MITTLER, R. When defense pathways collide. The response of Arabidopsis to a combination of drought and heat stress. **Plant Physiology**, v. 134, p. 1683-1696, 2004.

ROBBINS, R. J.; KECK, A. S.; BANUELOS, G.; FINLEY, J. W. Cultivation conditions and Selenium fertilization alter the phenolic profile, glucosinolate and sulforaphane content of Broccoli. **Journal of Medicinal Food**, v. 8, n. 2, p. 204-214, 2005.

ROSENZWEIG, C. et al. Assessing agricultural risks of climate change in the 21st century in a global gridded crop model intercomparison. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America – PNAS**, v. 111, n. 9, p. 3628-3273, 2014.

ROSSETO, M. R. M.; SHIGA, T. M.; VIANELLO, F.; LIMA, G. P. P. Analysis of total glucosinolates and chromatographically purified benzylglucosinolate in organic and conventional vegetables. **LWT – Food Science and Technology**, v. 50, p. 247-252, 2013.

RUBAN, A. V.; BERERA, R.; ILIOAIA, C.; STOKKUM, I. H. M.; KENNIS, J. T. M.; PASCAL, A. A.; AMERONGEN, H.; ROBERT, B.; HORTON, P.; GRONDELLE, R. Identification of a mechanism of photoprotective energy dissipation in higher plants. **Nature**, v. 450, p. 575-578, 2007.

RYBARCZYK-PLONSKA, A.; HAGEN, S. F.; BORGE, G. I. A.; BENGTSSON, G. B.; HANSENA, M. K.; WOLDA, A-B. Glucosinolates in broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*) as affected by postharvest temperature and radiation treatments. **Postharvest Biology and Technology**, v. 116, p. 16–25, 2016.

SCHULER, M. P450s in plant-insect interactions. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1814, n. 1, p. 36-45, 2011.

SCHULZ, P.; HERDE, M.; ROMEIS, T. Calcium-dependent protein kinases: Hubs in plant stress signaling and development. **Plant Physiology**, v. 163, n. 2, p. 523-530, 2013.

SEKI, K. SWRC fit - a nonlinear fitting program with a water retention curve for soils having unimodal and bimodal pore structure. *Hydrol. Earth Syst. Sci. Discuss.*, 4, 2007, 407-437. Software disponível em: <<http://seki.webmasters.gr.jp/swrc/>> Acesso em 6 fev. 2015.

SHAH, K.; SINGH, M.; RAI, A. C. Bioactive compounds of tomato fruits from transgenic plants tolerant to drought. **LWT – Food Science and Technology**, v. 61, n. 2, p. 609-614, 2015.

SMIRNOFF, N. Ascorbic acid: metabolism and functions of a multi-faceted molecule. **Current Opinion in Plant Biology**, v.3, n. 3, p. 229-235, 2000.

SOMERS, C. H.; SITES, J. E.; MUSGROVE, M. Ultraviolet light (254 nm) inactivation of pathogens on foods and stainless steel surfaces. **Journal of Food Safety**, v. 30, p. 470-479, 2010.

SONG, L.; MORRISON, J. J.; BOTTING, N. P.; THORNALLEY, P. J. Analysis of glucosinolates, isothiocyanates and amine degradation products in vegetable extracts and blood plasma by LC-MS/MS. **Analytical Biochemistry**, v. 347, n. 2, p. 234-243, 2005.

SUDHA, G.; RAVISHANKAR, G. A. Involvement and interaction of various signaling compounds on the plant metabolic events during defense response, resistance to stress factors, formation of secondary metabolites and their molecular aspects. **Plant Cell, Tissue, and Organ Culture**, v. 71, p. 181-212, 2002.

TANGUNE, B. F. Produção de brócolis irrigado por gotejamento, sob diferentes tensões de água no solo. 73p. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Manejo de Irrigação e Drenagem), Universidade Federal de Lavras, Lavras – MG, 2012.

TANGUNE, B. F.; PEREIRA, G. M.; SOUSA, R. J. Response of broccoli to soil water tension under drip irrigation. **Semina Ciências Agrárias**, v. 37, p. 7-16, 2016.

TANTIKANJANA, T.; MIKKELSEN, M. D.; HUSSAIN, M.; HALKIER, B. A.; SUNDARESAN, V. Functional analysis of the tandem-duplicated P450 genes SPS/BUS/CYP79F1 and CYP79F2 in glucosinolate biosynthesis and plant development by Ds transposition-generated double mutants. **Plant Physiology**, v. 135, p. 840-848, 2004.

TARIQ, M.; ROSSITER, J. T.; WRIGHT, D. J.; STALEY, J. T. Drought alters interactions between root and foliar herbivores. **Oecologia**, v. 172, p. 1095-1104, 2013.

TERRY, M. J.; KENDRICK, R. E. Feedback inhibition of chlorophyll synthesis in the phytochrome chromophore-deficient aurea and yellow-green-2 mutants of tomato. **Plant Physiology**, v. 119, p. 143-152, 1999.

TOPCU, Y.; DOGAN, A.; KASIMOGLU, Z.; SAHIN-NADEEM, H.; POLAT, E.; ERKAN, M. The effects of UV radiation during the vegetative period on antioxidant compounds and postharvest quality of broccoli (*Brassica oleracea* L.). **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 93, p. 56-65, 2015.

UNEP, United Nations Environment Programme. 2003. Environmental Effects of Ozone Depletion and its interactions with climate change: 2002 assessment. UNEP e U.S. Global Change Research Information Office. 181p. Disponível em: <www.gcric.org/ordering/>. Acesso em 13 jun. 2015.

UNLUTURK, S.; ATILGAN, M. R. Microbial safety and shelf life of UV-C treated freshly squeezed white grape juice. **Journal of Food Science**, v. 80, n. 8, p. 1831-1841, 2015.

VALLEJO, F.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A.; BENAVENTE-GARCÍA, A. G.; GARCÍA-FIGUERA, C. Total and individual glucosinolate contents in inflorescences of eight broccoli cultivars grown under various climatic and fertilization conditions. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 83, p. 307-313, 2003.

VAN EYLEN, D.; BELLOSTAS, N.; STROBEL, B.W.; OEY, I.; HENDRICKX, M.; VAN LOEY, A.; SØRENSEN, H.; SØRENSEN, J.C. Influence of pressure/temperature treatments on glucosinolate conversion in broccoli

(*Brassica oleraceae* L. cv Italica) heads. **Food Chemistry**, v. 112, p. 646-653, 2009.

VRANOVÁ, E.; INZÉ, D.; BREUSEGEM, F. V. Signal transduction oxidative stress. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, n. 372, p. 1227-1236, 2002.

WALTER, L. C.; ROSA, H. T.; STRECK, N. A. Mecanismos de aclimatação das plantas à elevada concentração de CO₂. **Ciência Rural**, v. 45, n. 9, p. 1564-1571, 2015.

WANG, M.; LI, D.; SUN, X.; ZHU, Y. J.; NONG, H.; ZHANG, J. Characterization of a root-specific b-thioglucosideglucohydrolase gene in *Carica papaya* and its recombinant protein expressed in *Pichia pastoris*. **Plant Science**, v. 177, p. 716–723, 2009.

WARDLE, D. A. Ecology: Drivers of decoupling in drylands. **Nature**, v. 502, p. 628-629, 2013.

WILKINSON, S. PH as a stress signal. **Plant Growth Regulation**, v. 29, n. 1-2, p. 87-99, 1999.

WURR, D. C. E.; HAMBIDGE, A. J.; FELLOWS, J. R., LYNN, J. R.; PINK, D. A. C. The influence of water stress during crop growth on the postharvest quality of broccoli. **Postharvest Biology and Technology**, v. 25, p. 193-198, 2002.

XI, H.; MA, L.; LIU, G.; WANG, N.; WANG, J.; WANG, L. DAI, Z.; LI, S.; WANG, L. Transcriptomic analysis of grape (*Vitis vinifera* L.) leaves after exposure to ultraviolet C irradiation. **PLoS One**, v. 9, n. 12, e113772, 2014.

XIA, L.; YANG, W.; XIUFENG, Y. Effects of water stress on berberine, jatrorrhizine and palmatine contents in amur corktree seedlings. **Acta Ecologica Sinica**, v. 27, n. 1, p. 58-64, 2007.

YUAN, G.; SUN, B.; YUAN, J.; WANG, Q. Effect of 1-methylcyclopropene on shelf life, visual quality, antioxidant enzymes and health-promoting compounds in broccoli florets. **Food Chemistry**, v. 118, n. 3, p. 774-781, 2010.

ZAGHDOUD, C.; ALCARAZ-LÓPEZ, C.; MOTA-CADENAS, C.; MARTÍNEZ-BALLESTA, M. C.; MORENO, D. A.; FERCHICHI, A.; CARVAJAL, M. Differential responses of two broccoli (*Brassica oleracea* L. var Italica)

cultivarstosalinityandnutritionalqualityimprovement. **The Scientific World Journal**, p. 12, 2012.

ZAGROBELNY, M.; BAK, S.; RASMUSSEN, A. V.; JØRGENSEN, B.; NAUMANN, C. M.; MØLLER, B. L. Cyanogenicglucosides and plant-insect interactions. **Phytochemistry**, v. 65, p. 293-306, 2004.

ZAICOVSKI, C. B.; ZIMMERMAN, T.; NORA, L.; NORA, F. R.; SILVA, J. A.; ROMBALDI, C. V. Water stress increases cytokinin biosynthesis and delays postharvest yellowing of broccoli florets. **Postharvest Biology and Technology**, v. 49, n. 3, p. 436-439, 2008.

ZEPP, R. G.; ERICKSON, D. J.; PAUL, N. D.; SULZBERGER. Effects of solar UV radiation and climate change on biogeochemical cycling: interactions and feedbacks. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 10, p. 261-279, 2001.

ZHAN, L.; HU, J.; LI, Y.; PANG, L. Combination of light exposure and low temperature in preserving quality and extending shelf-life of fresh-cut broccoli (*Brassica oleracea* L.). **Postharvest Biology and Technology**, v.72, p. 76–81, 2012.

ZHANG, D.; HAMAUZU, Y. Phenolics, ascorbic acid, carotenoids and antioxidant activity of broccoli and their changes during conventional and microwave cooking. **Food Chemistry**, v.88, n. 4, p. 503-509, 2004.

ZHANG, Y. The 1,2-benzenedithiole-based cyclocondensation assay, a valuable tool for measurement of chemopreventive isothiocyanates. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 52, n. 6, p. 525-532, 2012.

ZHANG, W.; LIU, T.; REN, G.; HÖRTENSTEINER, S.; ZHOU, Y.; CAHOON, E. B.; ZHANG, C. Chlorophyll degradation: the tocopherol biosynthesis-related phytol hydrolase in Arabidopsis seeds is still missing. **Plant Physiology**, v. 166, p. 70-79, 2014.

ZHANG, C.; ZHANG, W.; REN, G.; LI, D.; CAHOON, R. E.; CHEN, M.; ZHOU, Y.; YU, B.; CAHOON, E. B. Chlorophyll synthase under epigenetic surveillance is critical for vitamin E synthesis and altered expression affects tocopherol levels in Arabidopsis. **Plant Physiology**, v. 168, p. 1503-1511, 2015.

ZHOU, S.; DUURSMA, R. A.; MEDLYN, B. E.; KELLY, J. W. G.; PRENTICE, I. C. How should we model plant responses to drought? An analysis of stomatal and non-stomatal responses to water stress. **Agricultural and Forest Meteorology**, n. 182-183, p. 204-214, 2013.

ZHIFANG, G.; LOESCHER, W. H. Expression of a celarymanose 6-phosphate reductase in *Arabidopsis thaliana* enhances salt tolerance and induces biosynthesis of both mannitol and a glucosyl-mannitol dimer. **Plant Cell and Environment**, v. 26, n. 2, p. 275-283, 2003.

ZHU, J. K. Cell signaling under salt, water and cold stresses. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 4, p. 401-406, 2001.

ZOBAYED, S. M. A.; AFREEN, F.; KOZAI, T. Temperature stress can alter the photosynthetic efficiency and secondary metabolite concentrations in St. John's wort. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 43, n. 10-11, p. 977-984, 2005.

Apêndices

Apêndice A - Características de brócolis cultivados sob aporte hídrico regular e estresse após a colheita dos Experimentos 1, 2 e 3

	Irrigação	Colheita 1 Experimento 1		Colheita 2 Experimento 1		Experimento 2		Experimento 3	
Cor (h°)	Regular	109,6	Bb	105,9	Ba	120,7	Aa	124,1	Ab
	Estresse	118,5	Ba	105,4	Ca	116,6	Ba	129,1	Aa
Clorofilas a (mg.kg ⁻¹)	Regular	552,49	Ba	611,30	Aa	327,2	Db	494,1	Ca
	Estresse	456,06	Ab	344,07	Bb	421,8	Aa	427,9	Ab
Clorofilas b (mg.kg ⁻¹)	Regular	166,67	Ba	192,57	Aa	81,3	Cb	164,5	Ba
	Estresse	140,01	Aa	100,87	Ab	112,7	Aa	131,9	Ab
Carotenoides (mg.kg ⁻¹)	Regular	194,83	Aa	193,76	Aa	122,0	Cb	156,8	Ba
	Estresse	160,44	Ab	116,10	Bb	167,5	Aa	153,7	Aa
pH	Regular	6,5	Ba	6,3	Ca	6,8	Aa	5,5	Db
	Estresse	6,5	Ba	6,2	Ca	6,6	Ab	5,6	Da
Açúcares redutores (mmol.kg ⁻¹) [^]	Regular	73,2	Ba	38,6	Da	254,0	Aa	55,0	Cb
	Estresse	25,6	Cb	38,1	Ca	249,0	Aa	102,0	Ba
Ácido L-ascórbico (g.kg ⁻¹)	Regular	6,8	Aa	2,9	Da	4,3	Ba	3,7	Ca
	Estresse	3,9	Ab	1,5	Cb	2,6	Bb	2,5	Bb

Mirosinases (mol .kg ⁻¹)*	Regular	56,4	Aa	21,2	Ca	35,9	Ba	20,3	Ca
	Estresse	46,4	Ab	19,6	Ba	18,1	Bb	21,3	Ba
Glicosinolatos (mmol.kg ⁻¹)	Regular	172,2	Ca	459,2	Aa	110,5	Da	245,6	Ba
	Estresse	137,9	Cb	238,6	Ab	106,3	Ca	207,2	Ba
Isotiocianatos (mmol.kg ⁻¹)	Regular	60,08	Ca	122,30	Aa	73,8	Ba	40,5	Db
	Estresse	63,47	Ba	101,30	Aa	61,5	Bb	67,0	Ba

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e pela mesma letra minúscula na coluna não diferem para cada variável pelo teste Fisher ($p \leq 0,05$).

^Açúcares Redutores expressos em equivalente a glicose; *Mirosinases - mol glicose produzida por kg de proteína