

**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**



Dissertação

**Aspectos bioquímicos e moleculares de brócolis submetidos ao aporte hídrico  
reduzido e à radiação UV-C**

**Nathalia de Avila Madruga**

**Pelotas, 2017**

**Nathalia de Avila Madruga**

**Aspectos bioquímicos e moleculares de brócolis submetidos ao aporte  
hídrico reduzido e à radiação UV-C**

Dissertação 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 Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Fábio Clasen Chaves

Co-orientador: Dr. Railson Schreinert dos Santos

Pelotas, 2017

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas  
Catalogação na Publicação

M178a Madruga, Nathalia De Avila

Aspectos bioquímicos e moleculares de brócolis submetidos ao aporte hídrico reduzido e a radiação UV-C / Nathalia De Avila Madruga ; Fábio Clasen Chaves, orientador ; Railson Schreinert dos Santos, coorientador. — Pelotas, 2017.

87 f.

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

1. Brassica oleracea L. var. Italica. 2. Seca. 3. Metabolômica. I. Chaves, Fábio Clasen, orient. II. Santos, Railson Schreinert dos, coorient. III. Título.

CDD : 635.3

**Nathalia de Avila Madruga**

**Aspectos bioquímicos e moleculares de brócolis submetidos ao aporte hídrico  
reduzido e à radiação UV-C**

Data da defesa: 30 de maio de 2017.

Banca examinadora:

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Camila Pegoraro. Doutora em Agronomia pela Universidade Federal de Pelotas.

Dr<sup>a</sup>. Helen Cristina dos Santos Hackbart. Doutora em Engenharia e Ciência de Alimentos pela Universidade Federal do Rio Grande.

Prof. Dr. Fábio Clasen Chaves. Doutor em Biologia Vegetal pela Rutgers, The State University of New Jersey.

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

Prof. Dr. Sidnei Deuner. Doutor em Fisiologia Vegetal pela Universidade Federal de Lavras.

## **Agradecimentos**

A Deus, pela vida, saúde, cuidado e por guiar meus caminhos.

Aos meus pais, Cleber e Rose Mary e minha irmã Nadyne que sempre me apoiaram em todas decisões da minha vida, com muito amor e carinho.

Ao meu esposo Geison Quevedo, pelo companheirismo, paciência, compreensão e amor. Mesmo em momentos difíceis sempre me incentivou a não desistir.

Ao meu orientador, Prof. Fabio Chaves, pela orientação, paciência, ensinamentos e por contribuir para meu crescimento profissional.

Ao Railson que desde o primeiro momento esteve disposto a nos ajudar no desenvolvimento deste trabalho. Obrigada pelo teu auxílio nas análises, pela paciência em ensinar e pelas contribuições na dissertação.

A minha amiga e colega Rosane Crizel, com quem tive o privilégio de trabalhar durante estes anos. Obrigada pelo teu companheirismo, amizade, por nunca ter medido esforços para me ajudar e pelos momentos partilhados.

A Roseane D'Avila por ter conduzido os experimentos a campo, sem você possivelmente este trabalho não existiria. Obrigada pelas diversas vezes que respondeu aos meus questionamentos, sempre com muita calma e paciência.

Aos colegas de laboratório, Bianca Camargo, Jessica Hoffmann, Giovana Zandoná, Marcela Garcia, Gabriel Dalmazo, Fabiana Nora e aos estagiários Francine Bonemann e Nathan Lobler pela amizade, apoio e por tornar nosso trabalho mais agradável.

Aos meus professores da graduação, pelos ensinamentos que contribuíram para minha formação. Especialmente a professora e amiga Rosane Rodrigues, pelos ensinamentos e incentivos.

Ao Centro de Genômica e Fitomelhoramento, por ceder o espaço e equipamentos para o desenvolvimento deste trabalho.

À Universidade Federal de Pelotas e ao Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, pela oportunidade de realização do mestrado.

A Capes pela concessão de bolsa.

Aos demais familiares e amigos que, de uma forma ou de outra, contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho. Muito obrigada a todos!

## Resumo

MADRUGA, Nathalia de Avila Madruga. **Aspectos bioquímicos e moleculares de brócolis submetidos ao aporte hídrico reduzido e à radiação UV-C.** 2017. 87f. Dissertação (Mestrado 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, Pelotas, 2017.

O brócolis (*Brassica oleracea* L. var. *Italica*) é uma planta pertencente à família Brassicaceae. Esta hortaliça é mundialmente consumida e tem se destacado não só pelo valor nutricional como também pelas propriedades antioxidantes e efeitos quimiopreventivos. Frequentemente as plantas são submetidas à condições estressoras, podendo comprometer seu metabolismo. Contudo, quando o fator estressor ocorre de forma moderada ele pode gerar alterações fisiológicas, moleculares e bioquímicas benéficas, entre elas o acúmulo de compostos derivados do metabolismo especializado. Assim, teve-se como objetivo caracterizar os efeitos isolados e combinados do aporte hídrico reduzido na pré-colheita e da radiação UV-C na pós-colheita de brócolis através da análise de parâmetros bioquímicos e moleculares. Foram avaliados o perfil de metabólitos utilizando a cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS), a atividade de enzimas antioxidantes (ascorbato peroxidases, catalase, superóxido dismutase, peroxidase e polifenoloxidase) por métodos espectrofotométricos e o acúmulo de transcritos de genes relacionados ao metabolismo de glicosinolatos através de RT-qPCR. A partir dos resultados obtidos foi possível verificar que o aporte reduzido de água e a radiação UV-C induziram respostas no perfil metabólico; glicosinolatos indólicos e flavonoides glicosídicos foram os compostos que mais contribuíram para a distinção entre os tratamentos. A atividade das enzimas APX, CAT e PPO foi maior nos tratamentos 15 kPa/7 kJ m<sup>-2</sup> e 75 kPa/10 kJ m<sup>-2</sup> e a redução no aporte hídrico inibiu a atividade da SOD e da POD, no ano de 2014. No experimento de 2015, o aporte reduzido de água não alterou a atividade da APX e inibiu a atividade das enzimas CAT e POD; já a SOD foi ativada somente pela radiação UV-C, independentemente do tipo de cultivo. Além disso, a radiação de 10 kJ m<sup>-2</sup> de UV-C influenciou no acúmulo de transcritos de genes relacionados com a biossíntese de glicosinolatos e a combinação do aporte hídrico reduzido com a radiação UV-C regulou a expressão do gene *PEN2* relacionado com a degradação de glicosinolatos.

**Palavras-Chave:** *Brassica oleracea* L. var. *Italica*; seca; metabolômica

## Abstract

MADRUGA, Nathalia de Avila Madruga. **Biochemical and molecular aspects of broccoli submitted to reduced water supply and UV-C radiation**. 2012. 87f. Dissertation (Master Degree 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, Pelotas. 2017.

Broccoli (*Brassica oleracea* L. var. Italica) is a plant belonging to the Brassicaceae family. This vegetable is consumed worldwide and has been standing out not only due to its nutritional value, but also due to its antioxidant properties and chemopreventive effects. Plants are often subjected to abiotic stressors, which can compromise their metabolism. However, moderate stresses can generate useful physiological, molecular and biochemical changes, such as the accumulation of compounds derived from specialized metabolism. Thus, the objective of this study was to characterize the isolated and combined effects of pre-harvest reduced water supply and post-harvest UV-C radiation through the analysis of biochemical and molecular parameters. Metabolite profiling of these plants was evaluated through liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS), the activity of antioxidant enzymes (ascorbate peroxidase, catalase, superoxide dismutase, peroxidase and polyphenoloxidase) through spectrophotometric methods and the transcript accumulation of genes related to glucosinolate biosynthesis through RT-qPCR. From the results obtained, it was possible to verify that reduced water supply and UV-C radiation induced responses in the metabolic profile of these plants; glucosinolates and glycosidic flavonoids were the compounds that contributed the most to the differentiated treatments. APX, CAT, and PPO enzyme activities were higher at 15 kPa/7 kJ m<sup>-2</sup> and 75 kPa/10 kJ m<sup>-2</sup> and reduced water supply inhibited SOD and POD enzyme activity in 2014. In the 2015 experiment, reduced water supply did not change APX activity and inhibited CAT and POD enzyme activity, whereas SOD was activated only by UV-C radiation, regardless of the type of culture. In addition, 10 kJ m<sup>-2</sup> UV-C radiation influenced the accumulation of gene transcripts related to glucosinolate biosynthesis and the combination of reduced water supply and UV-C radiation regulated the expression of glucosinolate degradation-related *PEN2*.

**Key words:** *Brassica oleracea* L. var. Italica; drought; metabolomics.

## Lista de Figuras

Figura 1 - Reação de dismutação do superóxido catalisada pela SOD. ....	23
Figura 2 - Reação catalisada pela CAT.....	24
Figura 3 - Reação de redução do peróxido de hidrogênio e tetramerização do guaicol catalisada pela enzima peroxidase. ....	24
Figura 4 - Flavonoides agliconas encontrados em vegetais Brassica.....	26
Figura 5 - Estrutura geral dos glicosinolatos. ....	27
Figura 6 - Esquema dos produtos de degradação dos glicosinolatos .....	29
Figura 7 – Análise do perfil de metabólitos dos brócolis do experimento de 2014 ....	40
Figura 8 - Análise do perfil de metabólitos dos brócolis do experimento de 2015.....	41
Figura 9 - Projeção de importância das variáveis (VIP scores), derivados do PLS-DA, a partir da análise do perfil de metabólitos dos brócolis tratados do experimento de 2014 .....	42
Figura 10 - Espectros de massas (MS/MS) dos 10 compostos discriminantes (derivados PLS-DA) a partir da análise do perfil de metabólitos dos brócolis tratados do experimento de 2014.....	46
Figura 11 - Projeção de importância das variáveis (VIP scores), derivados do PLS-DA, a partir da análise do perfil de metabólitos dos brócolis tratados do experimento de 2015 .....	49
Figura 12 - Espectros de massas (MS/MS) dos 13 compostos discriminantes (derivados PLS-DA) a partir da análise do perfil de metabólitos dos brócolis tratados do experimento de 2015.....	54
Figura 13 - Análise da expressão transcricional de genes da rota de síntese e degradação de glicosinolatos .....	64

## Lista de Tabelas

Tabela 1 - Oligonucleotídeos usados para análise de expressão gênica.....	39
Tabela 2 - Identificação dos metabólitos responsáveis pela diferenciação entre os tratamentos pré e pós-colheita nos brócolis cultivados no ano de 2014 .....	44
Tabela 3 – Quantificação ( $\text{mg g}^{-1}$ ) dos 10 compostos discriminantes (PLS-DA VIP>1,5) do experimento de 2014.....	47
Tabela 4 - Identificação dos metabólitos responsáveis pela diferenciação entre os tratamentos pré e pós-colheita nos brócolis cultivados no ano de 2015 .....	51
Tabela 5 - Quantificação ( $\text{mg g}^{-1}$ ) dos 13 compostos discriminantes (PLS-DA VIP>1,5) do experimento de 2015.....	57
Tabela 6 - Atividade da ascorbato peroxidase (APX), catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), peroxidase (POD) e polifenoloxidase (PPO) nos brócolis cultivados no ano de 2014 e 2015.....	60
Tabela 7 – Atividade da superóxido dismutase (SOD) em brócolis cultivado em 2015. ....	61

## Lista de abreviaturas e siglas

APX	Ascorbato peroxidase
<i>BCAT3</i>	3-aminotransferase de aminoácidos de cadeia ramificada
CAT	Catalase
<i>CYP79B2</i>	Triptofano N-mono-oxigenase 1
<i>CYP79B3</i>	Triptofano N-mono-oxigenase 2
DNA	Ácido desoxiribonucléico
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FMO <sub>GS-OX2</sub>	Flavina monooxigenase 2
<i>GSH1</i>	Glutamato-cisteína ligase
<i>GSTF10</i>	Glutathione S-transferase F10
<i>GSTF11</i>	Glutathione S-transferase F11
IAOx	Indol-3-ylacetalcoxima
IMDH1	3-isopropilmalato desidrogenase
kJ	quilojoule
kPa	quilopascal
LC-MS	Cromatografia líquida acoplada a espectrometria massas
MS/MS	Espectrometria de massa em tandem
mSigma	Similaridade entre o padrão isotópico teórico e o experimental
<i>m/z</i>	Razão massa/carga
PCA	Principal Component Analysis (Análise de componentes principais)
<i>PEN2</i>	Subunidade gama-secretase
PLS-DA	Partial Least Squares Discriminant Analysis (Análise discriminante por quadrados mínimos parciais)
POD	Peroxidase
PPO	Polifenoloxidase
RT-qPCR	Transcrição Reversa em Reação de Cadeia da Polimerase Quantitativa
SOD	Superóxido dismutase
<i>SOT17</i>	Sulfotranferase 17
<i>TGG1</i>	Mirosinase 1
<i>TGG2</i>	Mirosinase 2
TR	Tempo de retenção

UV	Ultravioleta
UV-A	Ultravioleta do tipo A
UV-B	Ultravioleta do tipo B
UV-C	Ultravioleta do tipo C
VIP	Variable Importance in Projection (Importância das variáveis de projeção)

## Sumário

1	Introdução geral.....	13
1.1	Hipótese.....	15
1.2	Objetivos.....	16
1.2.1	Objetivo geral.....	16
1.2.2	Objetivos específicos.....	16
2	Revisão bibliográfica.....	17
2.1	Brócolis.....	17
2.2	Estressores abióticos.....	18
2.3	Seca.....	19
2.4	Radiação UV-C.....	20
2.5	Espécies reativas de oxigênio (EROs).....	22
2.6	Enzimas do sistema redox.....	23
2.7	Compostos fenólicos.....	25
2.8	Glicosinolatos.....	27
2.9	Brócolis e os estresses abióticos.....	29
3	Material e métodos.....	31
3.1	Material vegetal.....	31
3.2	Aplicação de estressor na pré-colheita.....	31
3.3	Aplicação de estressor na pós-colheita.....	32
3.4	Aplicação combinada de estresses pré-colheita e pós-colheita.....	32
3.5	Perfil metabólico.....	33
3.5.1	Preparo das amostras e extração.....	33
3.5.2	Instrumentação e condições analíticas.....	33
3.5.3	Processamento de dados e análise estatística.....	34
3.6	Atividade enzimática.....	35
3.6.1	Extrato enzimático bruto.....	35
3.6.2	Ascorbato peroxidase (APX).....	35
3.6.3	Catalase (CAT).....	35
3.6.4	Superóxido dismutase (SOD).....	36
3.6.5	Peroxidase (POD).....	36
3.6.6	Polifenoloxidase (PPO).....	36

3.6.7	Determinação de proteínas.....	36
3.7	Expressão gênica .....	37
3.7.1	Meta-análise da expressão transcricional de genes da rota de síntese e degradação de glicosinolatos em arabidopsis sob estresse .....	37
3.7.2	Extração de RNA total e síntese de cDNA.....	38
3.7.3	Análise de expressão gênica por RT-qPCR .....	39
4	Resultados e discussão .....	40
4.1	Perfil metabólico .....	40
4.2	Componentes chave .....	42
4.2.1	Experimento de 2014.....	42
4.2.2	Experimento de 2015.....	49
4.3	Atividade enzimática .....	58
4.4	Expressão gênica .....	61
5	Considerações finais .....	67
	Referências .....	68
	Anexos .....	86

## 1 Introdução geral

O brócolis (*Brassica oleracea* L. var. *Italica*) é uma planta pertencente à família Brassicaceae, mesma da couve, repolho, mostarda e couve-flor. Esta hortaliça possui importância econômica e sua produção mundial dobrou nos últimos anos (FAOSTAT, 2014). Tal fato se deve, em parte, aos níveis consideráveis de compostos benéficos à saúde, tais como vitaminas, glicosinolatos e seus produtos de degradação, bem como compostos fenólicos, carotenoides, tocoferóis e ácido ascórbico (LATTÉ et al., 2011; ARES et al., 2014).

As plantas, sob condições naturais, frequentemente são expostas a diferentes estresses abióticos, comuns em função da intensidade das variações climáticas (HOLOPAINEN; GERSHENZON, 2010). Ainda que em resposta aos diferentes estresses, as plantas apresentem alterações fisiológicas, moleculares e bioquímicas para manter a homeostase celular e não comprometer seu crescimento, desenvolvimento e reprodução (ATKINSON; URWIN, 2012; TARIQ et al., 2013; COPOLOVICI et al., 2014), fatores abióticos como temperaturas extremas (calor ou frio), seca, salinidade e excesso de radiação ultravioleta estão entre os maiores causadores de perdas na agricultura (FRAIRE-VELÁZQUEZ; BALDERAS-HERNÁNDEZ, 2013).

O déficit hídrico tem especial destaque limitando o desenvolvimento das plantas e resultando normalmente em menor produtividade (SPREER et al., 2009; ZINGARETTI et al., 2013). No entanto, para manter os níveis de água nas células e continuar se desenvolvendo, como resposta adaptativa, as plantas buscam aumentar a capacidade de absorção de água pelas raízes e reduzir a evapotranspiração foliar e conseqüentemente diminuindo a eficiência fotossintética (FAROOQ et al., 2009; ASHRAF et al., 2011). Contudo, dependendo das condições ambientais e da intensidade do estresse sofrido pelas plantas, as alterações metabólicas podem favorecer a síntese e o acúmulo de compostos gerados pelo metabolismo especializado com potenciais efeitos benéficos à saúde (WEI et al., 2013; ZINGARETTI et al., 2013).

Objetivando explorar potenciais vantagens ocasionadas pelos fatores estressores, alguns são aplicados não só na pré-colheita, mas também na pós-colheita, visando gerar modificações metabólicas que implicam em maior vida de

prateleira de frutas e hortaliças. A radiação UV-C é um destes tratamentos, mostrando-se eficaz na redução de micro-organismos, além de reduzir as taxas respiratórias e retardar o amadurecimento e a senescência de diferentes produtos de origem vegetal (JIANG et al., 2010; PARK; KIM, 2015). A radiação UV-C gera uma resposta nos tecidos vegetais, promovendo a ativação dos mecanismos de defesa e conseqüentemente induzindo a ativação das enzimas antioxidantes, bem como a síntese de compostos do metabolismo especializado, principalmente os fenólicos, que atuam na proteção ao estresse oxidativo (PARK; KIM, 2015).

Ainda que se saiba da existência de um potencial uso da aplicação controlada de agentes estressores abióticos sobre o brócolis, as informações disponíveis sobre o efeito do tratamento por redução do aporte hídrico no seu cultivo e da radiação UV-C na pós-colheita ainda são limitadas.

## 1.1 Hipótese

A redução do aporte hídrico na pré-colheita e a radiação UV-C na pós-colheita de brócolis modificam o perfil de metabólitos, a atividade de enzimas antioxidantes e o acúmulo de transcritos da rota dos glicosinolatos

## **1.2 Objetivos**

### **1.2.1 Objetivo geral**

Caracterizar os efeitos isolados e combinados da redução do aporte hídrico na pré-colheita e da radiação UV-C na pós-colheita de brócolis através da análise de parâmetros bioquímicos e moleculares.

### **1.2.2 Objetivos específicos**

- Avaliar o perfil de metabólitos gerais e especializados;
- Avaliar a atividade das enzimas antioxidantes: ascorbato peroxidase, catalase, superóxido dismutase, peroxidase e polifenoloxidase;
- Avaliar o acúmulo de transcritos de genes envolvidos no metabolismo de glicosinolatos.

## 2 Revisão bibliográfica

### 2.1 Brócolis

O gênero *Brassica* abrange uma ampla variedade de vegetais pertencentes à família Brassicaceae, incluindo couve-flor, couve, couve-de-bruxelas, mostarda, repolho, brócolis entre outros. Os vegetais desta família têm se destacado por suas propriedades antioxidantes e efeitos quimiopreventivos (LATTÉ et al., 2011; MEDINA et al., 2015). Estudos epidemiológicos têm encontrado relação positiva entre diminuição nos riscos câncer e a ingestão frequente destas plantas (WU et al., 2013; ZHAO; ZHAO, 2013).

Originário da região oriental do Mediterrâneo e do Oriente Médio, o brócolis (*Brassica oleracea* L. var. *Itálica*) foi introduzido na Europa ainda na Idade Média (AUGUSTINE et al., 2014). O habitat original das diferentes variedades de *B. oleracea* é junto a penhascos rochosos ao longo da costa mediterrânea, a qual possui grande variabilidade geográfica e climática, contribuindo para a ampla diversificação morfológica dentro desta espécie. Os cruzamentos naturais entre vegetais da família Brassicaceae também contribuíram para esta diversificação, mas foi somente a partir da disseminação do seu cultivo e da domesticação que as variedades comestíveis atuais foram obtidas (LUKENS et al., 2003).

O brócolis é hoje uma hortaliça mundialmente consumida e valorizada, principalmente pelo seu alto potencial nutricional. Ele tem baixo valor calórico e alto conteúdo de fibras, além disso possui níveis consideráveis de compostos benéficos à saúde, tais como vitaminas, compostos fenólicos, carotenoides, tocoferóis, ácido ascórbico, bem como glicosinolatos e seus produtos de degradação, os isotiocianatos (LATTÉ et al., 2011; ARES et al., 2013).

Os compostos fenólicos, em geral, são os principais responsáveis pela sua capacidade antioxidante (BACHIEGA et al., 2016). Entre eles, os ácidos hidroxicinâmicos e os flavonoides quercetina, kaempferol e isoramnetina são os compostos encontrados em maior abundância, geralmente estando na forma de O-glicosídeos e acilados com os ácidos *p*-coumárico, cafeico, ferúlico e sinápico (VALLEJO et al., 2004).

Os flavonóis glicosídicos encontrados por Price et al. (1998) nos floretes de brócolis foram a quercetina e o kaempferol 3-O-soforosídeo-7-O-glicosídeo, enquanto outros glicosídeos encontrados em menor quantidade foram isoquercitina, kaempferol 3-O-glicosídeo e kaempferol 3-O-diglicosídeo. Chiu (2015), avaliou a composição das inflorescências de brócolis e detectou compostos derivados do ácido hidroxicinâmico e flavonoides glicosídeos, dentre eles quercetina-3-O-(cafeoil)-soforotriosídeo-7-O-glicosídeo, quercetina-3-O-(p-coumaroil)-soforotriosídeo-7-O-glicosídeo, kaempferol-3-O-(cafeoil)-soforotriosídeo-7-O-soforosídeo e 1-sinapoil-2-feruloilgentiobiose.

Os glicosinolatos e os compostos fenólicos estão constitutivamente presentes no brócolis, mas podem ter seus teores aumentados por inúmeros fatores, variando de acordo com genótipo, órgão e estágio de desenvolvimento da planta. Além disso, a presença de fatores abióticos e bióticos é percebida pelas plantas, modificando o perfil e o acúmulo destes compostos (MARTÍNEZ-VILLALUENGA et al., 2008; BHANDARI; KWAK, 2014).

Assim os glicosinolatos agem como compostos de defesa, induzidos após o ataque de patógenos ou herbívoros, da aplicação de fitohormônios e/ou da ocorrência de estresses abióticos (CLAY et al., 2009; MEWIS et al., 2012b). Seus representantes de maior abundância no brócolis são os indólicos e alifáticos, entre eles a glicorafanina, a glicobrassicina e a neoglicobrassicina (ALVAREZ-JUBETE et al., 2014; BHANDARI; KWAK, 2015).

## **2.2 Estressores abióticos**

As plantas, por serem organismos sésseis, frequentemente são expostas às condições ambientais desfavoráveis que prejudicam seu desenvolvimento. Perturbações abióticas como calor, frio, seca, salinidade, alcalinidade, deficiência de nutrientes ou presença de metais tóxicos como alumínio, cádmio e arsênio no solo alteram as condições de homeostase destes organismos, assim mecanismos moleculares, bioquímicos, fisiológicos e morfológicos são ativados, permitindo o estabelecimento de um novo estado fisiológico dirigido para reintegração de sua condição equilíbrio. Contudo, dependendo do tempo de exposição, do tipo e da intensidade do estressor abiótico, podem ocorrer danos irreversíveis nas plantas,

desde alterações no metabolismo, crescimento e desenvolvimento até a senescência (ATKINSON; URWIN, 2012; JOGAIHAH et al., 2013).

Cada fator abiótico é capaz de gerar uma resposta diferente na planta, dependendo do tecido ou órgão afetado. Além disso a intensidade e a duração da ação estressora podem ter efeito significativo sobre a complexidade de cada resposta (CRAMER et al., 2011; PINHEIRO; CHAVES, 2011). As plantas podem resistir a estas perturbações através de mecanismos que evitem seus efeitos, mas para a anulação destes, precisam de mecanismos que isolem as células das condições estressoras, minimizando seus impactos (SHA VALLI KHAN et al., 2014).

Muitas das vezes, quando as plantas têm a capacidade de suportar tais condições desfavoráveis sem que haja grandes impactos na produtividade, elas passam a ser chamadas de tolerantes. Plantas tolerantes estabelecem uma nova condição de homeostase em resposta às condições estressoras, ajustando o crescimento, o desenvolvimento, bem como as atividades celulares e moleculares. Resistência a um determinado estresse requer que o organismo exiba a capacidade de se adaptar ou de se aclimatar completamente ao estresse, sem que haja qualquer tipo de dano (SHAVALLI KHAN et al., 2014).

### **2.3 Seca**

A seca é um dos estressores abióticos mais relevantes por frequentemente limitar a produtividade vegetal em grande parte da área agrícola mundial. O estresse é gerado quando a disponibilidade de água no solo é reduzida a níveis críticos ou por condições atmosféricas capazes de aumentar a perda contínua de água (RAMAKRISHNA; RAVISHANKAR, 2011; SHA VALLI KHAN et al., 2014).

A seca é o estressor abiótico que mais prejudica o desenvolvimento das plantas, pois o crescimento celular é extremamente sensível a esta condição (ANJUM et al., 2011), resultando na diminuição da altura da planta e da área foliar, bem como da longevidade e número de folhas (FAROOQ et al., 2009; AVRAMOVA et al., 2015).

Diante de condições limitadas de água no solo, as plantas fecham seus estômatos para evitar perdas. Isto, entretanto, diminui a captação de CO<sub>2</sub>, limitando a fotossíntese. Na sequência, os demais componentes da fotossíntese são inibidos,

resultando em menor captação de luz, causando senescência precoce das folhas e diminuição da produtividade (FAROOQ et al., 2009).

Outra maneira de evitar a seca é o encurtamento do ciclo de vida, o qual possibilita que períodos de crescimento e reprodução não sobreponham períodos de falta de água, assim o florescimento precoce é um exemplo de característica adaptativa (ARAUS, 2002). Outro mecanismo capaz de auxiliar as plantas na sua adaptação é a prevenção da perda de água de modo a manter a tensão hídrica anterior ao estresse. Além disso, sob condições limitadas de água no solo, geralmente as raízes aumentam em número, comprimento e profundidade para maior captação de água (TUBEROSA, 2012). Estes órgãos também atuam induzindo uma cascata de sinais para a parte aérea, causando alterações fisiológicas, sendo o ácido abscísico (ABA) apontado como o principal responsável pela sinalização raiz-parte aérea, induzindo o fechamento dos estômatos (ANJUM et al., 2011; TUBEROSA, 2012). Além disso, a cera cuticular presente em todos os órgãos aéreos pode diminuir a transpiração, contribuindo para evitar problemas de desidratação (KOSMA et al., 2009).

O ajustamento osmótico já consiste em outra estratégia de tolerância à seca, implicando no aumento de solutos intracelulares, como carboidratos, álcoois e aminoácidos com o intuito de proteger as funções celulares da planta e manter a turgência. Os benefícios do ajustamento osmótico, entretanto, variam conforme a cultura e a gravidade do estresse (VERSLUES; JUENGER, 2011; TUBEROSA, 2012).

Além dos mecanismos já citados, as plantas modificam suas vias metabólicas para sobreviver ao estresse pela síntese de compostos do metabolismo especializado, sobretudo os compostos antioxidantes, pois minimizam os efeitos das EROs. Estes compostos, geralmente, estão presentes em todas as partes das plantas, mas quando um estímulo externo é percebido pelo vegetal, a síntese destes pode ser intensificada (TEXTOR; GERSHENZON, 2009).

## **2.4 Radiação UV-C**

A luz ultravioleta pode ser dividida em três faixas de comprimento de onda: UV-A de 315 a 400 nm, UV-B de 280 a 315 nm e a UV-C de 100 a 280 nm, visto que

cada faixa tem potencial energético distinto, podendo induzir diferentes efeitos biológicos nos organismos sobre os quais age (SHAMA, 2007; KOWALSKI, 2009). A faixa de comprimento de onda da luz UV-C é altamente energética, resultando em danos severos a diferentes sistemas biológicos (AHMED et al., 2015). Porém esta radiação não está presente na superfície da terra já que é absorvida pelo ozônio e gases atmosféricos (KOWALSKI, 2009).

A radiação com comprimento de onda menor que 320 nm pode ter efeito destrutivo por gerar algumas reações fotoquímicas que não são de nosso interesse. A absorção direta de fótons pelo DNA, mecanismos indiretos abrangendo a excitação de fotossensibilizadores e a geração de espécies reativas de oxigênio estão entre os principais eventos causadores de danos às células. Moléculas com duplas ligações conjugadas, como ácidos nucleicos, proteínas e lipídios são importantes para as funções e estruturas das células, porém, por absorverem energia da luz UV, podem desencadear alterações fisiológicas nas plantas, as quais muitas vezes são indesejáveis (KOWALSKI, 2009; MAHARAJ, 2015).

Na pós-colheita, a radiação UV-C pode ocasionar diversos danos como escurecimento, amadurecimento anormal, rugosidade, amolecimento dos tecidos e perda de nutrientes, diminuindo sua vida útil. Apesar de doses elevadas de radiação UV-C terem efeitos deletérios nos tecidos vegetais, doses baixas podem estimular respostas benéficas, melhorando sua qualidade (SHAMA, 2007).

A ação da radiação UV-C é superficial penetrando somente de 5 a 30 microns nos tecidos, sendo amplamente utilizada na desinfecção de equipamentos e nos alimentos (TURTOI, 2013). Além de ação bactericida, estudos têm apontado que a utilização desta no tratamento pós-colheita retarda a maturação, a senescência, a decomposição, diminui a incidência de doenças e as taxas respiratórias de frutas e hortaliças (PERKINS-VEAZIE et al., 2008).

A aplicação de UV-C na pós-colheita gera um estresse capaz de causar a ativação dos mecanismos de defesa vegetal, de enzimas antioxidantes e de síntese de compostos atuantes na proteção contra espécies reativas de oxigênio (SCHREINER et al., 2009; RAI et al., 2011).

Os ácidos fenólicos e flavonoides desempenham funções importantes nas plantas, pois atuam como filtros que protegem de radiações excessivamente energéticas. Wang et al. (2009) ao avaliarem o efeito pós-colheita da radiação UV-C nas doses de 0,43 a 6,45 kJ m<sup>-2</sup> em mirtilo, observaram um aumento relevante no

conteúdo de flavonóis glicosilados, antocianinas e na capacidade antioxidante total. A aplicação de  $4,1 \text{ kJ m}^{-2}$  de radiação UV-C pós-colheita em morangos induziu o acúmulo de antocianinas e flavonóis (LI et al., 2014). Já em brócolis, foi observado que o teor de compostos fenólicos e flavonoides totais aumentaram imediatamente após a aplicação de radiação UV-C (COSTA et al., 2006).

Contudo, tais efeitos dependem de vários fatores, como diferenças na sensibilidade das culturas, níveis de maturidade e condições ambientais. Além disso, a duração e dosagem da radiação UV-C são cruciais na indução de alterações no metabolismo dos compostos de defesa (EICHHOLZ et al., 2012; MAHARAJ, 2015).

## **2.5 Espécies reativas de oxigênio (EROs)**

As EROs compõem um grupo de radicais livres, moléculas reativas e íons derivados de oxigênio, cujos principais representantes são o ânion superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ), oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2$ ), íon peróxido ( $\text{O}_2^{2-}$ ), peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e radical hidroxila ( $\text{OH}^\bullet$ ). Estes radicais são gerados durante funções metabólicas normais, como na respiração e fotossíntese ou são induzidos por estímulos ambientais, atuando no equilíbrio redox, ativando cascatas de sinalização e exercendo diferentes funções sobre a atividade proteica (WORMUTH et al., 2007; D'AUTRÉAUX; TOLEDANO, 2007).

Em condições de homeostase há um equilíbrio entre a produção e a eliminação de EROs. Porém, quando afetados por fatores estressores, os níveis intracelulares de produção de EROs ultrapassam os níveis de eliminação destas, ocasionando o estresse oxidativo. A produção de altas concentrações de EROs em compartimentos celulares tem efeito altamente tóxicos, sendo um dos estresses abióticos mais deletérios. Em plantas sob estresse hídrico estas moléculas são produzidas devido à diminuição do conteúdo de  $\text{CO}_2$  intracelular, que resulta na transferência de elétrons da cadeia transportadora de elétrons para o oxigênio do fotossistema II (PANDA; KHAN, 2009). As EROs reagem com lipídios, ácidos nucleicos, proteínas e açúcares causando diversos tipos de dano oxidativo. Ao danificar macromoléculas as funções fisiológicas normais são afetadas, provocando disfunções metabólicas irreversíveis e podendo levar a morte celular (FOYER; FLETCHER, 2001).

Contra os danos oxidativos, mecanismos de defesa são ativados para reduzir os níveis tóxicos de EROs (SHARMA et al., 2012). Os antioxidantes naturais protegem os componentes celulares da planta mantendo o equilíbrio redox por ligação ou inativação dos radicais livres (MOST; PAPENBROCK, 2015). A desintoxicação das EROs envolve a ação de antioxidantes enzimáticos (CAT, SOD, APX) e não enzimáticos (ácido ascórbico, glutathiona, tocoferóis) que possuem papel fundamental na eliminação destes compostos (MITTLER, 2002).

## 2.6 Enzimas do sistema redox

Diversas enzimas atuam como antioxidantes impedindo que altas concentrações de EROs se acumulem no interior das células. Dentre as enzimas antioxidantes temos a superóxido dismutase (SOD) que atua na linha de frente da defesa antioxidante nas células vegetais. A SOD catalisa a dismutação do íon superóxido, produzindo peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e oxigênio molecular (Figura 1) (GILL; TUTEJA, 2010; LI et al., 2010). A remoção do íon superóxido diminui a formação do radical hidroxila, o qual é extremamente reativo e prejudicial à célula através da reação de Haber-Weiss (MITTLER, 2002).

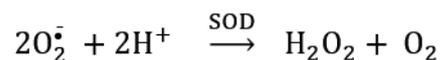


Figura 1 - Reação de dismutação do superóxido catalisada pela SOD.

As enzimas superóxido dismutase são encontradas em todos compartimentos celulares em que as EROs são produzidas e são divididas em três grupos conforme o cofator metálico, que pode ser cobre/zinco (Cu/Zn-SOD) localizado no citosol e cloroplastos, manganês (Mn-SOD), presente nas mitocôndrias e peroxissomos ou ferro (Fe-SOD), encontradas nos cloroplastos (MITTLER, 2002; ASADA, 2006).

O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produzido pela ação da SOD é um oxidante forte e tóxico às plantas, sendo convertido em oxigênio e água pelas enzimas CAT e APX (FARHOUDI et al., 2012). A catalase (CAT) está localizada nos peroxissomos e glioxissomos, sendo responsável por catalisar a conversão do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular (Figura 2). Esta enzima é um tetrâmero e apresenta um grupo heme em

cada subunidade. As suas três principais isoformas são CAT1, CAT2 e CAT3 (WILLEKENS et al., 1994).

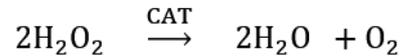


Figura 2 - Reação catalisada pela CAT.

Como a catalase não está presente nos cloroplastos, é a enzima ascorbato peroxidase (APX) que converte o peróxido de hidrogênio em água nesta organela (TEIXEIRA et al., 2004). Esta enzima é classificada como heme peroxidase, pois necessita da ligação do cofator heme para desempenhar sua atividade enzimática. A degradação do  $\text{H}_2\text{O}_2$  é realizada via oxidação do ascorbato, sendo o primeiro produto da reação o radical monodehidroascorbato (MDA). Esta molécula pode ser convertida em ascorbato, de forma espontânea ou pela enzima monodehidroascorbato redutase (MDAR). Além disso, o MDA pode ser convertido a dehidroascorbato, podendo este produto ser regenerado a ascorbato pela dehidroascorbato redutase (KARYOTOU; DONALDSON, 2005).

A peroxidase ou guaiacol-peroxidase reage com compostos que contém grupos hidroxila ligados a anéis aromáticos, atuando na lignificação e suberização, além de exercer outras funções no metabolismo da parede celular vegetal. Esta enzima oxida, preferencialmente, uma molécula de guaiacol para cada molécula de  $\text{H}_2\text{O}_2$  que é reduzida, de modo que quatro moléculas de guaiacol se tetramerizam, reduzindo quatro moléculas de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Figura 3) (HIRAGA, 2001).

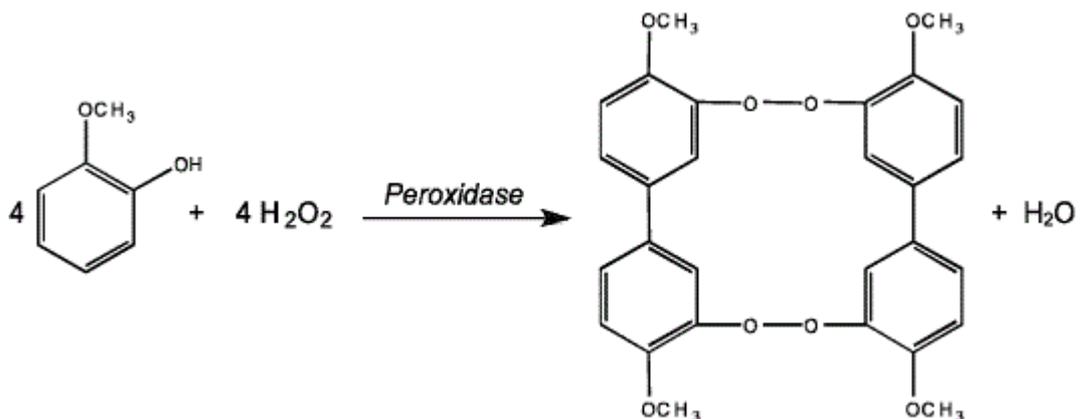


Figura 3 - Reação de redução do peróxido de hidrogênio e tetramerização do guaiacol catalisada pela enzima peroxidase.

As polifenoloxidasas (PPO) catalisam a oxidação de monofenóis e/ou difenóis em *o*-quinonas. Estas enzimas são subdivididas em: monofenol mono-oxigenase (EC 1.14.18.1), que catalisa a oxidação de monofenóis em *o*-difenois e a *o*-difenol: oxigênio oxidoreductase (EC 1.10.3.2), que catalisa a oxidação dos *o*-difenois em *o*-quinonas. Os produtos da reação, as *o*-quinonas são altamente reativas e se ligam a proteínas formando pigmentos escuros de melanina (STEFFENS et al., 1994; KROLL; RAWEL, 2001).

## 2.7 Compostos fenólicos

Provenientes do metabolismo especializado, os compostos fenólicos consistem um amplo e complexo grupo. Estes compostos desempenham diversas funções nas plantas e sua síntese é induzida em condições estressoras bióticas e abióticas, como infecções, ferimentos, radiações UV, ozônio, salinidade, estresse hídrico, térmico, entre outros (RAMAKRISHNA; RAVISHANKAR, 2011).

Os compostos fenólicos são uma classe de metabólitos amplamente dispersos no reino vegetal e caracterizados por terem, ao menos, um anel aromático com um ou mais grupos hidroxila (CARTEA et al., 2011). São oriundos do metabolismo especializado das plantas através da via do chiquimato, onde a fenilalanina amoniliase (PAL) é a enzima responsável pela conversão de aminoácidos aromáticos em compostos fenólicos (CARTEA et al., 2011).

Devido à presença de grupos hidroxila, os compostos fenólicos apresentam capacidade antioxidante, reduzindo moléculas tóxicas como as EROs. Os antioxidantes fenólicos podem atuar através de diferentes mecanismos, mas o sequestro de radicais livres é o mais importante. Os efeitos deletérios das EROs são neutralizados, pois são formados produtos intermediários relativamente estáveis devido a ressonância do anel aromático (HEIMLER et al., 2006).

Os compostos fenólicos podem variar de estruturas simples, de baixo peso molecular, com somente um anel aromático, até compostos complexos, como taninos e ligninas (CROZIER et al., 2006; PEREIRA et al., 2009). Os fenólicos podem ser classificados em flavonoides e não-flavonoides. A classe dos flavonoides compreende os flavonóis, flavonas, flavan-3-ols, antocianidinas, flavanonas, isoflavonas, entre outros. Os compostos não flavonoides englobam os ácidos

fenólicos, ácidos hidroxicinâmicos, estilbenos e normalmente são armazenados na forma de glicosídeos ou em ésteres de ácidos orgânicos (CROZIER et al., 2006). Nas espécies de Brássicas, os flavonoides e os ácidos hidroxicinâmicos são os fenólicos em maior abundância (CARTEA et al., 2011).

Os flavonoides têm uma estrutura básica de 15 carbonos com dois anéis aromáticos ligados por uma ponte de três carbonos (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>). Estão presentes em todo reino vegetal, principalmente na epiderme de folhas e frutos, exercendo diversas funções de defesa nas plantas. Os flavonoides protegem contra a radiação UV, micro-organismos e herbívoros, além disso, alguns compostos estão envolvidos na coloração de folhas e frutos (CROZIER et al., 2006; PEREIRA et al., 2009). Dentro do gênero *Brassica* a quercetina, o kaempferol e a isoramnetina são os compostos em maior abundância (Figura 4). A conjugação na posição 3 do anel-C é encontrada com maior frequência, contudo podem ocorrer substituições nas posições 5, 7, 4', 3' e 5' (CROZIER et al., 2006).

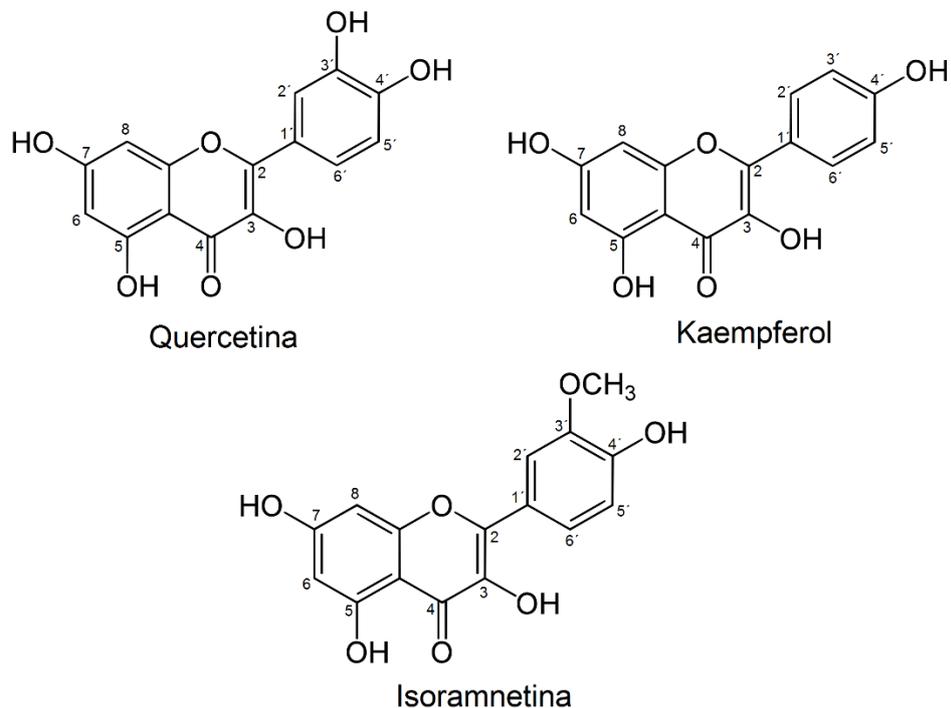


Figura 4 - Flavonoides agliconas encontrados em vegetais Brassica

Os principais compostos não-flavonoides são os ácidos fenólicos, caracterizados por possuir um anel benzênico, um grupamento carboxílico e um ou mais grupos hidroxila e/ou metoxila (RAMAKRISHNA; RAVISHANKAR, 2011). Os derivados do ácido hidroxibenzoico possuem estrutura C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub> e os derivados do

ácido hidroxicinâmico possuem estrutura C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>. Os principais hidroxicimatos são os ácidos *p*-cumárico, cafeico, ferúlico e sinápico. Em geral, são encontrados ligados a uma porção glicosídica ou a outros ácidos hidroxicinâmico (VALLEJO et al., 2004; OLSEN et al., 2009).

## 2.8 Glicosinolatos

Os glicosinolatos são metabólitos especializados relacionados com o mecanismo de defesa das plantas do gênero *Brassica*. A biossíntese destes compostos é induzida após a ocorrência de ferimentos e/ou ataque de patógenos, de herbívoros, da aplicação de fitohormônios, e da ocorrência de fatores estressores abióticos (TEXTOR; GERSHENZON, 2009; MEWIS et al., 2012a). Além disso, seus produtos de degradação são responsáveis por sabores e odores característicos, além de serem capazes de promover efeitos benéficos à saúde humana (AGERBIRK; OLSEN, 2012).

Os glicosinolatos são ésteres de (Z)-N-hidroximinosulfato ligados pelo átomo de enxofre à β-D-glicopirranose com cadeia lateral derivada de aminoácidos (Figura 5). A biossíntese dos glicosinolatos é realizada a partir dos aminoácidos e estes conferem diferentes substituintes para a cadeia lateral R. Os glicosinolatos alifáticos são sintetizados a partir dos aminoácidos alanina, metionina, isoleucina, leucina e valina. Já a biossíntese dos aromáticos ocorre a partir da fenilalanina ou da tirosina, enquanto que os indólicos são derivados do triptofano (SØNDERBY et al., 2010).

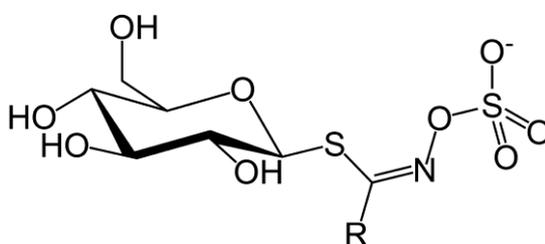


Figura 5 - Estrutura geral dos glicosinolatos. R representa a cadeia lateral derivada de aminoácidos.

A biossíntese destes compostos ocorre em três etapas: (1) alongamento da cadeia lateral de aminoácidos por inserção de grupos metílenos, (2) desenvolvimento da estrutura central do glicosinolato e (3) modificações secundárias

na cadeia lateral. A partir do alongamento da cadeia lateral, antes da formação da estrutura do núcleo do glicosinolato e pelas modificações complementares, incluindo oxidação, dessaturação, hidroxilação, metoxilação, sulfatação e glicosilação, observa-se uma diversidade de glicosinolatos na natureza, sendo que mais de 120 estruturas já foram identificadas (HALKIER; GERSHENZON, 2006; SØNDERBY et al., 2010).

Os produtos de degradação dos glicosinolatos estão relacionados com a atividade biológica contra agentes cancerígenos. Entretanto, estes produtos estão em menor proporção que os glicosinolatos nos vegetais. A produção de derivados dos glicosinolatos ocorre a partir de lesões nos tecidos vegetais, que podem ocorrer ao longo do cultivo, na colheita, no processamento mecânico, congelamento e descongelamento ou até mesmo pela mastigação das partes comestíveis destas plantas (VERMEULEN et al., 2009). Quando o tecido vegetal é danificado, os glicosinolatos são hidrolisados por tioglicosidases (mirosinases) gerando isotiocianatos, tiocianatos e nitrilos (MARTÍNEZ-HERNÁNDEZ et al., 2013).

Os glicosinolatos e as mirosinases estão presentes em todas as células, porém em compartimentos distintos. Os glicosinolatos ficam armazenados no vacúolo, já as mirosinases no citoplasma (VARIYAR et al., 2014). Ao ocorrer uma lesão no tecido celular as mirosinases entram em contato com os glicosinolatos hidrolisando suas ligações enxofre-glicose. A aglicona instável formada sofre rearranjo dependendo do pH do meio, da presença de proteínas e da estrutura da cadeia lateral, originando diferentes produtos (Figura 6) (KOROLEVA et al., 2010).

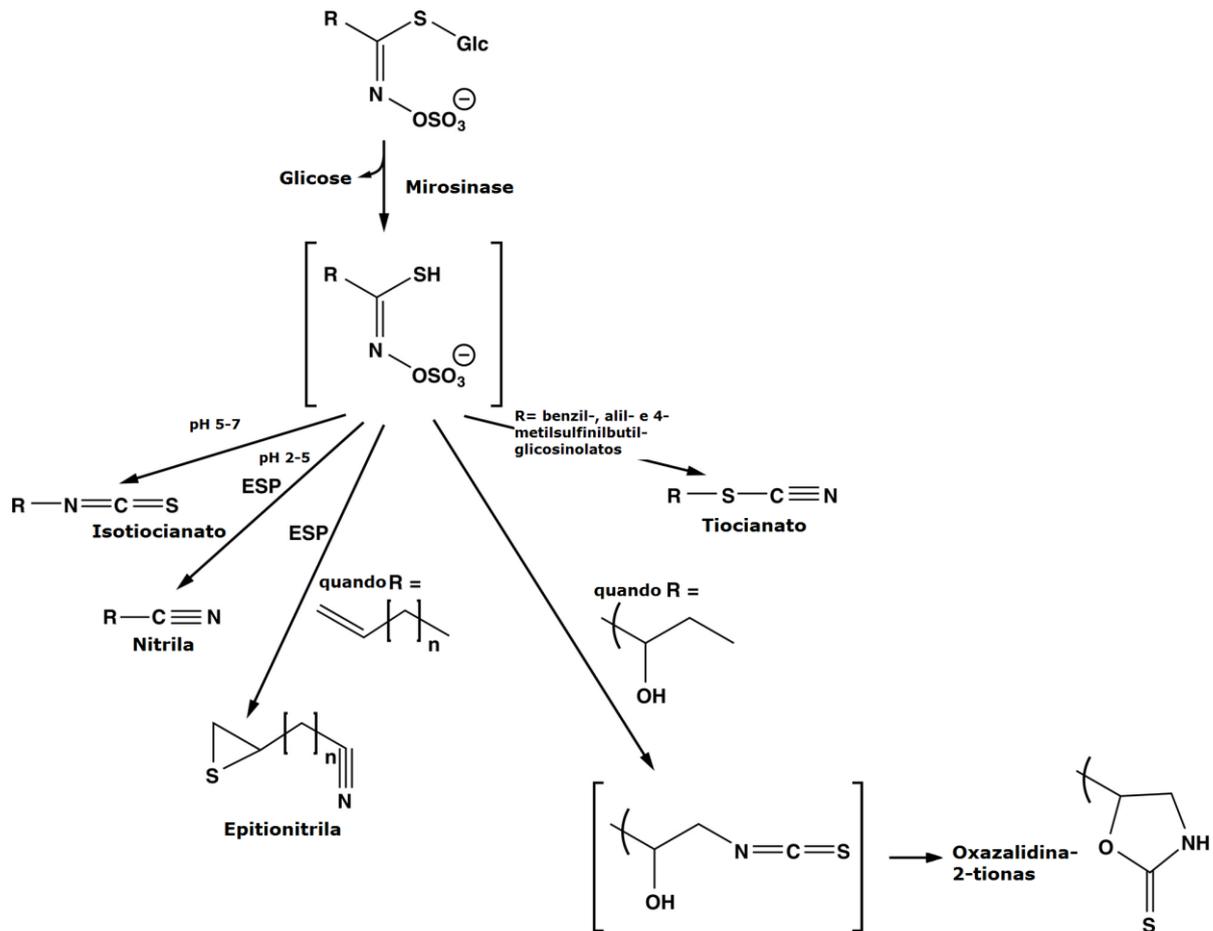


Figura 6 - Esquema dos produtos de degradação dos glicosinatos. Colchetes indicam intermediários instáveis. R: cadeia lateral variável; ESP: proteína epitioespecífica (Adaptado de HALKIER; GERSHENZON, 2006; REDOVNIKOVIC et al., 2008)

O perfil e o acúmulo de glicosinatos podem ser modificados por diversos fatores abióticos. A redução do aporte hídrico em plantas brássicas influencia na biossíntese e no acúmulo de glicosinatos (ZHANG et al., 2008; KHAN et al., 2010). Resultados diversos são encontrados na literatura em relação a síntese de glicosinatos, possivelmente porque a intensidade, a duração da ação estressora, assim como o estágio de desenvolvimento em que a planta se encontra quando aplicado o agente estressor, influenciam o acúmulo de glicosinatos específicos (MARTÍNEZ-BALLESTA et al., 2013).

## 2.9 Brócolis e os agentes estressores abióticos

O brócolis é uma cultura de alto valor biológico, contendo diferentes compostos benéficos a saúde (BHATTACHARJEE; SINGHAL, 2010). Entretanto, o cultivo desta hortaliça deve ser realizado sob condições adequadas de umidade no

solo para se obter o máximo de rendimento e de qualidade. Assim, o fornecimento adequado de água é de extrema importância para seu cultivo (TANGUNE et al., 2016).

Apesar da maioria das culturas exigirem altas tensões de água no solo para seu desenvolvimento máximo, estudos tem observado que condições moderadas de redução de aporte hídrico geram alterações metabólicas que podem intensificar a síntese e o acúmulo de compostos do metabolismo especializado das plantas, como compostos fenólicos e glicosinolatos que possuem potenciais efeitos benéficos à saúde (WEI et al., 2013; ZINGARETTI et al., 2013). Khan et al. (2011) verificaram que a redução do aporte hídrico em brócolis aumentou o conteúdo de kaempferol. Também foi verificado que baixas tensões de água aumentaram o conteúdo total de compostos fenólicos e de alguns ácidos fenólicos e flavonoides individuais (PÉK et al., 2013).

As altas taxas de respiração do brócolis o tornam um produto altamente perecível, de modo que após a colheita ocorre rapidamente o amarelecimento dos floretes, diminuição de peso, além de perdas nutricionais e no conteúdo de fitoquímicos (SERRANO et al., 2006). Estratégias como a aplicação de doses moderadas de estressores abióticos têm sido utilizadas a fim de induzir respostas relacionadas a melhoria da defesa, da qualidade e do conteúdo de compostos do metabolismo especializado. Costa et al. (2006) observaram que a radiação UV retardou o amarelecimento dos brócolis, reduziu o dano tecidual e manteve a atividade antioxidante deste durante o armazenamento. Também foi observado que a aplicação de UV-C em brócolis diminuiu a degradação da clorofila e aumentou o teor de compostos fenólicos totais (BÜCHERT et al., 2011; SIERRA, 2015).

Apesar de haver um interesse na utilização dos chamados “estressores abióticos” como tratamentos para aumentar os níveis de compostos do metabolismo especializado, informações sobre o efeito individual e combinado da restrição hídrica na pré-colheita e da radiação UV-C na pós-colheita no perfil metabólico, no sistema enzimático antioxidante e no acúmulo de transcritos de genes relacionados com a rota de síntese e de degradação de glicosinolatos em brócolis são limitadas.

### 3 Material e métodos

#### 3.1 Material vegetal

Sementes de brócolis (*Brassica oleracea* - var *Italica* cultivar Legacy) foram dispostas em bandejas de isopor de 72 células preenchidas com substrato comercial (Carolina Padrão) em casa de vegetação.

As mudas foram transplantadas após 100 dias (experimento 2014) e 72 dias (experimento de 2015), com tamanho médio de 10 cm, para canteiros em solo constituído de 123 g kg<sup>-1</sup> de argila, 205 g kg<sup>-1</sup> de silte, 672 g kg<sup>-1</sup> de areia, 28 g kg<sup>-1</sup> de matéria-orgânica, 47,3 mg L<sup>-1</sup> de fósforo; 32 mg L<sup>-1</sup> de potássio; 3,54 cmolc L<sup>-1</sup> de cálcio, 0,884 cmolc L<sup>-1</sup> de magnésio, pH de 5,5 e CTC 4,5 cmolc kg<sup>-1</sup>. Em 2015, as características do solo foram 27 g kg<sup>-1</sup> de matéria-orgânica, 94,8 mg L<sup>-1</sup> de fósforo, 40 mg L<sup>-1</sup> de potássio; 5,4 cmolc L<sup>-1</sup> de cálcio, 1,3 cmolc L<sup>-1</sup> de magnésio, pH de 5.5 e CTC 7,0 cmolc kg<sup>-1</sup>. O experimento foi conduzido em canteiros de 2,0 x 1,2 m, com espaçamento de 60 cm entre plantas e de 60 cm entre linhas, para cada repetição dos tratamentos, no município do Capão do Leão (31° 52' 00" S; 52° 21' 24" O e altitude 13,24 m).

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com três repetições por tratamento durante os anos de 2014 e 2015, tendo sido avaliados individualmente a redução do aporte hídrico na pré-colheita e a radiação UV-C na pós-colheita, bem como a interação simultânea entre os estresses.

#### 3.2 Aplicação de estressor na pré-colheita

A irrigação foi realizada por gotejamento até a formação da inflorescência, mantendo a tensão de água no solo inferior a 15 kPa. Após a formação da inflorescência, até o momento da colheita, as irrigações foram feitas de acordo com o tratamento, tendo sido realizados dois tratamentos pré-colheita:

**Tratamento 1:** controle (C), aporte hídrico normal, com tensão de água no solo de até 15 kPa;

**Tratamento 2:** aporte hídrico reduzido, com tensão de água no solo de até 75 kPa.

Os valores de tensão de água no solo médios obtidos foram de  $16\pm 6$  kPa e  $51\pm 14$  kPa em 2014 e  $12\pm 5$  kPa e  $50\pm 10$  kPa em 2015. Para o cálculo da média foram considerados os valores de uma semana anterior à colheita, ocorrida em 27 de outubro de 2014 e 12 de outubro de 2015.

Após a colheita, as plantas foram higienizadas durante 10 min em solução de hipoclorito de sódio (150 ppm; pH a 5,5) e floretes foram cortados com aproximadamente 6 cm de altura.

### 3.3 Aplicação de estressor na pós-colheita

Para a aplicação da radiação UV-C na pós-colheita foram utilizados floretes de brócolis do tratamento 1 (controle) submetidos ao aporte hídrico normal (15 kPa).

Os floretes de brócolis higienizados foram dispostos em bandejas para aplicação de radiação UV-C na superfície. A radiação UV-C foi realizada em câmara com quatro lâmpadas germicidas (Phillips®) de 30 W, com comprimento de onda de 254 nm, em seu interior. A intensidade de fluxo de radiação emitida foi mensurada com medidor de luz ultravioleta digital (RS-232 Modelo MRUR-203, Instrutherm®). As bandejas foram dispostas no interior da câmara e expostas a doses de:

**Tratamento 3:**  $7 \text{ kJ m}^{-2}$  (15 kPa/ $7 \text{ kJ m}^{-2}$ );

**Tratamento 4:**  $10 \text{ kJ m}^{-2}$  (15 kPa/ $10 \text{ kJ m}^{-2}$ ).

Tais condições são consideradas adequadas para a cultura segundo a literatura (COSTA et al., 2006; LEMOINE et al., 2008; BÜCHERT et al., 2011; GOMEZ-LOBATO et al., 2012).

### 3.4 Aplicação combinada de estressores em pré-colheita e pós-colheita

Para avaliar o efeito combinado dos estressores aplicados em pré e pós-colheita foram realizados mais dois tratamentos:

**Tratamento 5:** tensão de água no solo de até 75 kPa com dose UV-C  $7 \text{ kJ m}^{-2}$  (75 kPa/ $7 \text{ kJ m}^{-2}$ );

**Tratamento 6:** tensão de água no solo de até 75 kPa com dose UV-C 10 kJ m<sup>-2</sup> (75 kPa/10 kJ m<sup>-2</sup>).

Posteriormente, as plantas submetidas aos diferentes tratamentos foram acondicionadas em embalagens de polietileno e armazenadas a -80 °C até o momento das análises.

### **3.5 Perfil metabólico**

#### **3.5.1 Preparo das amostras e extração**

Os brócolis foram liofilizados e pesados (500 mg) em microtubos de 2 mL, em triplicata. A cada tubo foi adicionada uma quantidade de 2 mL de metanol 75 % acidificado com 0,1 % de ácido fórmico contendo 10 µg mL<sup>-1</sup> de reserpina (padrão interno). As amostras foram sonicadas por 15 min e centrifugadas a 15.777 x g por 10 min a temperatura ambiente e o sobrenadante foi recolhido. Os sobrenadantes foram filtrados em membrana de nylon 0,2 µm e armazenados a -80°C até o momento das análises (DE VOS, et al., 2007).

#### **3.5.2 Instrumentação e condições analíticas**

Para as análises do perfil metabólico foi utilizado um cromatógrafo líquido (Shimadzu™, Kyoto, Japan) acoplado a espectrômetro de massas de alta resolução do tipo quadrupolo-tempo de voo (Impact HD, Bruker Daltonics™, Bremen, Germany). Para a separação cromatográfica foi utilizada a coluna Bidentate C18 (100 mm x 2.1 mm) (MicroSolv Technology Corporation™, Leland, NC, EUA). As fases móveis foram água com 0,1 % de ácido fórmico (solvente A) e acetonitrila com 0,1 % de ácido fórmico (solvente B).

O gradiente de eluição começou com 5 % de solvente B e aumentando para 75 % de B em 20 min, sendo mantido a 75 % de B durante 5 min em seguida foram reestabelecidas as condições iniciais em 1 min e mantendo-se a 5 % de B durante

4 min. O fluxo foi de 0,2 mL min<sup>-1</sup>, a temperatura da coluna foi mantida em 40 °C e o volume de injeção foi de 10 µL (DE VOS et al., 2007).

O espectrômetro de massas foi operado no modo de ionização negativo, com espectros adquiridos ao longo de uma faixa de massa de  $m/z$  50 a 1200. Os parâmetros de aquisição foram: voltagem do capilar em 4 kV, pressão do gás de nebulização (N<sub>2</sub>) de 2 bar, fluxo do gás de secagem 8 L min<sup>-1</sup>, temperatura da fonte de 180°C, colisão de RF de 150 Vpp; transfer 70 mS e armazenamento pré-pulso de 5 mS. O equipamento foi calibrado com formiato de sódio (10 mM) cobrindo toda a faixa de aquisição. Além disso, experimentos automáticos de MS/MS foram realizados ajustando os valores de energia de colisão como se segue:  $m/z$  100, 15 eV;  $m/z$  500, 35 eV;  $m/z$  1000, 50 eV, usando nitrogênio como gás de colisão. Os compostos discriminantes foram quantificados em relação ao padrão interno (reserpina).

### 3.5.3 Processamento de dados e análise estatística

Os dados do MS e MS/MS foram processados no programa computacional DataAnalysis 4.0 (Bruker Daltonics™, Bremen, Germany). Já o ProfileAnalysis™ (version 2.0, Bruker Daltonics™, Bremen, Germany) foi utilizado para processamento dos registros do LC-MS através da mineração dos dados e alinhamento.

Para cada amostra foi realizada a normalização pela soma total da área do pico e escalonamento de Pareto. A análise de componentes principais (PCA, do inglês *Principal Component Analysis*) e análise discriminante por quadrados mínimos parciais (PLS-DA, do inglês *Partial Least Squares Discriminant Analysis*) foi realizada no MetaboAnalyst 3.0 ([www.metaboanalyst.ca](http://www.metaboanalyst.ca) – McGill University). A importância das variáveis na projeção (VIP, do inglês *Variable Importance in Projection*) superior a 1,5 foi escolhida para selecionar os metabólitos discriminantes. A identificação dos metabólitos foi realizada a partir dos valores de  $m/z$  exatos e do padrão de fragmentação comparado com os dados dos bancos Metlin, Mass Bank, FooDB e ReSpec, assim como com diversas referências disponíveis na literatura.

## **3.6 Atividade enzimática**

### **3.6.1 Extrato enzimático bruto**

O preparo do extrato enzimático bruto foi realizado de acordo com Giannopolitis e Ries (1977) e Lemoine et al. (2010). Os floretes de brócolis (700 mg) congelados foram moídos e homogeneizados em 5 mL de tampão de extração (100 mM de tampão fosfato de potássio pH 7,8, 10 mM de EDTA, 10 g L<sup>-1</sup> de polivinilpirrolidona). A suspensão obtida foi agitada 4 vezes em intervalos de 15 min e centrifugada a 7.200 x g durante 20 min. O sobrenadante foi recolhido e utilizado para o ensaio da atividade enzimática. Foram preparados quatro extratos para cada tratamento. Cada extrato foi avaliado em triplicata.

### **3.6.2 Ascorbato peroxidase (APX)**

A atividade da ascorbato peroxidase (EC 1.11.1.11) foi determinada através do decréscimo da absorbância a 290 nm durante 3 min, com leituras a cada 15 s. A atividade enzimática foi determinada pela mistura de 50 mM de tampão fosfato de potássio (pH 7), 0,5 mM de ácido ascórbico, 0,1 mM de peróxido de hidrogênio e 200 µL de extrato enzimático bruto em um volume total de 2 mL (NAKANO; ASADA, 1981).

### **3.6.3 Catalase (CAT)**

A avaliação de atividade da catalase (EC 1.11.1.6) foi realizada através do método de Chance e Maehly (1955). Misturou-se 50 mM de tampão de fosfato de potássio (pH 7), 12,5 mM de peróxido de hidrogênio e 200 µL de extrato enzimático bruto em um volume total de 2 mL. O decréscimo da absorbância foi observado a 240 nm com leituras a cada 15 s durante 3 min. A unidade de atividade da catalase foi definida como a quantidade de enzima necessária para decompor 1 µmol de peróxido de hidrogênio por min por mg de proteína.

#### **3.6.4 Superóxido dismutase (SOD)**

Para o ensaio da atividade da SOD (EC 1.15.1.1) foram misturados 50 mM de tampão fosfato de potássio (pH 7,8), 15 mM L-metionina, 10  $\mu$ M de EDTA, 60 mM de nitro azul de nitro-tetrazólio (NBT), 2  $\mu$ M riboflavina e 14  $\mu$ L de extrato de enzima em um volume total de 280  $\mu$ L. A mistura foi colocada sob duas lâmpadas fluorescentes (20 W) à temperatura ambiente durante 15 min. A reação foi terminada desligando-se a luz e em seguida, a absorbância foi medida a 560 nm. Uma unidade de atividade enzimática (UAE) foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir em 50% a foto-redução de NBT por mg proteína (GIANNOPOLITIS; RIES, 1975).

#### **3.6.5 Peroxidase (POD)**

A análise da atividade da peroxidase (EC 1.11.1.7) foi medida segundo o método de Morales-Blancas et al. (2002), através da mistura de 270  $\mu$ L de guaiacol/peróxido de hidrogênio (30%)/100 mM de tampão de fosfato de potássio (pH 7) (0,1:0,1:99,8 v/v/v) e 10  $\mu$ L de extrato bruto. O aumento da absorbância foi observado a 470 nm com leituras a cada 15 s durante 20 min.

#### **3.6.6 Polifenoloxidase (PPO)**

A atividade da enzima polifenoloxidase (EC 1.10.3.1) foi determinada através da mistura de solução de catecol 93 mM e de tampão de fosfato de potássio 100 mM pH 7 e 20  $\mu$ L de extrato de enzima a 40 °C. O aumento da absorbância foi observado a 420 nm com leituras a cada 15 s durante 20 min (KUMAR et al., 2008).

#### **3.6.7 Determinação de proteínas**

A determinação da atividade de enzimas antioxidantes foi realizada com base no teor de proteínas presentes nos extratos. Para esta determinação foi utilizado

0,1 mL de extrato vegetal, em mistura com 5 mL de reagente de Bradford. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 595 nm, 1 min após a reação. A quantificação de proteínas foi realizada a partir de curva padrão ajustada de acordo com as concentrações de proteínas na forma de caseína (0 a 100 µg em 100 mL) (BRADFORD, 1976).

### 3.7 Expressão gênica

#### 3.7.1 Meta-análise da expressão transcricional de genes das rotas de síntese e degradação de glicosinolatos em arabisopsis sob estresse

Para obtenção de dados sobre genes das rotas de síntese e degradação de glicosinolatos 20 genes foram selecionados a partir do trabalho de Gao et al. (2014). Seus números de identificação foram inseridos na ferramenta de análise “*Condition Search Tools - Perturbations*” do Genevestigator (HRUZ et al., 2008) utilizando as condições padrão (log2) e dados de plantas de arabisopsis submetidas à condições estressoras por seca e por radiação UV-B (*Experiment ID/Link to repository*: AT-00743 e AT-00616) (FAVORY et al., 2009; CLAUW et al., 2015).

Para o estresse causado por seca as sementes de Arabidopsis Columbia (Col-0) foram estratificadas durante 4 dias a 4 °C no escuro e germinaram durante 4 dias em solo sem limitação de água. As plântulas foram então transplantadas para vasos com conteúdo de água do solo (SWC, do inglês *Soil Water Content*) ajustado para 2,2 g de H<sub>2</sub>O g<sup>-1</sup> de solo seco (condição controle, sem promoção de estresse por seca), ou 1,2 g de H<sub>2</sub>O g<sup>-1</sup> de solo seco (condição de seca). As plantas foram mantidas nestas condições durante 6 dias em câmara de crescimento, com 16 h de luz (110-120 µmol fótons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>)/8 h escuro, 21 °C, 55 % de umidade relativa. A terceira folha de roseta foi colhida no início da transição da proliferação celular para expansão celular (CLAUW et al., 2015).

Já para o estresse causado por radiação UV-B mudas de Col-0 foram cultivadas durante 4 dias em meio sólido Murashige e Skoog a 18-23 °C sob luz contínua (luz branca de 3,6 µmol de fótons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> (tubos Osram L18W/30) + luz ultravioleta de 1,5 Mmol fótons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> (tubos Philips TL20W/01RS). As lâmpadas

foram filtradas através do filtro de corte WG345 (comprimento de onda transmitido > 345 nm, para a condição sem UVB), ou do filtro de corte WG305 (comprimento de onda transmitido > 305 nm, para a condição de baixo UV-B) (FAVORY et al., 2009).

Dados da expressão transcricional destes genes podem ser encontrados no Anexo A.

### 3.7.2 Extração de RNA total e síntese de cDNA

Para extração do RNA total foram utilizados aproximadamente 100 mg de floretes de brócolis pulverizados em nitrogênio líquido (N<sub>2</sub>) e adicionados 500 µL reagente *Concert™ Plant RNA Reagent* (Invitrogen™, Carlsbad, CA, EUA). A mistura foi homogeneizada em vórtex durante 1 min e mantida à temperatura de 25 °C durante 5 min e centrifugada por 15 min a 15.777 x g à temperatura de 4 °C. O sobrenadante (400 µL) foi transferido para um novo tubo de microcentrifuga e adicionado de 100 µL de solução de NaCl (5 M) e homogeneizou-se por inversão durante 1 min. Foram então adicionados 30 µL de clorofórmio e homogeneizou-se, novamente, invertendo o tubo durante 1 min. As amostras foram centrifugadas à 15.777 x g durante 10 min a 4 °C. A fase superior aquosa (200 µL) foi transferida para um novo tubo de microcentrifuga onde se adicionou 200 µL de álcool isopropílico. Homogeneizou-se por inversão durante 1 min e a mistura foi mantida à -20°C por 30 min antes das amostras serem centrifugadas a 12.000 x g por 10 min à 4 °C. Logo o precipitado foi lavado com 1 mL de álcool etílico 75 % e centrifugado à 12.000 x g por 3 min à 4 °C, sendo o sobrenadante descartado na sequência. Após a secagem do álcool etílico 75 % as amostras foram ressuspensas em 30 µL de água ultra-pura tratada com dietilpirocarbonato (DEPC). A qualidade e a quantidade do material extraído foram verificadas através de eletroforese em gel de agarose e por espectrofotômetro.

As amostras foram digeridas com *DNAse I* (Invitrogen™, Carlsbad, CA, EUA) seguindo as instruções do fabricante. O cDNA foi sintetizado a partir de 0,1 µg µL<sup>-1</sup> de RNA usando *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems™, Foster City, CA, EUA) de acordo com as recomendações do manual do fabricante.

### 3.7.3 Análise de expressão gênica por RT-qPCR

As reações de PCR em tempo real (RT-qPCR, do inglês *Real-Time Quantitative Reverse Transcription PCR*) foram conduzidas em equipamento 7500 Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems™, Foster City, CA, EUA), a partir de 1 µL do cDNA e 2,5 mM de oligonucleotídeos *forward* e *reverse*, usando *GoTaq® qPCR Master Mix* (Promega™, Madison, WI, EUA) em um volume total de 12 µL. As condições de amplificação foram: desnaturação inicial 95 °C por 2 min, seguido de 40 ciclos de duas etapas (95 °C por 15 s e 60 °C durante 1 min) e extensão final a 72 °C por 5 min. A lista de genes alvo e referência contendo as sequências de seus respectivos pares de oligonucleotídeos encontra-se disponível na Tabela 1

Tabela 1 - Oligonucleotídeos usados para análise de expressão gênica.

Gene		Sequencia (5'→3')
<i>Actina</i>	Senso	CCAGAGGTCTTGTTCCAGCCATC
	Antisenso	GTTCCACCACTGAGCACAATGTTAC
<i>FMO<sub>GS-0X2</sub></i>	Senso	GGGACGACGATGATCTCATAAAA
	Antisenso	TCATCTTCCTGATTTTGGGAAATAAG
<i>PEN2</i>	Senso	CACCTTCAAAGAACATATCCTACATCG
	Antisenso	CCTTCAGTGACTGCTCCTTCATACTG

As sequências de oligonucleotídeos para brócolis foram obtidas utilizando o programa computacional *Vector NTI™* (Invitrogen™, Carlsbad, CA, EUA) com sequências obtidas do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>). O critério de seleção dos iniciadores consistiu em tamanho de *amplicon* variando de 50 a 150 pb, temperatura de anelamento entre 60 e 65 °C e conteúdo de CG entre 40 e 60 % de acordo com as recomendações da Applied Biosystems™. A expressão relativa foi calculada usando a  $ER = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

## 4 Resultados e discussão

### 4.1 Perfil metabólico

A variação dentro do conjunto de dados foi avaliada usando a PCA. Nela foi possível perceber que o componente principal 1 (PC1) foi responsável por 55 % da variação total, enquanto o PC2 justificou 21,6 % desta no experimento do ano de 2014 (Figura 7 A). A partir da PCA se pode observar a diferenciação entre os tratamentos cultivados sob aporte reduzido de água e sob condições hídricas adequadas. Além da distinção entre os tipos de cultivo, observa-se que a aplicação de doses de 7 e 10 kJ m<sup>-2</sup> de UV-C contribuiu para a separação dos grupos.

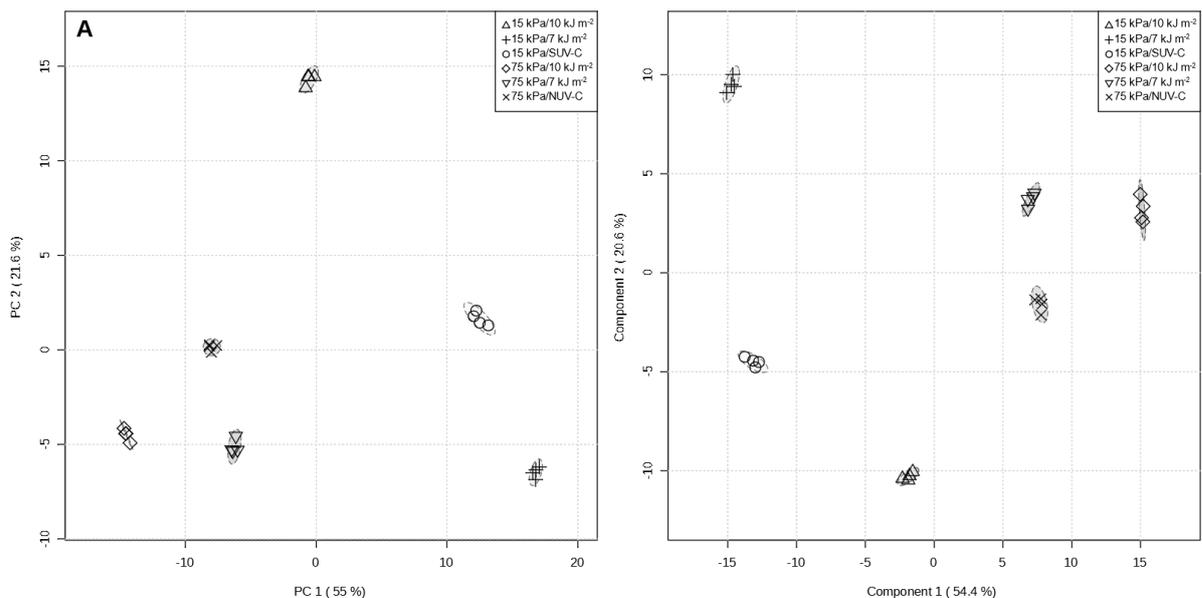


Figura 7 – Análise do perfil de metabólitos dos brócolis do experimento de 2014. A. valores para análise de componentes principais; B. análise discriminante por quadrados mínimos parciais (PLS-DA).

O conjunto de dados da análise por LC-MS foi avaliado por análise de discriminação de mínimos quadrados parciais (PLS-DA) e auxiliou na confirmação da diferenciação entre tratamentos (Figura 7 B) e indicou quais metabólitos que mais influenciaram os agrupamentos. A qualidade do modelo e a validação de desempenho foram avaliadas pelos parâmetros R<sup>2</sup> e Q<sup>2</sup>. R<sup>2</sup> que indica a qualidade do ajuste foi de 0,91 e Q<sup>2</sup> que indica a qualidade da previsão foi de 0,89.

No experimento de 2015 se pode observar que o PC1 foi responsável por 40,2 % e o PC2 por 26,1 % da variação total (Figura 8 A). Igualmente ao observado no ano de 2014, houve diferenciação entre o cultivo normal e em regime de aporte hídrico reduzido. Nos brócolis cultivados sob baixas tensões de água observa-se maior distinção dos grupos pelo tratamento UV-C. A discriminação entre os tratamentos pré e pós-colheita foi confirmada pela análise de PLS-DA (Figura 8 B). A partir da validação do modelo obteve-se valores de  $R^2$  igual a 0,99 e  $Q^2$  igual a 0,95.

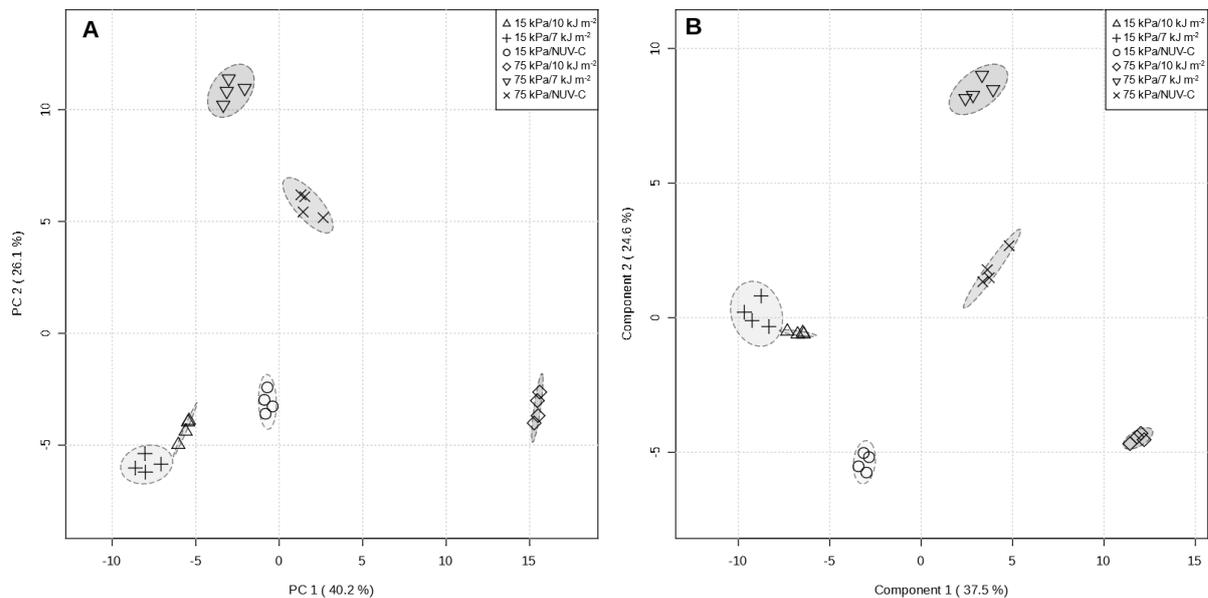


Figura 8 - Análise do perfil de metabólitos dos brócolis do experimento de 2015. A - valores para análise de componentes principais; B - análise discriminante por quadrados mínimos parciais (PLS-DA).

A partir destas análises se pode constatar que independentemente do fator ano há alterações no metabolismo dos brócolis cultivados sob aporte hídrico normal e sob aporte hídrico reduzido. Contudo é evidente que outros fatores estão envolvidos nas alterações promovidas pela radiação UV-C.

A redução do aporte de água além de afetar a relação planta-água, pode causar estresse oxidativo nas plantas. Este estresse pode induzir a síntese de compostos que absorvem a radiação UV, diminuindo danos nas proteínas, lipídios e DNA e aumentando a resistência ao UV-C (ALEXIEVA et al., 2001; APEL; HIRT, 2004).

## 4.2 Componentes chave

### 4.2.1 Experimento de 2014

Através da análise PLS-DA foi possível enumerar os metabólitos que influenciaram na separação dos tratamentos, baseado na projeção de importância das variáveis (VIP score), de modo que quanto maiores os valores de VIP score, maior a contribuição na discriminação dos grupos. Em geral, valor de VIP maior que um é utilizado como limiar para a seleção de variáveis, uma vez que a média dos quadrados de VIP de todos os valores de variáveis é igual a um (AKARACHANTACHOTE et al., 2014).

Os metabólitos e a influência de cada composto (valores VIP > 1.5) na discriminação das amostras cultivadas sob aporte hídrico normal e sob baixas tensões de água e submetidas as diferentes doses de radiação UV-C na pós-colheita no experimento de 2014 estão apresentados na Figura 9.

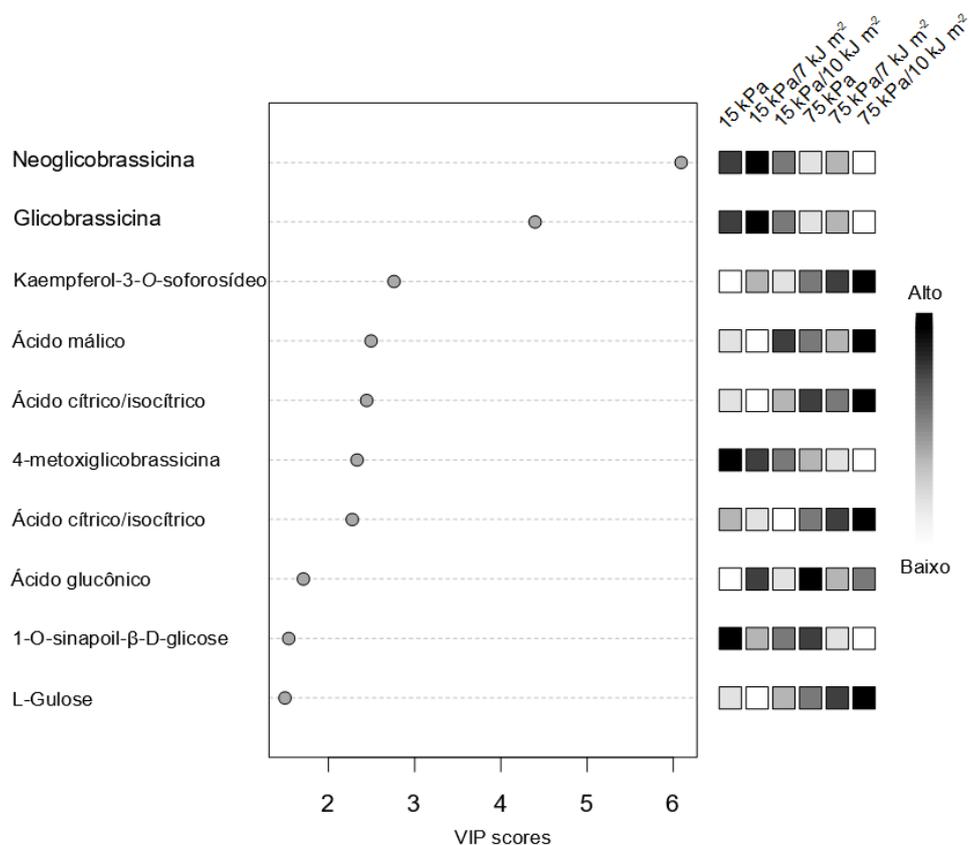


Figura 9 - Projeção de importância das variáveis (VIP scores), derivados do PLS-DA, a partir da análise do perfil de metabólitos dos brócolis tratados do experimento de 2014; Eixo Y (esquerdo) - são apresentados o nome de cada composto; Eixo Y (direito) - está representando a intensidade de cada composto nos diferentes tratamentos; Eixo X - pontuações do VIP.

Na Tabela 2 são apresentadas informações de identificação dos metabólitos que contribuíram para a diferenciação entre os tratamentos.

Os brócolis cultivados sob condições normais (15 kPa/SUV-C) apresentaram maior intensidade para o composto 1-O-sinapoil- $\beta$ -D-glicose, enquanto os cultivados sob condições hídricas normais e com aplicação de 7 kJ m<sup>-2</sup> de radiação UV-C (15 kPa/7 kJ m<sup>-2</sup>) os compostos neoglicobrassicina, glicobrassicina, 4-metoxiglicobrassicina e o ácido glucônico apresentaram maiores intensidades. Os brócolis submetidos ao aporte hídrico reduzido e que receberam 10 kJ m<sup>-2</sup> de radiação UV-C (75 kPa/10 kJ m<sup>-2</sup>) apresentaram maior intensidade para o kaempferol-3-O-soforosídeo, ácido málico, ácido cítrico/isocítrico e L-gulose.

O composto de íon molecular [M-H]<sup>-</sup> *m/z* 477,0645 com fragmentos de *m/z* 95,9525, ânion de radical sulfato [SO<sub>4</sub>]<sup>-</sup> e *m/z* 96,9605, fragmento decorrente da perda do sultafo de hidrogênio [HSO<sub>4</sub>]<sup>-</sup> (Figura 10 A) foi identificado como neoglicobrassicina. Este glicosinolato indólico foi o principal composto responsável pela distinção dos tratamentos pré e pós-colheita nos brócolis. O acúmulo de neoglicobrassicina foi maior nos brócolis cultivados em condições hídricas normais, sendo que a concentração foi reduzida em mais de 50 % em brócolis cultivado sob baixas tensões de água, independente da aplicação de UV-C. O tratamento 3 (15 kPa/7 kJ m<sup>-2</sup>) obteve a maior concentração, com média de 3,09 mg g<sup>-1</sup> (Tabela 3).

A glicobrassicina apresentou íon molecular [M-H]<sup>-</sup> *m/z* 447,0533 e íons fragmentos de *m/z* 79,9572 [SO<sub>3</sub>H]<sup>-</sup> (radical ácido sulfônico), *m/z* 95,9521 [SO<sub>4</sub>]<sup>-</sup> (ânion de radical sulfato) e *m/z* 96,9602 [HSO<sub>4</sub>]<sup>-</sup> (sultafo de hidrogênio) (Figura 10 B). A glicobrassicina foi reduzida nos brócolis cultivado sob aporte hídrico reduzido, sendo que a menor concentração foi encontrada no tratamento 75 kPa/10 kJ m<sup>-2</sup> (0,53 mg g<sup>-1</sup>) e a maior no tratamento 15 kPa/7 kJ m<sup>-2</sup> (1,88 mg g<sup>-1</sup>) (Tabela 3).

A 4-metoxiglicobrassicina foi identificada pelo íon molecular [M-H]<sup>-</sup> *m/z* 477,0645 com fragmentos de *m/z* 95,9523, ânion de radical sulfato [SO<sub>4</sub>]<sup>-</sup> e *m/z* 96,9601, fragmento decorrente da perda do sultafo de hidrogênio [HSO<sub>4</sub>]<sup>-</sup> (Figura 10 F). A redução do aporte hídrico influenciou negativamente no acúmulo de 4-metoxiglicobrassicina, de modo que a concentração foi maior no tratamento 15 kPa/7 kJ m<sup>-2</sup> (0,53 mg g<sup>-1</sup>) e menor 75 kPa/10 kJ m<sup>-2</sup> (0,22 mg g<sup>-1</sup>) (Tabela 3).

Tabela 2 - Identificação dos metabólitos responsáveis pela diferenciação entre os tratamentos pré e pós-colheita nos brócolis cultivados no ano de 2014

#	TR (min)	Massa experimental (m/z)	Massa teórica (m/z)	Erro (ppm)	Fórmula molecular [M-H] <sup>-</sup>	mSigma	Identidade do composto	Fragmentos MS <sup>2</sup>	VIP score
1	7,4	477,0645	477,0645	-0,3	C <sub>17</sub> H <sub>21</sub> N <sub>2</sub> O <sub>10</sub> S <sub>2</sub>	10,9	Neoglicobrassicina	95,9525(38), 96,9605(100)	6,1
2	5,5	447,0536	447,0533	1,0	C <sub>16</sub> H <sub>19</sub> N <sub>2</sub> O <sub>9</sub> S <sub>2</sub>	14,8	Glicobrassicina	79,9572(10), 95,9521(50), 96,9602(100)	4,4
3	8,2	609,1459	609,1461	0,4	C <sub>27</sub> H <sub>29</sub> O <sub>16</sub>	2,9	Kaempferol-3-O-soforosídeo	284,0319(100), 285,0384(48)	2,7
4	1,9	133,0144	133,0142	2,2	C <sub>4</sub> H <sub>5</sub> O <sub>5</sub>	6,5	Ácido málico	71,0158(10), 115,0037 (100)	2,5
5	2,7	191,0199	191,0197	0,1	C <sub>6</sub> H <sub>7</sub> O <sub>7</sub>	5,6	Ácido cítrico/isocítrico	85,0296(25), 87,0092(55), 111,0089(100)	2,4
6	6,5	477,0640	477,0643	0,1	C <sub>17</sub> H <sub>21</sub> N <sub>2</sub> O <sub>10</sub> S <sub>2</sub>	16,1	4-metoxiglicobrassicina	95,9523(79), 96,9601(100), 259,0128(4)	2,3
7	1,9	191,0199	191,0197	0,6	C <sub>6</sub> H <sub>7</sub> O <sub>7</sub>	2,4	Ácido cítrico/isocítrico	85,0299(29), 87,0091(55), 111,0088(100)	2,3
8	1,7	195,0511	195,0510	0,3	C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> O <sub>7</sub>	2,9	Ácido glucônico	75,0089(100), 87,0073(23), 129,0202(39)	1,7
9	7,0	385,1138	385,1140	0,2	C <sub>17</sub> H <sub>21</sub> O <sub>10</sub>	3,3	1-O-sinapoil-β-D-glicose	190,0270(48), 205,0506(100), 223,0610(4)	1,5
10	1,7	179,0556	179,0561	2,7	C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> O <sub>6</sub>	0,7	L-Gulose	78,9609(30), 96,9600(100), 101,0233 (17)	1,5

TR: tempo de retenção; mSigma: similaridade entre o padrão isotópico teórico e o experimental. Quanto menor o valor de mSigma maior a similaridade entre o resultado experimental e o teórico esperado.

Os glicosinolatos identificados neste estudo foram encontrados em menor concentração em plantas cultivadas sob aporte reduzido de água. Porém, independente do tratamento pré-colheita, a aplicação de  $7 \text{ kJ m}^{-2}$  de radiação UV-C promoveu o acúmulo de glicosinolatos enquanto que a dose de  $10 \text{ kJ m}^{-2}$  promoveu o catabolismo destes compostos. Khan et al. (2010) observaram que em brócolis cultivados sob deficiência de água houve uma diminuição significativa no conteúdo de glicosinolatos indólicos, semelhante a este estudo. Segundo Nadeau et al. (2012) o teor de 4-metoxiglicobrassicina aumentou em brócolis tratados com  $1,2 \text{ kJ m}^{-2}$  de radiação UV-C, além disso o UV-C contribuiu para a manutenção dos glicosinolatos totais.

Os glicosinolatos são compostos sensíveis aos estressores abióticos, de modo que a salinidade, a seca, as temperaturas extremas, a radiação UV e privação de nutrientes podem alterar o perfil destes metabólitos nas plantas (MARTÍNEZ-BALLESTA et al., 2013).

O íon precursor  $[M-H]^-$   $m/z$  609,1461 com fragmento  $m/z$  285,0384 referente ao kaempferol aglicona (Figura 10 C) foi identificado como kaempferol-3-O-soforosídeo. Os brócolis cultivados sob aporte reduzido de água apresentaram maior conteúdo deste flavonoide. Além disso, a radiação UV-C contribuiu para um maior acúmulo do composto, independentemente do tipo de cultivo. O tratamento  $75 \text{ kPa}/10 \text{ kJ m}^{-2}$  ( $0,55 \text{ mg g}^{-1}$ ) apresentou o maior teor de kaempferol-3-O-soforosídeo, enquanto que o tratamento cultivado sob aporte adequado de água e sem aplicação de UV-C ( $15 \text{ kPa}$ ) apresentou o menor teor  $0,06 \text{ mg g}^{-1}$  (Tabela 3). Os flavonoides presentes no gênero *Brassica* geralmente encontrados na forma glicosídica ou acilados por derivados do ácido cinâmico, desempenham vários papéis na tolerância aos estressores abióticos e bióticos (CARTEA et al., 2011; KOVINICH et al., 2015). Os kaempferóis são os flavonoides mais prevalentes na família Brassicaceae, atuando como fotoprotetores com alta capacidade antioxidante (PODSEDEK, 2007; AGATI; TATTINI, 2010).

Dentre os compostos que influenciaram na separação dos grupos foram identificados três ácidos orgânicos. O ácido málico apresenta íon precursor  $[M-H]^-$   $m/z$  133,0146 e fragmento de  $m/z$  115,0035  $[M-H_2O]^-$  (Figura 10 D). A concentração de ácido málico variou de  $1,98$  ( $15 \text{ kPa}/7 \text{ kJ m}^{-2}$ ) a  $3,05 \text{ mg g}^{-1}$  ( $75 \text{ kPa}/10 \text{ kJ m}^{-2}$ ), além disso, o cultivo sob aporte hídrico reduzido influenciou no acúmulo de ácido málico, como também a aplicação da dose de  $10 \text{ kJ m}^{-2}$  de UV-C (Tabela 3).

O íon precursor de  $[M-H]^-$   $m/z$  191,0201 foi encontrado nos tempos de retenção 1,9 e 2,7 e identificados como ácido cítrico ou isocítrico, com íon fragmento de  $m/z$  111,0089 devido à perda  $[M-H-CO_2-2H_2O]^-$  (Figura 10 E e 10 G). O cultivo sob baixas tensões de água promoveu um maior acúmulo de ácido cítrico e isocítrico nos brócolis independentemente da aplicação de UV-C (Tabela 3).

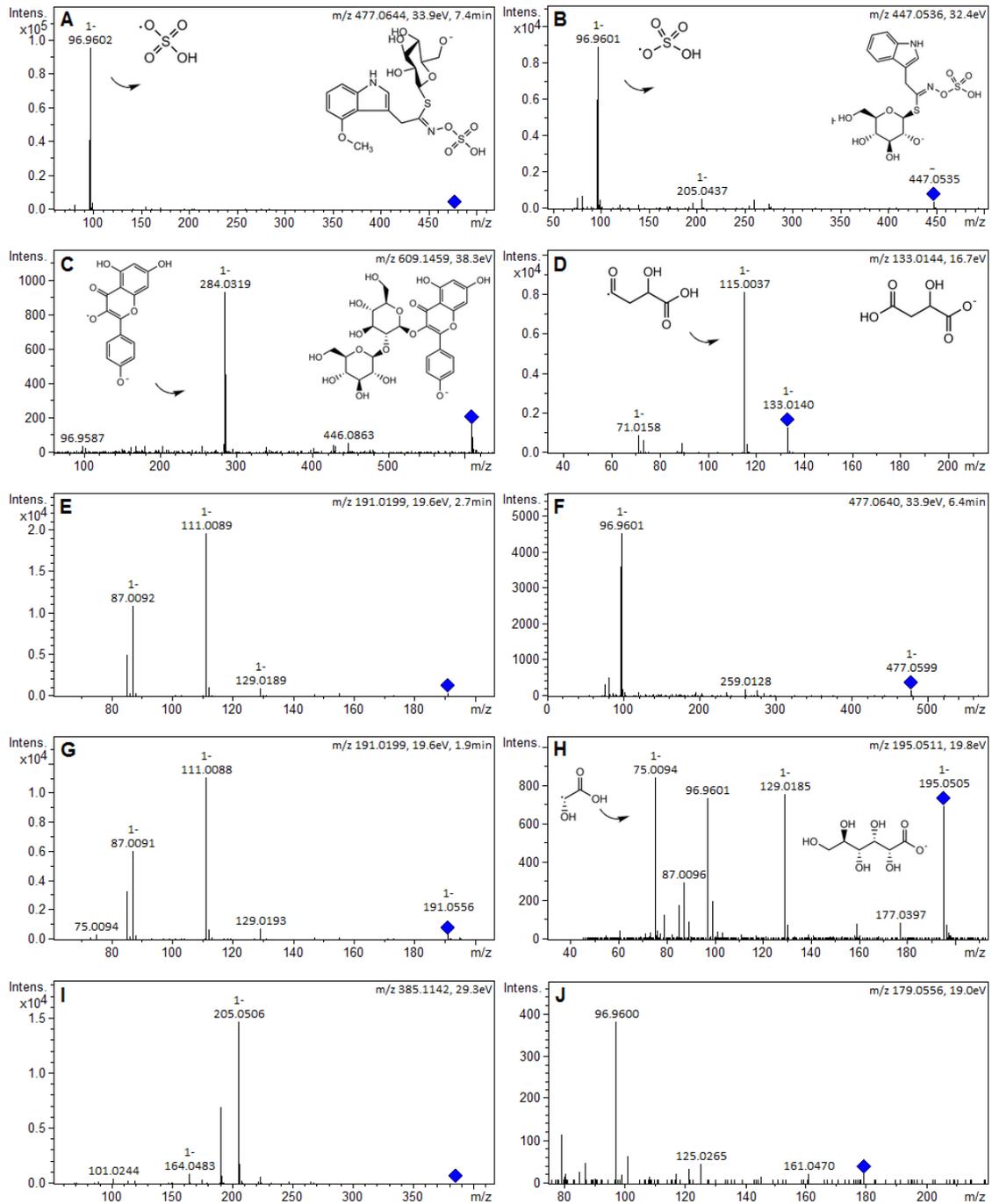


Figura 10 - Espectros de massas (MS/MS) dos 10 compostos discriminantes (derivados PLS-DA) a partir da análise do perfil de metabólitos dos brócolis tratados do experimento de 2014

O ácido cítrico e o málico são produzidos principalmente nas mitocôndrias através do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA). Os ácidos orgânicos são compostos importantes para o metabolismo das plantas, pois atuam na manutenção do equilíbrio redox, na produção e consumo de ATP, acidificação de espaços extracelulares, entre outras funções (AKHATOU et al., 2016; IGAMBERDIEV; EPRINTSEV, 2016).

Tabela 3 – Quantificação ( $\text{mg g}^{-1}$ ) dos 10 compostos discriminantes (PLS-DA VIP>1,5) do experimento de 2014.

		SUV-C	7 $\text{kJ m}^{-2}$	10 $\text{kJ m}^{-2}$
Neoglicobrassicina	15 kPa	1,97±0,01 <sup>Ab</sup>	3,09±0,01 <sup>Aa</sup>	1,25±0,01 <sup>Ac</sup>
	75 kPa	0,75±0,01 <sup>Bb</sup>	0,84±0,01 <sup>Ba</sup>	0,57±0,01 <sup>Bc</sup>
Glicobrassicina	15 kPa	1,49±0,01 <sup>Ab</sup>	1,88±0,01 <sup>Aa</sup>	0,92±0,00 <sup>Ac</sup>
	75 kPa	0,75±0,01 <sup>Ba</sup>	0,73±0,02 <sup>Ba</sup>	0,53±0,01 <sup>Bb</sup>
Kaempferol-3-O-soforosídeo	15 kPa	0,06±0,01 <sup>Bc</sup>	0,14±0,00 <sup>Ba</sup>	0,08±0,00 <sup>Bb</sup>
	75 kPa	0,19±0,00 <sup>Ac</sup>	0,20±0,00 <sup>Ab</sup>	0,55±0,00 <sup>Aa</sup>
Ácido málico	15 kPa	2,01±0,01 <sup>Bb</sup>	1,99±0,017 <sup>Bb</sup>	2,55±0,01 <sup>Ba</sup>
	75 kPa	2,44±0,02 <sup>Ab</sup>	2,31±0,02 <sup>Ac</sup>	3,06±0,03 <sup>Aa</sup>
Ácido cítrico/isocítrico (TR 2,74)	15 kPa	0,91±0,01 <sup>Bb</sup>	0,97±0,01 <sup>Aa</sup>	0,93±0,01 <sup>Bb</sup>
	75 kPa	1,18±0,00 <sup>Ab</sup>	1,07±0,05 <sup>Ac</sup>	1,45±0,01 <sup>Aa</sup>
L-gulose	15 kPa	0,50±0,00 <sup>Bb</sup>	0,49±0,00 <sup>Bb</sup>	0,64±0,01 <sup>Ba</sup>
	75 kPa	0,59±0,01 <sup>Ab</sup>	0,53±0,02 <sup>Ac</sup>	0,70±0,01 <sup>Aa</sup>
4-metoxiglicobrassicina	15 kPa	0,48±0,01 <sup>Ab</sup>	0,53±0,01 <sup>Aa</sup>	0,35±0,02 <sup>Ac</sup>
	75 kPa	0,29±0,01 <sup>Ba</sup>	0,26±0,01 <sup>Bb</sup>	0,22±0,00 <sup>Bc</sup>
Ácido glucônico	15 kPa	0,70±0,01 <sup>Bc</sup>	1,73±0,00 <sup>Aa</sup>	1,34±0,01 <sup>Ab</sup>
	75 kPa	1,44±0,01 <sup>Aa</sup>	1,12±0,03 <sup>Bb</sup>	1,39±0,00 <sup>Aa</sup>
Ácido cítrico/isocítrico (TR 1,9)	15 kPa	1,07±0,01 <sup>Bc</sup>	1,18±0,01 <sup>Aa</sup>	1,13±0,01 <sup>Bb</sup>
	75 kPa	1,29±0,00 <sup>Ab</sup>	1,23±0,04 <sup>Ab</sup>	1,60±0,01 <sup>Aa</sup>
1-O-sinapoi- $\beta$ -D-glicose	15 kPa	0,87±0,00 <sup>Aa</sup>	0,71±0,01 <sup>Ac</sup>	0,76±0,00 <sup>Ab</sup>
	75 kPa	0,72±0,00 <sup>Ba</sup>	0,62±0,02 <sup>Bb</sup>	0,76±0,00 <sup>Aa</sup>

Média±erro padrão (n=4); médias seguidas pela mesma letra maiúscula dentro da mesma coluna e letra minúscula dentro da mesma linha não diferiram pelo teste de Fischer ( $p \leq 0,05$ ). 15 kPa: aporte hídrico normal; 75 kPa: aporte hídrico reduzido; SUV-C: Sem UV-C; 7  $\text{kJ m}^{-2}$ : dose de 7  $\text{kJ m}^{-2}$  de UV-C; 10  $\text{kJ m}^{-2}$ : dose de 10  $\text{kJ m}^{-2}$  de UV-C.

Conforme as bases de dados o íon de  $[M-H]^-$   $m/z$  195,0513 foi identificado como ácido glucônico, com fragmento de  $m/z$  75,0094 (Figura 10 H). Nas amostras cultivadas sob aporte normal de água, o UV-C favoreceu o acúmulo, principalmente no tratamento 15 kPa/7 kJ m<sup>-2</sup> com maior conteúdo (1,73 mg g<sup>-1</sup>) enquanto no tratamento 15 kPa/SUV-C a menor concentração (0,70 mg g<sup>-1</sup>) (Tabela 3). O ácido glucônico é um ácido orgânico presente em plantas, proveniente da oxidação da glicose (RAMACHANDRAN et al., 2006).

Possivelmente o maior acúmulo de ácidos orgânicos nos brócolis cultivados sob aporte reduzido de água está relacionado com o ajustamento osmótico, um mecanismo de tolerância. A produção elevada de solutos orgânicos permite que as atividades celulares não sejam prejudicadas, de modo que o desenvolvimento e o crescimento ocorram normalmente (FAROOQ et al., 2009).

O composto de íon molecular  $[M-H]^-$   $m/z$  385,1138 com fragmento  $m/z$  164,0483  $[M-H-C_8H_{13}O_7]^-$  resultante da perda do CH<sub>3</sub> mais CO<sub>2</sub> a partir do ácido sinápico (Figura 10 I) foi identificado como 1-O-sinapoil-β-D-glicose. As amostras SEH/SUV-C apresentaram maior teor deste composto (0,87 mg g<sup>-1</sup>). Apesar da redução no aporte hídrico interferir negativamente no acúmulo deste metabolito, pode-se notar que a dose de 10 kJ m<sup>-2</sup> de UV-C contribuiu para a manutenção do conteúdo (Tabela 3). Na família Brassicacea os principais produtos finais da via dos fenilpropanoides são os ésteres de ácido sinápico (BOUCHEREAU et al., 1991; FRASER et al., 2007). Derivado do ácido hidroxicinâmico o 1-O-sinapoil-β-D-glicose é um metabolito influenciado pelas condições climáticas e pelo solo onde a planta é cultivada (KUMAR; ANDY, 2012).

A L-gulose apresentou o íon precursor  $[M-H]^-$   $m/z$  179,0556 e fragmento  $m/z$  96,9600 (Figura 10 J). A seca contribuiu para o acúmulo de gulose, independente da aplicação de UV-C. Em ambos tipos de cultivos, os tratamentos que receberam 10 kJ m<sup>-2</sup> de UV-C obtiveram maior conteúdo deste metabolito (Tabela 3). Apesar da gulose ser um monossacarídeo raro em plantas, estudos têm relatado que este composto pode ser um intermediário da síntese de ascorbato por uma via alternativa (DAVEY et al., 1999; WOLUCKA; MONTAGU, VAN, 2003). Ainda que a biossíntese derivada da gulose não esteja bem elucidada, esta via alternativa poderia servir para manter a síntese de ácido ascórbico em condições desfavoráveis à fotossíntese (WOLUCKA et al., 2005).

## 4.2.2 Experimento de 2015

Os metabólitos e a influência de cada composto (valores VIP > 1.5) na discriminação das amostras no experimento de 2015 estão apresentados na Figura 11, enquanto na Tabela 4 são apresentadas informações de identificação dos metabólitos que diferenciaram os tratamentos.

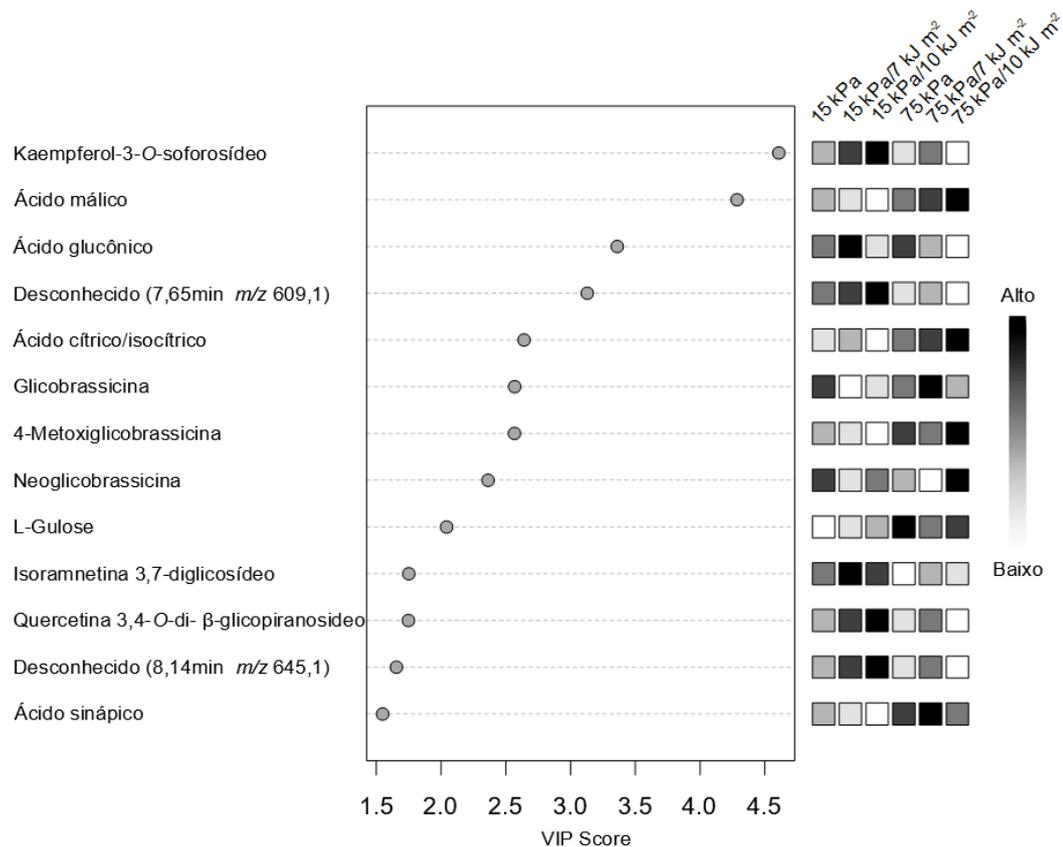


Figura 11 - Projeção de importância das variáveis (VIP scores), derivados do PLS-DA, a partir da análise do perfil de metabólitos dos brócolis tratados do experimento de 2015; Eixo Y (esquerdo) - são apresentados o nome de cada composto; Eixo Y (direito) - está representando a intensidade de cada composto nos diferentes tratamentos; Eixo X - pontuações do VIP.

O tratamento 15 kPa/7 kJ m<sup>-2</sup> apresentou maior intensidade para os compostos: kaempferol-3-O-soforosídeo, ácido glucônico, isoramnetina 3,7-diglicosídeo, quercetina 3,4-O-di-β-glicopiranosídeo e um composto desconhecido (pico 4). Já no tratamento 15 kPa/10 kJ m<sup>-2</sup> o composto em maior proporção não foi identificado (pico 12). Os brócolis cultivados com aporte de água reduzido (75 kPa/SUV-C) apresentaram maior intensidade para a L-gulose, enquanto nos brócolis cultivados sob baixo aporte hídrico com aplicação de 7 kJ m<sup>-2</sup> de radiação UV-C (75 kPa/7 kJ m<sup>-2</sup>) a glicobrassicina e o ácido sinápico apresentaram maiores intensidades. O teor de ácido málico, ácido cítrico/isocítrico, neoglicobrassicina e 4-

metoxiglicobrassicina foram maiores nos brócolis cultivados sob aporte hídrico reduzido e irradiados com 10 kJ m<sup>-2</sup> de UV-C (75 kPa/10 kJ m<sup>-2</sup>).

No cultivo de brócolis do ano de 2015, foram identificados três flavonoides glicosilados. A biossíntese de kaempferol-3-O-soforosídeo (Figura 12 A) estimulada pela radiação UV-C de 7 kJ m<sup>-2</sup>, de modo que dentre os tratamentos com brócolis cultivados em condições hídricas normais o tratamento 15 kPa/7 kJ m<sup>-2</sup> obteve o maior conteúdo (1,28 mg g<sup>-1</sup>), o mesmo foi observado dentre os tratamentos com brócolis cultivados sob aporte hídrico reduzido (Tabela 5). Outros fatores climáticos podem estar envolvidos no acúmulo de flavonoides. No ano de 2014, durante o desenvolvimento, os brócolis foram expostos a mais horas de frio e temperaturas mais baixas ( $\leq 7,2$  °C) que no ano de 2015 (dados não apresentados). Há relatos na literatura que baixas temperaturas influenciam no acúmulo de flavonoides (BILGER et al., 2007; BECKER et al., 2014). Possivelmente a ação concomitante da seca, baixas temperaturas e a radiação influenciaram na maior concentração de kaempferol-3-O-soforosídeo nas plantas cultivadas sob abastecimento de água reduzido.

A isoramnetina 3,7-diglicosídeo com íon molecular [M-H]<sup>-</sup> *m/z* 639,1565 e fragmento *m/z* 315,0523 (isoramnetina aglicona) (Figura 12 J) foi encontrada em quantidades mais elevadas em brócolis cultivados sem restrição hídrica. Contudo, a radiação favoreceu o aumento da concentração nos dois tipos de cultivo (Tabela 5).

O flavonoide de íon [M-H]<sup>-</sup> *m/z* 625,1413 e fragmentos *m/z* 300,0274 [quercetina-H]<sup>-</sup> e *m/z* 301,0344 (quercetina aglicona) foi identificado como quercetina 3,4-O-di-β-glicopiranosídeo (Figura 12 K). Assim como para os demais flavonoides detectados neste experimento, o seu acúmulo foi maior para os tratamentos 15 kPa/7 kJ m<sup>-2</sup> (0,22 mg g<sup>-1</sup>) e 15 kPa/10 kJ m<sup>-2</sup> (0,21 mg g<sup>-1</sup>) (Tabela 5). Hectors et al. (2014) destacam que a concentração de flavonoides quercetina e kaempferol glicosilados em *Arabidopsis* aumentou como resultado do estresse provocado pelo UV.

Tabela 4 - Identificação dos metabólitos responsáveis pela diferenciação entre os tratamentos pré e pós-colheita nos brócolis cultivados no ano de 2015

#	TR (min)	Massa experimental (m/z)	Massa teórica (m/z)	Erro (ppm)	Fórmula molecular [M-H] <sup>-</sup>	mSigma	Identidade do composto	Fragmentos MS <sup>2</sup>	VIP score
1	8,1	609,1469	609,1461	-1,3	C <sub>27</sub> H <sub>29</sub> O <sub>16</sub>	10,1	Kaempferol-3-O-soforosídeo	284,0330(100), 285,0389(39)	4,6
2	1,8	133,0140	133,0142	1,8	C <sub>4</sub> H <sub>5</sub> O <sub>5</sub>	7,5	Ácido málico	71,0145(7), 115,0039 (100)	4,3
3	1,7	195,0508	195,0510	1,1	C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> O <sub>7</sub>	3,1	Ácido glucônico	75,0090(100), 87,0090(36), 129,0187(68)	3,3
4	7,6	609,1465	609,1461	-0,6	C <sub>27</sub> H <sub>29</sub> O <sub>16</sub>	17,8	Desconhecido	283,0249(44), 446,0848(56), 609,1455(100)	3,1
5	2,7	191,0199	191,0211	-0,9	C <sub>6</sub> H <sub>7</sub> O <sub>7</sub>	13,8	Ácido cítrico/isocítrico	85,0296(28), 87,0090(52), 111,0088(100)	2,6
6	5,5	447,0534	447,0537	0,7	C <sub>16</sub> H <sub>19</sub> N <sub>2</sub> O <sub>9</sub> S <sub>2</sub>	20,7	Glicobrassicina	79,9577(10), 95,9524(65), 96,9603(100)	2,6
7	6,5	477,0645	477,0655	2,1	C <sub>17</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O <sub>10</sub> S <sub>2</sub>	7,5	4-Metoxiglicobrassicina	95,9524(77), 96,9603(100)	2,6
8	7,4	477,0648	477,0643	-1,1	C <sub>17</sub> H <sub>21</sub> N <sub>2</sub> O <sub>10</sub> S <sub>2</sub>	10,0	Neoglicobrassicina	95,9526(38), 96,9605(100)	2,3

Tabela 4 (continuação) - Identificação dos metabólitos responsáveis pela diferenciação entre os tratamentos pré e pós-colheita nos brócolis cultivados no ano de 2015

#	TR (min)	Massa experimental (m/z)	Massa teórica (m/z)	Erro (ppm)	Fórmula molecular	mSigma	Identidade do composto	Fragmentos MS <sup>2</sup>	VIP score
9	1,7	179,0557	179,0561	2,1	C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> O <sub>6</sub>	3,3	L-Gulose	78,9588(53), 96,595(100)	2,0
10	6,9	639,1565	639,1567	0,2	C <sub>28</sub> H <sub>31</sub> O <sub>17</sub>	14,8	Isoramnetina 3,7-diglicosídeo	96,9600(20), 313,0345(42), 315,0523(100)	1,7
11	7,6	625,1413	625,1410	-0,5	C <sub>27</sub> H <sub>29</sub> O <sub>17</sub>	7,1	Quercetina 3,4-O-di-β-glicopiranosídeo	300,0274(100), 301,0344(91), 463,0889(37)	1,7
12	8,1	645,1229	645,1228	-0,2	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub> [M+Cl] <sup>-</sup>	27,1	Desconhecido	284,0330(100), 285,0389(39), 429,0818(5), 609,1458(78)	1,6
13	9,0	223,0608	223,0612	0,4	C <sub>11</sub> H <sub>11</sub> O <sub>5</sub>	9,0	Ácido sinápico	149,0243(74), 164,0476(31), 193,0142(100), 208,0362(44)	1,5

TR: tempo de retenção; mSigma: similaridade entre o padrão isotópico teórico e o experimental. Quanto menor o valor de mSigma maior a similaridade entre o resultado experimental e o teórico esperado.

O aporte reduzido de água e a radiação UV-C podem gerar EROS que levam ao estresse oxidativo. Em geral, a síntese de flavonoides aumenta devido ao estresse oxidativo, pois estes compostos conferem atividade de remoção das EROs, devido aos diversos grupos hidroxila (KUMAR; PANDEY, 2013). A glicosilação dos flavonoides contribui para a estabilização da molécula, através da proteção dos grupos nucleofílicos reativos e aumenta a solubilidade em água (JONES; VOGT, 2001), permitindo o transporte destes metabólitos para diversos compartimentos, inclusive nos cloroplastos, onde as EROs são geradas. Nos cloroplastos, os flavonoides atuam na eliminação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, do radical hidroxila e do oxigênio singlete (PÉREZ-GREGORIO et al., 2011; BRUNETTI et al., 2013).

Sob condições severas de seca o estresse oxidativo pode ser agravado em virtude da menor difusão do CO<sub>2</sub> (FERDINANDO et al., 2012), ocasionando a redução ou inativação de enzimas antioxidantes nos cloroplastos, regulando positivamente a biossíntese dos flavonoides (MULLINEAUX; KARPINSKI, 2002; HATIER; GOULD, 2008; FINI et al., 2012).

Visto que os tratamentos realizados com brócolis cultivado sob baixo regime de água obtiveram menor acúmulo de flavonoides glicosilados, pressupõe-se que a redução no aporte de água aplicado neste estudo gerou um estresse nas plantas, diminuindo os componentes chaves do sistema antioxidante. De mesmo modo, a resposta em relação ao acúmulo dos flavonoides em plantas cultivadas sob estresse e submetidas à radiação UV-C, foi menor quando comparada a dos brócolis cultivados normalmente e irradiados. Nas plantas cultivadas sob tensões normais de água foi observado que ao receberem diferentes doses de radiação houve um estímulo no acúmulo de flavonoides, possivelmente porque o estresse foi menos agressivo, de modo que a síntese desses metabólitos complementou o papel desempenhado pelas enzimas antioxidantes (HATIER; GOULD, 2008; AGATI et al., 2009).

No experimento de 2015 os ácidos málico, cítrico e glucônico foram identificados como responsáveis pela discriminação dos tratamentos pré e pós-colheita. O teor de ácido málico (Figura 12 B) foi maior no cultivo sob aporte reduzido de água, sendo que o tratamento 75 kPa/10 kJ m<sup>-2</sup> apresentou o maior teor (2,41 mg g<sup>-1</sup>) e 15 kPa/SUV-C o menor (1,58 mg g<sup>-1</sup>). Além disso, a radiação teve efeito positivo sobre os diferentes cultivos (Tabela 5).

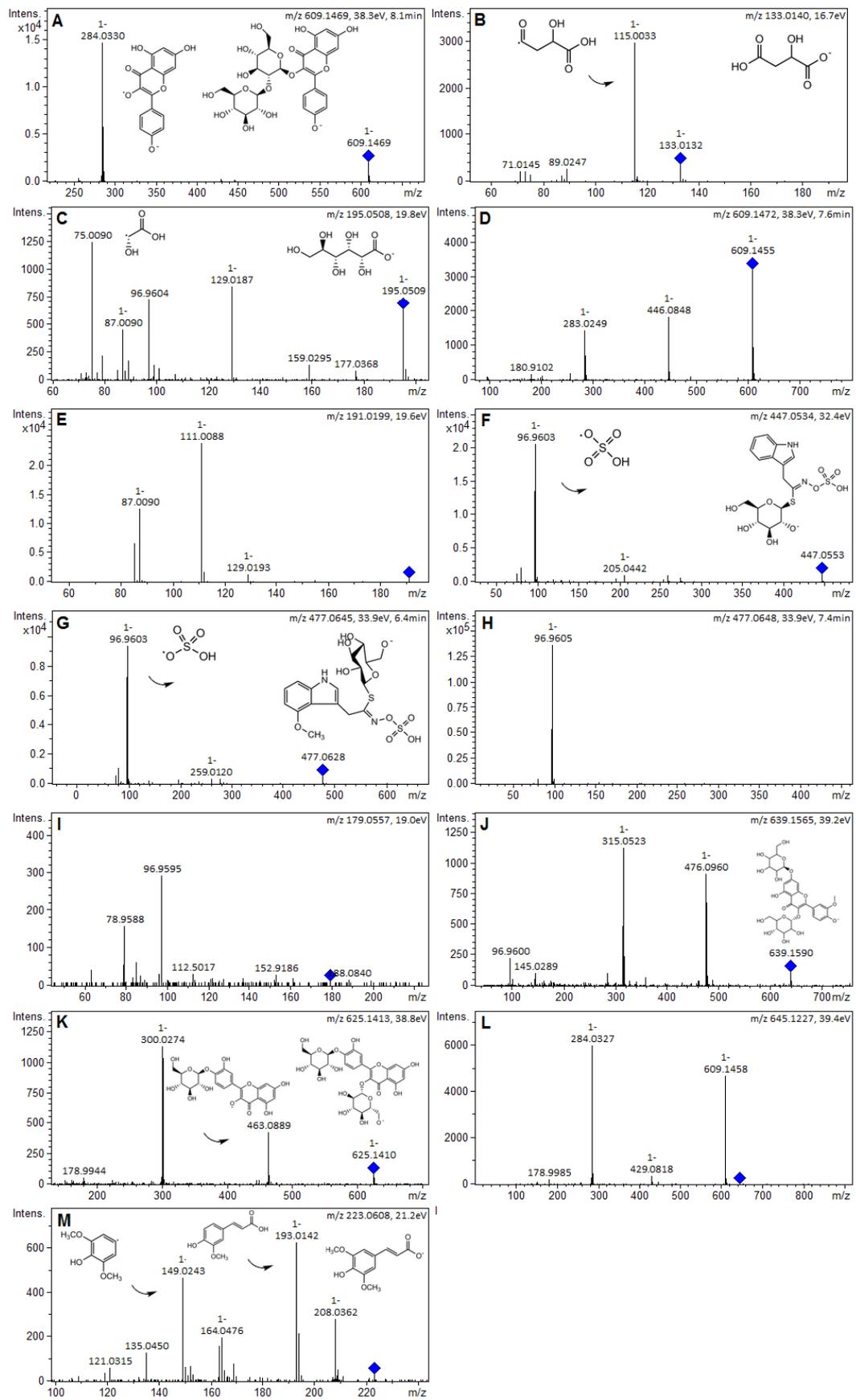


Figura 12 - Espectros de massas (MS/MS) dos 13 compostos discriminantes (derivados PLS-DA) a partir da análise do perfil de metabólitos dos brócolis tratados do experimento de 2015.

O ácido glucônico (Figura 12 C) não foi afetado pela redução no aporte hídrico, porém a radiação de  $7 \text{ kJ m}^{-2}$  de UV-C, favoreceu o aumento da concentração em ambos os cultivos (Tabela 5). O ácido cítrico/isocítrico (Figura 12 E) apresentou maior concentração no tratamento  $75 \text{ kPa}/10 \text{ kJ m}^{-2}$  ( $1,82 \text{ mg g}^{-1}$ ). Além disso a radiação UV-C teve efeito positivo sobre os diferentes cultivos (Tabela 5).

O metabólito glicobrassicina (Figura 12 F) foi encontrado em maior concentração nas amostras cultivadas sob aporte hídrico reduzido com aplicação de  $7 \text{ kJ m}^{-2}$  ( $3,01 \text{ mg g}^{-1}$ ) e  $10 \text{ kJ m}^{-2}$  de UV-C ( $2,74 \text{ mg g}^{-1}$ ), e em menor conteúdo no tratamento  $15 \text{ kPa}/7 \text{ kJ m}^{-2}$  ( $2,20 \text{ mg g}^{-1}$ ) (Tabela 5).

O teor de neoglicobrassicina (Figura 12 H) apresentou aumento considerável com aplicação de  $10 \text{ kJ m}^{-2}$  de UV-C, tanto no cultivo normal ( $4,08 \text{ mg g}^{-1}$ ) como sob aporte reduzido de água ( $5,61 \text{ mg g}^{-1}$ ). Porém no tratamento  $75 \text{ kPa}/7 \text{ kJ m}^{-2}$  foi observada a menor concentração ( $2,98 \text{ mg g}^{-1}$ ) (Tabela 5).

O composto 4-metoxiglicobrassicina (Figura 12 G) não foi influenciado pelo estresse pré colheita. Além disso, a aplicação de  $7 \text{ kJ m}^{-2}$  radiação UV-C não influenciou na concentração deste glicosinolato, independente do cultivo. Contudo, o tratamento  $75 \text{ kPa}/10 \text{ kJ m}^{-2}$  apresentou a maior concentração ( $0,77 \text{ mg g}^{-1}$ ) e  $15 \text{ kPa}/10 \text{ kJ m}^{-2}$  a menor ( $0,53 \text{ mg g}^{-1}$ ).

Neste estudo, se observou que as plantas cultivadas sob reduzido aporte hídrico e irradiadas com UV-C apresentam maior acúmulo dos glicosinolatos indólicos glicobrassicina e 4-metoxiglicobrassicina, este aumento pode estar associado à sinalização do ácido jasmônico, pois estes estresses geram o acúmulo de EROs, que estão envolvidas na transdução de sinal, sendo esta resposta semelhante ao ataque de herbívoros (TEXTOR; GERSHENZON, 2009).

O conteúdo de L-gulose (Figura 12 I) foi maior em brócolis cultivados sob aporte hídrico reduzido, independentemente da aplicação de UV-C. O tratamento  $75 \text{ kPa}/\text{SUV-C}$  apresentou a maior concentração ( $0,54 \text{ mg g}^{-1}$ ), enquanto  $15 \text{ kPa}/\text{SUV-C}$  teve a menor ( $0,40 \text{ mg g}^{-1}$ ) (Tabela 5). Os açúcares que acumulam em resposta a estressores abióticos podem atuar como osmólitos para manter o turgor das células, aumentando a resistência ao estresse hídrico (MEWIS et al., 2012a).

O pico com íon precursor  $[\text{M-H}]^-$   $m/z$  223,0612 e fragmento  $m/z$  208,0362 decorrente da perda de um grupamento metil, foi identificado como ácido sinápico.

Este metabólito influenciou principalmente na distinção do grupo cultivado sob reduzido aporte de água, visto que em brócolis cultivados em condições normais o teor deste composto foi aproximadamente 65 % menor. Os fenilpropanóides com maior capacidade de reduzir as EROs são sintetizados, especialmente, em resposta a estressores abióticos aplicados concomitantemente (AGATI; TATTINI, 2010; TATTINI et al., 2015). Os ésteres cafeico e sinápico são mencionados como moléculas que proporcionam maior proteção contra os danos induzidos por radiação UV-B do que os flavonoides (LANDRY et al., 1995; SHEAHAN, 1996). Demkura e Ballaré (2012) investigaram o papel de ácido sinápico na resistência induzida por UV-B à infecção por *Botrytis cinerea* e verificaram que, no mutante *tt4-1* (relacionado a expressão de chalcona sintetase), a radiação teve efeito significativo, interrompendo a infecção por *B. cinerea*. Contudo em mutantes deficientes em ácido 5-hidroxiferúlico (essencial para síntese de sinapato) o UV-B não teve efeito sobre a infecção. Assim, podemos perceber que a radiação UV atua sobre mecanismos de defesa relacionados aos derivados do ácido sinápico.

Tabela 5 - Quantificação (mg g<sup>-1</sup>) dos 13 compostos discriminantes (PLS-DA VIP>1,5) do experimento de 2015.

		SUV-C	7 kJ m <sup>-2</sup>	10 kJ m <sup>-2</sup>
Neoglicobrassicina	15 kPa	3,61±0,10 <sup>Ab</sup>	3,58±0,03 <sup>Ab</sup>	4,08±0,02 <sup>Ba</sup>
	75 kPa	3,27±0,02 <sup>Bb</sup>	2,99±0,028 <sup>Bc</sup>	5,62±0,04 <sup>Aa</sup>
Glicobrassicina	15 kPa	2,47±0,07 <sup>Aa</sup>	2,21±0,00 <sup>Bb</sup>	2,53±0,01 <sup>Ba</sup>
	75 kPa	2,21±0,07 <sup>Bc</sup>	3,01±0,03 <sup>Aa</sup>	2,74±0,04 <sup>Ab</sup>
Kaempferol-3-O-soforosídeo	15 kPa	0,75±0,02 <sup>Ab</sup>	1,29±0,01 <sup>Aa</sup>	1,26±0,00 <sup>Aa</sup>
	75 kPa	0,60±0,01 <sup>Bb</sup>	0,89±0,01 <sup>Ba</sup>	0,35±0,02 <sup>Bc</sup>
Ácido málico	15 kPa	1,59±0,04 <sup>Bc</sup>	1,99±0,04 <sup>Ba</sup>	1,84±0,024 <sup>Bb</sup>
	75 kPa	1,94±0,03 <sup>Ac</sup>	2,23±0,02 <sup>Ab</sup>	2,41±0,02 <sup>Aa</sup>
Ácido cítrico/isocítrico (TR 2,74)	15 kPa	1,30±0,04 <sup>Ac</sup>	1,72±0,01 <sup>Aa</sup>	1,48±0,00 <sup>Bb</sup>
	75 kPa	1,29±0,04 <sup>Ac</sup>	1,60±0,02 <sup>Bb</sup>	1,82±0,03 <sup>Aa</sup>
L-gulose	15 kPa	0,40±0,01 <sup>Bb</sup>	0,46±0,01 <sup>Ba</sup>	0,46±0,00 <sup>Ba</sup>
	75 kPa	0,54±0,01 <sup>Aa</sup>	0,53±0,01 <sup>Aa</sup>	0,53±0,01 <sup>Aa</sup>
4-metoxiglicobrassicina	15 kPa	0,58±0,02 <sup>Aa</sup>	0,59±0,01 <sup>Aa</sup>	0,53±0,00 <sup>Bb</sup>
	75 kPa	0,60±0,02 <sup>Ab</sup>	0,65±0,01 <sup>Ab</sup>	0,77±0,00 <sup>Aa</sup>
Ácido glucônico	15 kPa	2,72±0,07 <sup>Ac</sup>	3,44±0,02 <sup>Aa</sup>	3,12±0,02 <sup>Ab</sup>
	75 kPa	2,85±0,04 <sup>Ab</sup>	3,07±0,03 <sup>Ba</sup>	2,68±0,03 <sup>Bc</sup>
Desconhecido (m/z 609)	15 kPa	0,28±0,01 <sup>Ac</sup>	0,50±0,00 <sup>Aa</sup>	0,48±0,00 <sup>Ab</sup>
	75 kPa	0,22±0,00 <sup>Bb</sup>	0,36±0,00 <sup>Ba</sup>	0,14±0,00 <sup>Bc</sup>
Isoramnetina 3,7-diglicosídeo	15 kPa	0,15±0,00 <sup>Ac</sup>	0,22±0,00 <sup>Aa</sup>	0,18±0,00 <sup>Ab</sup>
	75 kPa	0,09±0,00 <sup>Bb</sup>	0,11±0,00 <sup>Ba</sup>	0,11±0,00 <sup>Ba</sup>
Quercetina 3,4-O-di-β-glicopiranosídeo	15 kPa	0,13±0,00 <sup>Ac</sup>	0,22±0,00 <sup>Aa</sup>	0,21±0,00 <sup>Ab</sup>
	75 kPa	0,09±0,00 <sup>Bb</sup>	0,16±0,00 <sup>Ba</sup>	0,06±0,00 <sup>Bc</sup>
Desconhecido (m/z 645)	15 kPa	0,12±0,00 <sup>Ab</sup>	0,18±0,00 <sup>Aa</sup>	0,18±0,00 <sup>Aa</sup>
	75 kPa	0,09±0,00 <sup>Bb</sup>	0,13±0,00 <sup>Ba</sup>	0,05±0,00 <sup>Bc</sup>
Ácido sinápico	15 kPa	0,08±0,00 <sup>Ba</sup>	0,08±0,00 <sup>Ba</sup>	0,07±0,00 <sup>Bb</sup>
	75 kPa	0,13±0,00 <sup>Ab</sup>	0,15±0,00 <sup>Aa</sup>	0,13±0,00 <sup>Ab</sup>

Média±erro padrão (n=4); médias seguidas pela mesma letra maiúscula dentro da mesma coluna e letra minúscula dentro da mesma linha não diferiram pelo teste de Fischer ( $p \leq 0,05$ ). 15 kPa: aporte hídrico normal; 75 kPa: aporte hídrico reduzido; SUV-C: Sem UV-C; 7 kJ m<sup>-2</sup>: dose de 7 kJ m<sup>-2</sup> de UV-C; 10 kJ m<sup>-2</sup>: dose de 10 kJ m<sup>-2</sup> de UV-C.

Os compostos com  $[M-H]^-$   $m/z$  609,1461 ( $C_{27}H_{29}O_{16}$ ) e  $[M+Cl]^-$   $m/z$  645,1229 ( $C_{27}H_{29}O_{16}$ ) não foram identificados. Contudo os metabólitos de  $m/z$  609,1461 e  $m/z$  645,1229 contribuíram para a diferenciação dos tratamentos 15 kPa/7 kJ m<sup>-2</sup> e 15 kPa/10 kJ m<sup>-2</sup>.

### 4.3 Atividade enzimática

Ao analisar separadamente os experimentos de 2014 e 2015, devido a interação significativa entre os fatores ano x estressor em pré-colheita x estressor em pós-colheita, todas atividades enzimáticas apresentaram interação significativa entre o estressor em pré-colheita x estressor em pós-colheita, exceto a SOD do experimento de 2015.

A tensão de água utilizada para o cultivo de brócolis não influenciou na atividade da APX nos tratamentos sem aplicação de UV-C, em ambos os anos. No entanto, a atividade de APX em brócolis tratados com UV-C e cultivados sob diferentes suprimentos de água variou de um ano para o outro. Em 2014, o brócolis cultivado sob condições normais de água e tratado com 7 kJ m<sup>-2</sup> UV-C teve a atividade da APX mais elevada do que o brócolis cultivado sob reduzido abastecimento de água. Os cultivos sob diferentes fornecimentos de água e que receberam 10 kJ m<sup>-2</sup> de UV-C apresentaram a mesma atividade da APX. Em 2015, a atividade da APX foi maior no brócolis cultivado sob aporte de água reduzido e que recebeu 10 kJ m<sup>-2</sup> de UV-C quando comparado ao tratamento 15 kPa/10 kJ m<sup>-2</sup>. Os brócolis cultivados sob diferentes fornecimentos de água e que receberam 7 kJ m<sup>-2</sup> de UV-C apresentam a mesma atividade (Tabela 6).

Em brócolis irrigados normalmente, em ambos os anos de experimento, a atividade APX foi maior no tratamento que recebeu 7 kJ m<sup>-2</sup> quando comparados com o controle e com o tratamento irradiado com 10 kJ m<sup>-2</sup> de UV-C, que não variaram entre si (Tabela 6). No brócolis cultivado com redução no aporte de água a resposta da atividade da APX a aplicação de 7 kJ m<sup>-2</sup> foi oposta, obtendo menor atividade. A exposição à radiação UV-C pode ter induzido a produção de EROs e conseqüentemente aumentado o teor de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, que foi eliminado pela APX e pelo sistema antioxidante não enzimático, visto que os tratamentos irradiados com UV-C apresentaram maior acúmulo destes metabólitos.

O cultivo sob aporte reduzido de água e a aplicação de UV-C influenciaram de forma distinta a atividade da CAT nos dois anos de cultivo. Em 2014 o tratamento 75 kPa/SUV-C teve maior atividade enzimática quando comparado ao controle, contudo o brócolis cultivado sob aporte normal de água e irradiado com  $7 \text{ kJ m}^{-2}$  de UV-C apresentou maior atividade em relação ao tratamento 75 kPa/ $7 \text{ kJ m}^{-2}$ . Já entre os tratamentos que receberam  $10 \text{ kJ m}^{-2}$  não houve diferença entre os tipos de cultivos. Em 2015 a atividade da CAT foi menor para o cultivo sob seca quando comparado ao controle, em ambos tratamentos de UV-C. Dentre os tratamentos com irrigação normal, o que recebeu  $10 \text{ kJ m}^{-2}$  de UV-C apresentou menor atividade. Entre os dois anos de cultivo, a atividade da CAT foi maior no tratamento 15 kPa/ $7 \text{ kJ m}^{-2}$  quando comparado com o controle e o irradiado com  $10 \text{ kJ m}^{-2}$  (Tabela 6). A CAT tem baixa afinidade pelo  $\text{H}_2\text{O}_2$ , ou seja, somente em altas concentrações ela é ativa, assim, em estresse leve ou moderado o  $\text{H}_2\text{O}_2$  é eliminado pela APX e por outras enzimas antioxidantes (GECHEV et al., 2006; JALEEL et al., 2009), isto pode justificar a maior atividade da APX comparado com a CAT.

Nos dois anos de cultivo a redução no aporte de água influenciou negativamente na atividade da enzima POD, além disso, os brócolis irradiados com UV-C que receberam diferentes tensões de água, tiveram atividade variável entre os anos. No ano de 2014, o brócolis cultivado sob tensão de água normal apresentou maior atividade, entretanto a aplicação de diferentes doses de radiação UV-C não influenciou na atividade da POD. No cultivo sob aporte reduzido de água o tratamento que não recebeu radiação apresentou atividade mais elevada comparado aos que receberam doses de  $7$  e  $10 \text{ kJ m}^{-2}$ . Em 2015, no tratamento 15 kPa/ $10 \text{ kJ m}^{-2}$  a atividade enzimática foi menor que nos tratamentos 15 kPa/SUV-C e 15 kPa/ $7 \text{ kJ m}^{-2}$ , dentre os tratamentos cultivados sob aporte hídrico reduzido a resposta foi contrária, sendo que o tratamento 75 kPa/ $10 \text{ kJ m}^{-2}$  apresentou maior atividade (Tabela 6).

A atividade enzimática da PPO, foi influenciada pelo estresse pré e pós-colheita de modo distinto entre os anos de cultivo. Em 2014, brócolis cultivados sob aporte reduzido de água apresentaram atividade mais elevada que o controle, além disso no tratamento 75 kPa/ $10 \text{ kJ m}^{-2}$  a atividade foi inalterada. Porém os brócolis tratados com 15 kPa/ $7 \text{ kJ m}^{-2}$  apresentaram maior atividade que os tratados com 75 kPa/ $7 \text{ kJ m}^{-2}$ . No ano de 2015, a atividade da PPO foi maior nos tratamentos cultivados sob aporte normal de água, independente da dose de UV. Brócolis do

tratamento 75 kPa/10 kJ m<sup>-2</sup> apresentaram maior atividade em relação aos dos tratamentos 75 kPa/SUV-C e 75 kPa/7 kJ m<sup>-2</sup>, contudo não diferiram dos brócolis cultivado sob aporte hídrico normal irradiados com 10 kJ m<sup>-2</sup> (Tabela 6). É relatado que o aumento da atividade de PPO em plantas pode estar relacionado a adaptação a estressores abiótico, especificamente com o acúmulo de EROs (THIPYAPONG et al., 2004; MAYER, 2006; WEBB et al., 2013).

Tabela 6 - Atividade das enzimas ascorbato peroxidase (APX), catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), peroxidase (POD) e polifenoloxidase (PPO) nos brócolis cultivados no ano de 2014 e 2015.

			SUV-C	7 kJ m <sup>-2</sup>	10 kJ m <sup>-2</sup>
APX	2014	15 kPa	0,6±0,1 <sup>Ab</sup>	0,9±0,0 <sup>Aa</sup>	0,7±0,0 <sup>Ab</sup>
		75 kPa	0,6±0,0 <sup>Ab</sup>	0,4±0,1 <sup>Bc</sup>	0,7±0,1 <sup>Aa</sup>
	2015	15 kPa	0,2±0,0 <sup>Ab</sup>	0,3±0,0 <sup>Aa</sup>	0,2±0,0 <sup>Bb</sup>
		75 kPa	0,3±0,0 <sup>Ab</sup>	0,2±0,0 <sup>Ac</sup>	0,4±0,0 <sup>Aa</sup>
CAT	2014	15 kPa	6,6±1,0 <sup>Bb</sup>	31,9±4,7 <sup>Aa</sup>	10,2±0,2 <sup>Ab</sup>
		75 kPa	14,5±0,3 <sup>Aa</sup>	10,2±0,0 <sup>Bc</sup>	13,2±0,0 <sup>Ab</sup>
	2015	15 kPa	6,9±1,3 <sup>Aa</sup>	6,7±0,8 <sup>Aa</sup>	4,3±0,3 <sup>Ab</sup>
		75 kPa	4,5±0,6 <sup>Ba</sup>	3,9±1,0 <sup>Ba</sup>	4,10±0,73 <sup>Aa</sup>
POD	2014	15 kPa	2100,8±154,9 <sup>Aa</sup>	2208,9±48,8 <sup>Aa</sup>	1912,9±97,8 <sup>Aa</sup>
		75 kPa	820,0±73,3 <sup>Ba</sup>	269,0±22,3 <sup>Bb</sup>	259,5±16,0 <sup>Bb</sup>
	2015	15 kPa	3801,8±103,8 <sup>Aa</sup>	3690,1±313,5 <sup>Aa</sup>	198,2±3,1 <sup>Ab</sup>
		75 kPa	38,7±5,0 <sup>Bc</sup>	90,4±3,3 <sup>Bb</sup>	469,3±20,2 <sup>Aa</sup>
PPO	2014	15 kPa	157,4±4,6 <sup>Bab</sup>	172,2±2,4 <sup>Aa</sup>	144,2±7,8 <sup>Bb</sup>
		75 kPa	184,2±7,3 <sup>Aa</sup>	119,7±5,9 <sup>Bb</sup>	168,3±5,5 <sup>Aa</sup>
	2015	15 kPa	453,7±6,3 <sup>Aa</sup>	457,4±18,4 <sup>Aa</sup>	476,6±6,6 <sup>Aa</sup>
		75 kPa	392,1±18,0 <sup>Bb</sup>	338,0±20,7 <sup>Bb</sup>	461,7±16,0 <sup>Aa</sup>
SOD	2014	15 kPa	4,1±0,3 <sup>Aa</sup>	3,3±0,2 <sup>Aab</sup>	2,9±0,2 <sup>Ab</sup>
		75 kPa	0,5±0,1 <sup>Ba</sup>	0,2±0,0 <sup>Bb</sup>	0,5±0,1 <sup>Ba</sup>

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula dentro da mesma coluna e letra minúscula dentro da mesma linha para cada variável em cada ano de cultivo não diferiram pelo teste de Fischer ( $p \leq 0,05$ ). 15 kPa: aporte hídrico normal; 75 kPa: aporte hídrico reduzido; SUV-C: Sem UV-C; 7 kJ m<sup>-2</sup>: dose de 7 kJ m<sup>-2</sup> de UV-C; 10 kJ m<sup>-2</sup>: dose de 10 kJ m<sup>-2</sup> de UV-C.

APX expressa em  $\mu\text{mol ascorbato min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  proteína

CAT expressa em  $\text{nmol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  proteína

SOD, PPO, e POD expressa em Unidade de Atividade Enzimática (UAE)  $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  proteína.

No ano de 2014, a atividade da SOD foi maior nas plantas cultivadas sob condições hídricas normais, de modo que a limitação deste recurso influenciou na atividade desta enzima. Os tratamentos irradiados com UV-C contribuíram para a diminuição da atividade da SOD conforme o aumento das doses de radiação no cultivo normal (Tabela 6). Em 2015, foi observado que o cultivo sob aporte hídrico reduzido não teve diferença do cultivo sob aporte normal de água para a enzima SOD. Assim, verificou-se que a aplicação de 10 kJ m<sup>-2</sup> de radiação UV-C influenciou na maior atividade da SOD (Tabela 7). Chairat et al. (2013) observaram que a atividade da SOD não aumentou após a exposição à radiação UV-C em *Brassica oleraceae* L. var. alboglabra.

Tabela 7 – Atividade da superóxido dismutase (SOD) em brócolis cultivado em 2015.

	SOD
15 kPa	0,9±0,1 <sup>a</sup>
75 kPa	0,9±0,0 <sup>a</sup>
SUV-C	0,9±0,0 <sup>b</sup>
7 kJ m <sup>-2</sup>	1,0±0,0 <sup>b</sup>
10 kJ m <sup>-2</sup>	1,2±0,0 <sup>a</sup>

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferiram pelo teste de Fischer ( $p \leq 0.05$ ). 15 kPa: aporte hídrico normal; 75 kPa: aporte hídrico reduzido; SUV-C: Sem UV-C; 7 kJ m<sup>-2</sup>: dose de 7 kJ m<sup>-2</sup> de UV-C; 10 kJ m<sup>-2</sup>: dose de 10 kJ m<sup>-2</sup> de UV-C. SOD expressa em Unidade de Atividade Enzimática (UAE) min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> proteína

Ao avaliar a interação entre os fatores pré e pós-colheita no ano de 2015, foi observado que o cultivo sob baixo aporte hídrico não teve diferença do cultivo sob aporte normal de água para a enzima SOD. Assim, verificou-se que a aplicação de 10 kJ m<sup>-2</sup> de radiação UV-C influenciou na maior atividade da SOD.

#### 4.4 Expressão gênica

De acordo com os resultados mostrados na Figura 13 A<sub>1</sub>, os genes 3-aminotransferase de aminoácidos de cadeia ramificada (*BCAT3*), triptofano N-mono-oxigenase 2 (*CYP79B3*), glutamato-cisteína ligase (*GSH1*), glutaniona S-transferase F10 (*GSTF10*) e mirosinase 1 (*TGG1*), tiveram sua expressão aumentada em resposta à aplicação de UV-B em *Arabidopsis thaliana*. As radiações UV-B e UV-C,

apresentam comprimentos de onda curtos e são potencialmente prejudiciais às células, ocasionando danos no DNA (NAWKAR et al., 2013). Esta semelhança possibilita a prospecção da atuação dos mesmos genes em *Arabidopsis* e, possivelmente, em brócolis.

O gene *GSH1* é responsável pela ligação peptídica entre o glutamato e a cisteína, formando a  $\gamma$ -glutamilcisteína e posteriormente glutatona. A glutatona atua na biossíntese de glicosinolatos como doador de enxofre (BEDNAREK et al., 2009; SHU et al., 2011). *BCAT3* é responsável pelo alongamento da cadeia de metionina na via de biossíntese de glicosinolatos alifáticos. Segundo Schuster et al. (2006), as aminotransferases (*BCAT*), mostram maiores níveis de expressão em plantas expostas à luz que as mantidas no escuro.

Na Figura 13 B, os genes destacados em vermelho apresentam regulação diferencial ( $p \leq 0,05$ ) em resposta ao estresse hídrico e a radiação UV-B em *Arabidopsis thaliana*. Os genes glutatona S-transferase F11 (*GSTF11*), sulfotransferase 17 (*SOT17*) e triptofano N-mono-oxigenase 1 (*CYP79B2*), relacionados a biossíntese do núcleo dos glicosinolatos, tiveram maior expressão transcricional em plantas irradiadas. A sulfotransferase *SOT17* apresentou maior acúmulo transcricional durante período de luz (KLEIN et al., 2006), bem como o gene *CYP79B2* em *Arabidopsis* (HUSEBY et al. 2013). A conversão do triptofano em indol-3-ylacetalcoxima (IAOx) pelo citocromo *CYP79B3* em floretes de brócolis foi afetada após a exposição à radiação UV-C, sendo que a expressão relativa deste gene aumentou com a aplicação de 1,2 e 3 kJ m<sup>-2</sup> (SIERRA, 2015). Além dos glicosinolatos indólicos, os IAOx são precursores do ácido indol-3-acético e de fitoalexinas em *Arabidopsis*. A camalexina é uma fitoalexina presente em vegetais do gênero *Brassica* e são sintetizadas através de IAOx por homólogos de *CYP79B*. Assim como os glicosinolatos, estes compostos são produzidos em resposta a infecção por diversos microrganismos (GLAWISCHNIG et al., 2004; NAFISI et al., 2007). Contudo, foi demonstrado a partir de mutantes (deficientes em fatores de transcrição MYB) que o acúmulo destes compostos também é induzido por UV (FRERIGMANN et al., 2015). A partir destas evidências podemos inferir que o acúmulo de genes *CYP79B* está relacionado com a defesa contra fatores estresses abióticos e bióticos, induzindo tanto a síntese de glicosinolatos indólicos como de fitoalexinas.

Em *Arabidopsis thaliana* cultivada sob condições de estresse hídrico, foi observado que os níveis de transcritos dos genes *IMDH1*, *BCAT3*, *TGG1* e *TGG2* foram aumentados (Figura 13 A<sub>2</sub>). Estudos têm evidenciado que a degradação de glicosinolatos está associada à regulação da sinalização celular em resposta ao estresse abiótico, pois a mirosinase *TGG1* está presente em células de guarda estomática em altas concentrações, regulando a abertura e fechamento dos estômatos (ZHAO et al., 2008; ISLAM et al., 2009). Urano et al. (2009) verificaram que o gene *BCAT2* é induzido em resposta à desidratação em *Arabidopsis*. Em resposta a seca, foi observado que o gene *CYP79B3*, envolvido na síntese do núcleo dos glicosinolatos, e flavina monooxigenase GS-OX2 (*FMOGS-OX2*), relacionado com a modificação da cadeia lateral destes compostos, apresentaram regulação diferencial (p-value < 0,05) (Figura 13 B). O ácido jasmônico é um fitohormônio que desempenha funções relevantes em respostas à tolerância aumentada ao ataque de insetos e agentes patogênicos (WASTERACK; HAUSE, 2013). Mas tem sido relatado o envolvimento deste hormônio na tolerância aos estressores abióticos como a seca (RIEMANN et al., 2015), regulando a biossíntese de glicosinolatos (DOUGHTY et al., 1995; BRADER et al., 2001; MIKKELSEN et al., 2003; DOMBRECHT et al., 2007). A aplicação exógena de ácido jasmônico influenciou no acúmulo de glicosinolatos indólicos (GUO et al., 2013) e a expressão dos genes *CYP79B2/3* foi positivamente regulada em vegetais do gênero *Brassica* (MIKKELSEN et al., 2003; WIESNER et al., 2013). Assim tem-se como hipótese que a seca é sinalizada pelo ácido jasmônico, regulando a via de biossíntese dos glicosinolatos indólicos.

Como mencionado anteriormente, os dados de expressão apresentados na Figura 13 (A e B), foram avaliados em *Arabidopsis*. A partir destas evidências presume-se que os estresses por seca e UV interferem na expressão de genes de síntese de glicosinolatos e conseqüentemente no seu acúmulo, pois os brócolis cultivados sob estresse hídrico e irradiados apresentaram maior teor de glicosinolatos indólicos (BEDNAREK et al., 2011).

Com a finalidade de estudar o perfil transcricional dos genes envolvidos na biossíntese e na degradação de glicosinolatos em brócolis, foi realizado um estudo da expressão mediante RT-qPCR para os genes *PEN2* e *FMO-OX2*.

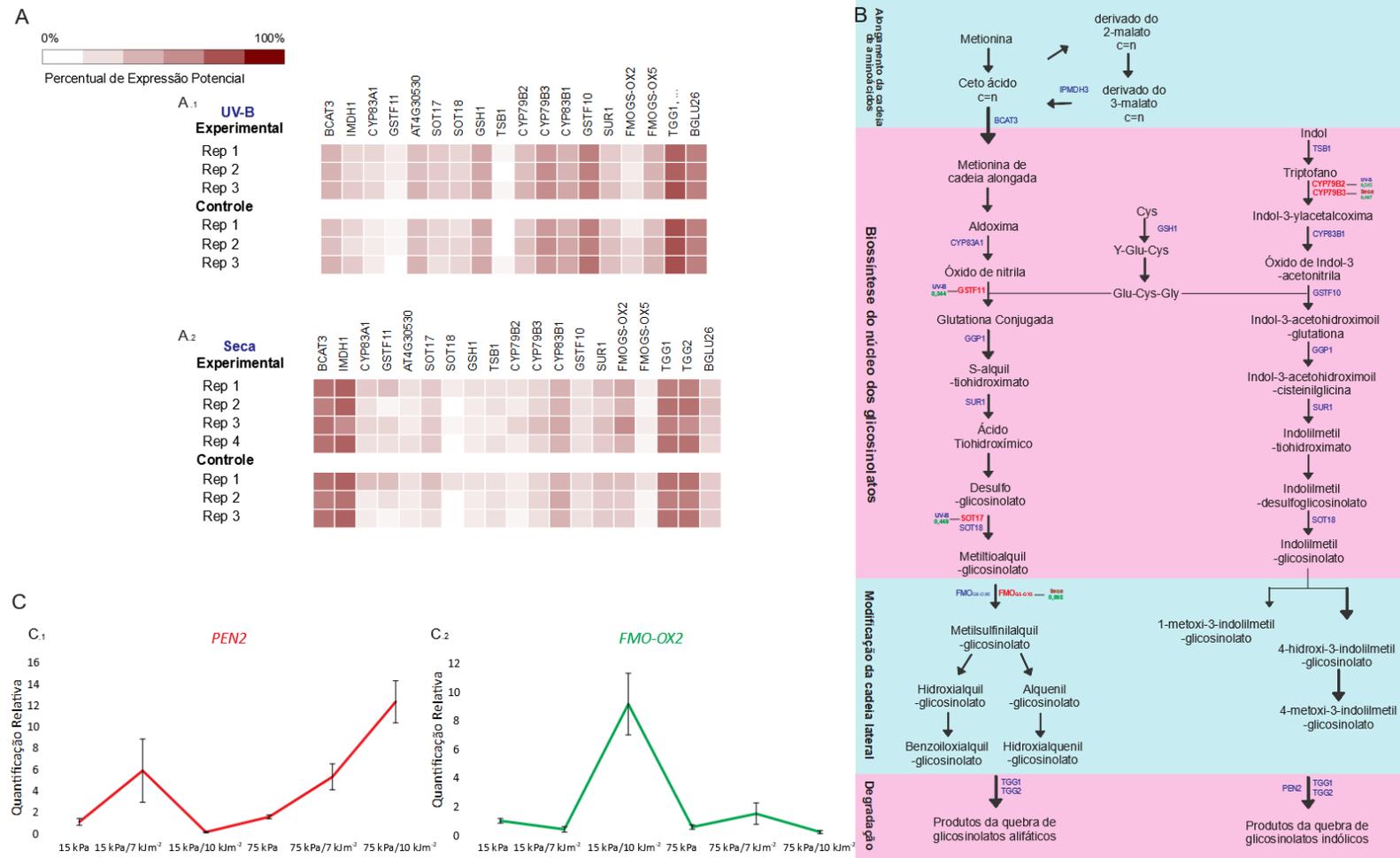


Figura 13 - Análise da expressão transcricional de genes da rota de síntese e degradação de glicosinolatos. A. Visão detalhada dos dados de expressão destes genes independente dos valores de *p*-value (valores de expressão absoluta); B. Rota de síntese e degradação dos glicosinolatos com valores expressão diferencial (log<sub>2</sub>-ratio), obtidos a partir da meta-análise, de genes com *p*-value < 0,05 (destacados em vermelho); C. Dados de RT-qPCR dos genes *PEN2* e *FMO-OX2* para os tratamentos 15 kPa/SUV-C (aporte hídrico normal), 15 kPa/7 kJ m<sup>-2</sup> (aporte hídrico normal irradiado com 7 kJ m<sup>-2</sup> UV-C), 15 kPa/10 kJ m<sup>-2</sup> (aporte hídrico normal irradiado com 10 kJ m<sup>-2</sup> UV-C), 75 kPa/SUV-C (aporte hídrico reduzido), 75 kPa/7 kJ m<sup>-2</sup> (aporte hídrico reduzido irradiado com 7 kJ m<sup>-2</sup> UV-C), 75 kPa/10 kJ m<sup>-2</sup> (aporte hídrico reduzido irradiado com 10 kJ m<sup>-2</sup> UV-C); as barras de erro representam desvios em termos de Erro Padrão - EP.

De acordo com os resultados mostrados na Figura 13 C as plantas cultivadas sob aporte hídrico reduzido e tratadas com radiação UV-C, apresentaram um estímulo da expressão transcricional do gene *PEN2*. No cultivo sob condições normais de irrigação a radiação de  $7 \text{ kJ m}^{-2}$  estimulou a expressão da mirosinase *PEN2*, contudo a dose de  $10 \text{ kJ m}^{-2}$  restringiu a expressão. Possivelmente, as plantas cultivadas sob baixas tensões de água se aclimataram ao estresse, de modo que ao serem tratadas com UV-C a expressão da *PEN2* foi ativada. Já as plantas com aporte hídrico normal, não expressando genes relacionados com aclimação, ao receberem doses elevadas de radiação, podem ter sofrido peroxidação lipídica, ruptura das membranas celulares, além de danos no DNA e proteínas (CIVELLO et al., 2006). *PEN2* é uma mirosinase atípica envolvida na degradação de glicosinolatos indólicos. Estudos têm estabelecido que o sistema glicosinolatos indólicos/mirosinase-PEN2 constitui um importante mecanismo de defesa que restringe a invasão de patógenos em *Arabidopsis*, pois a maior concentração de produtos de hidrólises dos glicosinolatos poderia levar à inibição da entrada dos íons K para dentro das células guardas, impedindo a perda de água pelo fechamento estomático (ZHAO et al., 2008). Isto é evidenciado pelo estudo Khokon et al. (2011) que observaram que a aplicação exógena de alil-isotiocianato em folhas de *Arabidopsis thaliana* induz o fechamento dos estômatos. Além disso, a defesa frente a agentes estressores bióticos pode ser regulada pelo ácido jasmônico, o qual ativa os fatores de transcrição e expressão dos genes responsáveis pela síntese de glicosinolatos indólicos (HALKIER; GERSHENZON, 2006). Contudo, a partir dos dados de quantificação relativa de transcritos envolvidos na rota dos glicosinolatos em floretes de brócolis cultivados sob aporte hídrico reduzido e irradiados com UV-C, se pode notar que a degradação dos glicosinolatos indólicos foi induzida, indicando semelhanças entre as respostas a estressores bióticos e abióticos (SIERRA, 2015).

Se pode notar na Figura 13 C que a expressão do gene *FMOGS-OX2* no tratamento  $15 \text{ kPa}/10 \text{ kJ m}^{-2}$  aumentou quase 10 vezes em relação ao tratamento  $15 \text{ kPa}/\text{SUV-C}$ . Os genes *FMOGS-OX* são importantes na síntese de glicosinolatos alifáticos, pois catalisam a S-oxigenação na conversão de metiltioalquil-glicosinolato em metilsulfinaalquil-glicosinolato. Estes genes além de atuar na modificação da cadeia lateral dos glicosinolatos, influenciam na atividade dos seus produtos de hidrólise (HANSEN et al., 2007; LI et al., 2008). A radiação UV ativa uma variedade

de respostas de defesa que podem ser mediadas por moléculas como EROs, etileno, jasmonatos, ácido salicílico, entre outros. Estes compostos podem induzir respostas protetoras como a síntese de glicosinolatos (WANG et al., 2011). Assim como a síntese de glicosinolatos indólicos parece ser induzida pelo ácido jasmônico, possivelmente este hormônio induza genes relacionados aos glicosinolatos alifáticos, pois estudos realizados em *Brassica oleracea* L. var. capitata, mostraram que a aplicação exógena de metil jasmonato regulou positivamente os genes *FMOGS-OX* (YI et al., 2016).

## 5 Considerações finais

A partir deste estudo foi possível verificar que o metabolismo do brócolis é afetado pelo cultivo sob aporte hídrico reduzido e pela aplicação de radiação UV-C. A redução do aporte hídrico promoveu um aumento no teor de ácidos orgânicos. Já a aplicação de radiação UV-C não só incrementou o teor de glicosinolatos e flavonoides glicosilados, como também ativou o sistema enzimático antioxidante e regulou positivamente a expressão do gene *FMOGS-OX2* relacionado a via de biossíntese dos glicosinolatos alifáticos. A redução do aporte hídrico combinada a radiação UV-C teve efeito positivo no acúmulo de transcritos relacionados com a degradação de glicosinolatos (*PEN2*).

Estes resultados mostram que a aplicação de radiação UV-C pode ser uma estratégia para aumentar o conteúdo de compostos do metabolismo especializado.

## Referências

AGATI, G.; STEFANO, G.; BIRICOLTI, S.; TATTINI, M. Mesophyll distribution of “antioxidant” flavonoid glycosides in *Ligustrum vulgare* leaves under contrasting sunlight irradiance. **Annals of Botany**, v. 104, n. 5, p. 853–861, 2009.

AGATI, G.; TATTINI, M. Multiple functional roles of flavonoids in photoprotection. **New Phytologist**, v. 186, n. 4, p. 786–793, 2010.

AGERBIRK, N.; OLSEN, C. E. Glucosinolate structures in evolution. **Phytochemistry**, v. 77, p. 16–45, 2012.

AHMED, F.; FANNING, K.; NETZEL, M.; SCHENK, P. M. Induced carotenoid accumulation in *Dunaliella salina* and *Tetraselmis suecica* by plant hormones and UV-C radiation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 22, p. 9407–9416, 2015.

AKARACHANTACHOTE, N.; CHADCHAM, S.; SAITHANU, K. Cutoff threshold of variable importance in projection for variable selection. **International Journal Pure and Applied Mathematics**, v. 94, n. 3, p. 307–322, 2014.

AKHATOU, I.; GONZÁLEZ-DOMÍNGUEZ, R.; FERNÁNDEZ-RECAMALES, Á. Investigation of the effect of genotype and agronomic conditions on metabolomic profiles of selected strawberry cultivars with different sensitivity to environmental stress. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 101, p. 14–22, 2016.

ALEXIEVA, V.; SERGIEV, I.; MAPELLI, S.; KARANOV, E. The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. **Plant, Cell and Environment**, v. 24, n. 12, p. 1337–1344, 2001.

ALVAREZ-JUBETE, L.; VALVERDE, J.; KEHOE, K.; REILLY, K.; RAI, D. K.; BARRY-RYAN, C. Development of a novel functional soup rich in bioactive sulforaphane using broccoli (*Brassica oleracea* L. ssp. *italica*) florets and byproducts. **Food and Bioprocess Technology**, v. 7, n. 5, p. 1310–1321, 2014.

ANJUM, S.; XIE, X.; WANG, L. Morphological, physiological and biochemical responses of plants to drought stress. **African Journal of Agricultural Research**, v. 6, n. 9, p. 2026–2032, 2011. 71

APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annual Review of Plant Biology**, v. 55, n. 1, p. 373–399, 2004.

ARAUS, J. L. Plant breeding and drought in C3 cereals: what should we breed for? **Annals of Botany**, v. 89, n. 7, p. 925–940, 2002.

ARES, A. M.; NOZAL, M. J.; BERNAL, J. Extraction, chemical characterization and biological activity determination of broccoli health promoting compounds. **Journal of Chromatography A**, v. 1313, p. 78–95, 2013.

ARES, A. M.; NOZAL, M. J.; BERNAL, J. L.; BERNAL, J. effect of temperature and light exposure on the detection of total intact glucosinolate content by LC-ESI-MS in broccoli leaves. **Food Analytical Methods**, v. 7, n. 8, p. 1687–1692, 2014.

ASADA, K. Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. **Plant Physiology**, v. 141, n. 2, p. 391–396, 2006.

ASHRAF, M.; AKRAM, N. A.; AL-QURAINY, F.; FOOLAD, M. R. Drought tolerance: roles of organic osmolytes, growth regulators, and mineral nutrients. In: **Advances in Agronomy**. 1.ed. Academic Press, 2011, p.249–296.

ATKINSON, N. J.; URWIN, P. E. The interaction of plant biotic and abiotic stresses: from genes to the field. **Journal of Experimental Botany**, v. 63, n. 10, p. 3523–3543, 2012.

AUGUSTINE, R.; ARYA, G. C.; NAMBIAR, D. M.; KUMAR, R.; BISHT, N. C. Translational genomics in Brassica crops: challenges, progress, and future prospects. **Plant Biotechnology Reports**, v. 8, n. 2, p. 65–81, 2014.

AVRAMOVA, V.; ABDELGAWAD, H.; ZHANG, Z.; FOTSCHKI, B.; CASADEVALL, R.; VERGAUWEN, L.; KNAPEN, D.; TALEISNIK, E.; GUISEZ, Y.; ASARD, H.; BEEMSTER, G. T. S. Drought induces distinct growth response, protection, and recovery mechanisms in the maize leaf growth zone. **Plant Physiology**, v. 169, n. 2, p. 1382–1396, 2015.

BACHIEGA, P.; SALGADO, J. M.; CARVALHO, J. E. DE; RUIZ, A. L. T. G.; SCHWARZ, K.; TEZOTTO, T.; MORZELLE, M. C. Antioxidant and antiproliferative activities in different maturation stages of broccoli (*Brassica oleracea* Italica) biofortified with selenium. **Food Chemistry**, v. 190, p. 771–776, 2016.

BECKER, C.; KLAERING, H.-P.; KROH, L. W.; KRUMBEIN, A. Cool-cultivated red leaf lettuce accumulates cyanidin-3-O-(6"-O-malonyl)-glucoside and caffeoylmalic acid. **Food Chemistry**, v. 146, p. 404–411, 2014.

BEDNAREK, P.; PIŚLEWSKA-BEDNAREK, M.; LOREN VAN THEMAAT, E. VER; MADDULA, R. K.; SVATOŠ, A.; SCHULZE-LEFERT, P. Conservation and clade-

specific diversification of pathogen-inducible tryptophan and indole glucosinolate metabolism in *Arabidopsis thaliana* relatives. **New Phytologist**, v. 192, n. 3, p. 713–726, 2011.

BEDNAREK, P.; PISLEWSKA-BEDNAREK, M.; SVATOS, A.; SCHNEIDER, B.; DOUBSKY, J.; MANSUROVA, M.; HUMPHRY, M.; CONSONNI, C.; PANSTRUGA, R.; SANCHEZ-VALLET, A.; MOLINA, A.; SCHULZE-LEFERT, P. A Glucosinolate metabolism pathway in living plant cells mediates broad-spectrum antifungal defense. **Science**, v. 323, n. 5910, p. 101–106, 2009.

BHANDARI, S. R.; KWAK, J.-H. Seasonal variation in phytochemicals and antioxidant activities in different tissues of various broccoli cultivars. **African Journal Biotechnology**, v. 13, p. 604–615, 2014.

BHANDARI, S. R.; KWAK, J.-H. Chemical composition and antioxidant activity in different tissues of brassica vegetables. **Molecules**, v. 20, p. 1228–1243, 2015.

BHATTACHARJEE, P.; SINGHAL, R. S. Asparagus, broccoli, and cauliflower: production, quality, and processing. In: **Handbook of Vegetables and Vegetable Processing**, Oxford, UK: Wiley-Blackwell, 2010, p. 505-523.

BILGER, W.; ROLLAND, M.; NYBAKKEN, L. UV screening in higher plants induced by low temperature in the absence of UV-B radiation. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 6, n. 2, p. 190, 2007.

BOUCHEREAU, A.; HAMELIN, J.; LAMOUR, I.; RENARD, M.; LARHER, F. Distribution of sinapine and related compounds in seeds of Brassica and allied genera. **Phytochemistry**, v. 30, n. 6, p. 1873–1881, 1991.

BRADER, G.; TAS, É.; PALVA, E. T. jasmonate-dependent induction of indole glucosinolates in *Arabidopsis* by culture filtrates of the nonspecific pathogen *Erwinia carotovora*. **Plant Physiology**, v. 126, n. 2, p. 849–860, 2001. 73

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. 7, p. 248–254, 1976.

BRUNETTI, C.; FERDINANDO, M. DI; FINI, A.; POLLASTRI, S.; TATTINI, M. Flavonoids as antioxidants and developmental regulators: relative significance in plants and humans. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 2, p. 3540–3555, 2013.

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.

CARTEA, M. E.; FRANCISCO, M.; SOENGAS, P.; VELASCO, P. Phenolic compounds in Brassica vegetables. **Molecules**, v. 16, n. 1, p. 251–280, 2011.

CHAIRAT, B.; NUTTHACHAI, P.; VARIT, S. Effect of UV-C treatment on chlorophyll degradation, antioxidant enzyme activities and senescence in Chinese kale (*Brassica oleracea* var. alboglabra). **International Food Research Journal**, v. 20, n. 2, p. 623–628, 2013.

CHANCE, B.; MAEHLI, A. C. Assay of catalases and peroxidases. **Methods in Enzymology**, v. 2, p. 764–775, 1955.

CHIU, Y. C. **QTL Mapping of Flavonoid and Phenolic Acid Variation in Broccoli**. 2015. 149 f. Thesis (Master of Science) – Horticultural Science, North Carolina State University, Raleigh, 2015.

CIVELLO, P. M.; VICENTE, A. R.; MARTÍNEZ, G. A. UV-C Technology to control postharvest diseases of fruits and vegetables. In: **Recent advances in alternative postharvest technologies to control fungal diseases in fruits and vegetables**. Transworld Research Network, 2006.

CLAUW, P.; COPPENS, F.; BEUF, K. DE; DHONDT, S.; DAELE, T. VAN; MALEUX, K.; STORME, V.; CLEMENT, L.; GONZALEZ, N.; INZÉ, D. Leaf responses to mild drought stress in natural variants of arabidopsis. **Plant Physiology**, v. 167, n. 3, p. 800–816, 2015.

CLAY, N. K.; ADIO, A. M.; DENOUX, C.; JANDER, G.; AUSUBEL, F. M. Glucosinolate metabolites required for an arabidopsis innate immune response. **Science**, v. 323, n. 5910, p. 95–101, 2009. 74

COPOLOVICI, L.; KÄNNASTE, A.; REMMEL, T.; NIINEMETS, Ü. Volatile organic compound emissions from *Alnus glutinosa* under interacting drought and herbivory stresses. **Environmental and Experimental Botany**, v. 100, p. 55–63, 2014.

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, n. 2, p. 204–210, 2006.

CRAMER, G. R.; URANO, K.; DELROT, S.; PEZZOTTI, M.; SHINOZAKI, K. Effects of abiotic stress on plants: a systems biology perspective. **BMC Plant Biology**, v. 11, n. 1, p. 163, 2011.

CROZIER, A.; JAGANATH, I. B.; CLIFFORD, M. N. Phenols, polyphenols and tannins: An overview. In: **Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet**. Oxford, UK: Blackwell Publishing, 2006, p.1–24.

D'AUTRÉAUX, B.; TOLEDANO, M. B. ROS as signaling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 8, n. 10, p. 813–824, 2007.

DAVEY, M. W.; GILOT, C.; PERSIAU, G.; ØSTERGAARD, J.; HAN, Y.; BAUW, G. C.; MONTAGU, M. C. VAN. Ascorbate biosynthesis in Arabidopsis cell suspension culture. **Plant Physiology**, v. 121, n. 2, p. 535–544, 1999.

DEMKURA, P. V; BALLARÉ, C. L. UVR8 mediates UV-B-induced Arabidopsis defense responses against *Botrytis cinerea* by controlling sinapate accumulation. **Molecular Plant**, v. 5, n. 3, p. 642–652, 2012.

DE VOS, R. C. H. DE; MOCO, S.; LOMMEN, A.; KEURENTJES, J. J. B.; BINO, R. J.; HALL, R. D. Untargeted large-scale plant metabolomics using liquid chromatography coupled to mass spectrometry. **Nature Protocols**, v. 2, n. 4, p. 778–91, 2007.

DOMBRECHT, B.; XUE, G. P.; SPRAGUE, S. J.; KIRKEGAARD, J. A.; ROSS, J. J.; REID, J. B.; FITT, G. P.; SEWELAM, N.; SCHENK, P. M.; MANNERS, J. M.; KAZAN, K. MYC2 Differentially modulates diverse jasmonate-dependent functions in Arabidopsis. **The Plant Cell**, v. 19, n. 7, p. 2225–2245, 2007.

DOUGHTY, K. J.; KIDDLE, G. A.; PYE, B. J.; WALLSGROVE, R. M.; PICKETT, J. A. Selective induction of glucosinolates in oilseed rape leaves by methyl jasmonate. **Phytochemistry**, v. 38, n. 2, p. 347–350, 1995. 75

EICHHOLZ, I.; ROHN, S.; GAMM, A.; BEESK, N.; HERPPICH, W. B.; KROH, L. W.; ULRICHS, C.; HUYSKENS-KEIL, S. UV-B-mediated flavonoid synthesis in white asparagus (*Asparagus officinalis* L.). **Food Research International**, v. 48, n. 1, p. 196–201, 2012.

FAOSTAT (Food and Agriculture Organization of the United Nations - Statistics Division). Production/ crops: Cabbages and other brassicas. Available in: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>. Access in: 01/12/2016.

FARHOUDI, R.; HUSSAIN, M.; LEE, D.-J. Modulation of enzymatic antioxidants improves the salinity resistance in canola (*Brassica napus*). **International Journal of Agriculture and Biology**, v. 14, n. 3, p. 465–468, 2012.

FAROOQ, M.; WAHID, A.; BASRA, N. K. D. F. S. M. A.; FUJITA, N. K. D.; PLANT, S. M. A. B. Plant drought stress : effects , mechanisms and management To cite this version : Review article. **Agronomy for Sustainable Development, Springer Verlag (Germany)**, v. 29, n. 1, p. 185–212, 2009.

FAVORY, J.-J.; STEC, A.; GRUBER, H.; RIZZINI, L.; ORAVECZ, A.; FUNK, M.; ALBERT, A.; CLOIX, C.; JENKINS, G. I.; OAKELEY, E. J.; SEIDLITZ, H. K.; NAGY, F.; ULM, R. Interaction of COP1 and UVR8 regulates UV-B-induced photomorphogenesis and stress acclimation in *Arabidopsis*. **The EMBO Journal**, v. 28, n. 5, p. 591–601, 2009.

FERDINANDO, M. DI; BRUNETTI, C.; FINI, A.; TATTIN, M. Flavonoids as antioxidants in plants under abiotic stresses. In: **Abiotic stress responses in plants: metabolism, productivity and sustainability**. New York, NY: Springer New York, 2012, p.159–179.

FINI, A.; GUIDI, L.; FERRINI, F.; BRUNETTI, C.; FERDINANDO, M. DI; BIRICOLTI, S.; POLLASTRI, S.; CALAMAI, L.; TATTINI, M. Drought stress has contrasting effects on antioxidant enzymes activity and phenylpropanoid biosynthesis in *Fraxinus ornus* leaves: An excess light stress affair? **Journal of Plant Physiology**, v. 169, n. 10, p. 929–939, 2012.

FOYER, C. H.; FLETCHER, J. M. Plant antioxidants: colour me healthy. **Biologist**, v. 48, n. 3, p. 115–120, 2001.

FRAIRE-VELÁZQUEZ, S.; BALDERAS-HERNÁNDEZ, V. E. Abiotic stress in plants and metabolic responses. **Abiotic Stress - Plant Responses and Applications in Agriculture**, p. 25–48, 2013.

FRASER, C. M.; THOMPSON, M. G.; SHIRLEY, A. M.; RALPH, J.; SCHOENHERR, J. A.; SINLAPADECH, T.; HALL, M. C.; CHAPPLE, C. Related *Arabidopsis* serine carboxypeptidase-like sinapoylglucose acyltransferases display distinct but overlapping substrate specificities. **Plant Physiology**, v. 144, n. 4, p. 1986–1999, 2007.

FRERIGMANN, H.; GLAWISCHNIG, E.; GIGOLASHVILI, T. The role of MYB34, MYB51 and MYB122 in the regulation of camalexin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, p. 654, 2015.

GAO, J.; YU, X.; MA, F.; LI, J. RNA-Seq analysis of transcriptome and glucosinolate metabolism in seeds and sprouts of broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*). **PLoS ONE**, v. 9, n. 2, p. e88804, 2014.

GECHEV, T. S.; BREUSEGEM, F. VAN; STONE, J. M.; DENEV, I.; LALOI, C. Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death. **BioEssays**, v. 28, n. 11, p. 1091–1101, 2006.

GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Superoxide dismutases. **Annual review of biochemistry**, v. 44, p. 147–159, 1975.

GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Superoxide Dismutases: I. Occurrence in Higher Plants. *Plant Physiology*, v. 59, n. 2, p. 309–314, 1977.

GILL, S. S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 48, n. 12, p. 909–930, 2010.

GLAWISCHNIG, E.; HANSEN, B. G.; OLSEN, C. E.; HALKIER, B. A. Camalexin is synthesized from indole-3-acetaldoxime, a key branching point between primary and secondary metabolism in *Arabidopsis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 21, p. 8245–8250, 2004.

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, n. 1, p. 146–153, 2012.

GUO, R.; SHEN, W.; QIAN, H.; ZHANG, M.; LIU, L.; WANG, Q. Jasmonic acid and glucose synergistically modulate the accumulation of glucosinolates in *77Arabidopsis thaliana*. **Journal of Experimental Botany**, v. 64, n. 18, p. 5707–5719, 2013.

HALKIER, B. A.; GERSHENZON, J. Biology and biochemistry of glucosinolates. **Annual Review of Plant Biology**, v. 57, n. 1, p. 303–333, 2006.

HANSEN, B. G.; KLIEBENSTEIN, D. J.; HALKIER, B. A. Identification of a flavin-monooxygenase as the S-oxygenating enzyme in aliphatic glucosinolate biosynthesis in *Arabidopsis*. **The Plant Journal**, v. 50, n. 5, p. 902–910, 2007.

HATIER, J.-H. B.; GOULD, K. S. Foliar anthocyanins as modulators of stress signals. **Journal of Theoretical Biology**, v. 253, n. 3, p. 625–627, 2008.

HECTORS, K.; OEVELEN, S. VAN; GEUNS, J.; GUISEZ, Y.; JANSEN, M. A. K.; PRINSEN, E. Dynamic changes in plant secondary metabolites during UV acclimation in *Arabidopsis thaliana*. **Physiologia Plantarum**, v. 152, n. 2, p. 219–230, 2014.

HEIMLER, D.; VIGNOLINI, P.; DINI, M. G.; VINCIERI, F. F.; ROMANI, A. Antiradical activity and polyphenol composition of local Brassicaceae edible varieties. **Food Chemistry**, v. 99, n. 3, p. 464–469, 2006.

HIRAGA, S. A large family of class III plant peroxidases. **Plant and Cell Physiology**, v. 42, n. 5, p. 462–468, 2001.

HOLOPAINEN, J. K.; GERSHENZON, J. Multiple stress factors and the emission of plant VOCs. **Trends in Plant Science**, v. 15, n. 3, p. 176–184, 2010.

HRUZ, T.; LAULE, O.; SZABO, G.; WESSENDORP, F.; BLEULER, S.; OERTLE, L.; WIDMAYER, P.; GRUISSEM, W.; ZIMMERMANN, P. Genevestigator V3: a reference expression database for the meta-analysis of transcriptomes. **Advances in Bioinformatics**, v. 2008, p. 420747, 2008.

HUSEBY, S.; KOPRIVOVA, A.; LEE, B.-R.; SAHA, S.; MITHEN, R.; WOLD, A.-B.; BENGTSSON, G. B.; KOPRIVA, S. Diurnal and light regulation of sulphur assimilation and glucosinolate biosynthesis in *Arabidopsis*. **Journal of Experimental Botany**, v. 64, n. 4, p. 1039–1048, 2013. 78

IGAMBERDIEV, A. U.; EPRINTSEV, A. T. Organic acids: the pools of fixed carbon involved in redox regulation and energy balance in higher plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, 2016.

ISLAM, M. M.; TANI, C.; WATANABE-SUGIMOTO, M.; URAJI, M.; JAHAN, M. S.; MASUDA, C.; NAKAMURA, Y.; MORI, I. C.; MURATA, Y. Myrosinases, TGG1 and TGG2, redundantly function in ABA and MeJA signaling in *Arabidopsis* guard cells. **Plant and Cell Physiology**, v. 50, n. 6, p. 1171–1175, 2009.

JALEEL, C. A.; RIADH, K.; GOPI, R.; MANIVANNAN, P.; INÈS, J.; AL-JUBURI, H. J.; CHANG-XING, Z.; HONG-BO, S.; PANNEERSELVAM, R. Antioxidant defense responses: physiological plasticity in higher plants under abiotic constraints. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 31, n. 3, p. 427–436, 2009.

JIANG, T.; JAHANGIR, M. M.; JIANG, Z.; LU, X.; YING, T. Influence of UV-C treatment on antioxidant capacity, antioxidant enzyme activity and texture of postharvest shiitake (*Lentinus edodes*) mushrooms during storage. **Postharvest Biology and Technology**, v. 56, n. 3, p. 209–215, 2010.

JOGAIAH, S.; GOVIND, S. R.; TRAN, L.-S. P. Systems biology-based approaches toward understanding drought tolerance in food crops. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 33, n. 1, p. 23–39, 2013.

JONES, P.; VOGT, T. Glycosyltransferases in secondary plant metabolism: tranquilizers and stimulant controllers. **Planta**, v. 213, n. 2, p. 164–174, 2001.

KARYOTOU, K.; DONALDSON, R. P. Ascorbate peroxidase, a scavenger of hydrogen peroxide in glyoxysomal membranes. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 434, n. 2, p. 248–257, 2005.

KHAN, M. A. M.; ULRICHS, C.; MEWIS, I. Influence of water stress on the glucosinolate profile of *Brassica oleracea* var. *italica* and the performance of *Brevicoryne brassicae* and *Myzus persicae*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 137, n. 3, p. 229–236, 2010.

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-Angewandte Botanik**, 2011. 79

KHOKON, M. A. R.; JAHAN, M. 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 & Environment**, v. 34, n. 11, p. 1900–1906, 2011.

KLEIN, M.; REICHEL, M.; GERSHENZON, J.; PAPENBROCK, J. The three desulfoglucosinolate sulfotransferase proteins in Arabidopsis have different substrate specificities and are differentially expressed. **FEBS Journal**, v. 273, n. 1, p. 122–136, 2006.

KOROLEVA, O. A.; GIBSON, T. M.; CRAMER, R.; STAIN, C. Glucosinolate-accumulating S-cells in Arabidopsis leaves and flower stalks undergo programmed cell death at early stages of differentiation. **The Plant Journal**, v. 64, n. 3, p. 456–469, 2010.

KOSMA, D. K.; BOURDENX, B.; BERNARD, A.; PARSONS, E. P.; LU, S.; JOUBES, J.; JENKS, M. A. The impact of water deficiency on leaf cuticle lipids of Arabidopsis. **Plant Physiology**, v. 151, n. 4, p. 1918–1929, 2009.

KOVINICH, N.; KAYANJA, G.; CHANOCA, A.; OTEGUI, M. S.; GROTEWOLD, E. Abiotic stresses induce different localizations of anthocyanins in Arabidopsis. **Plant Signaling & Behavior**, v. 10, n. 7, p. e1027850, 2015.

KOWALSKI, W. **Ultraviolet Germicidal Irradiation Handbook**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2009.

KROLL, J.; RAWEL, H. M. Reactions of plant phenols with myoglobin: influence of chemical structure of the phenolic compounds. **Journal of Food Science**, v. 66, n. 1, p. 48–58, 2001.

KUMAR, S.; ANDY, A. Minireview health promoting bioactive phytochemicals from brassica. **International Food Research Journal**, v. 19, n. 1, p. 141–152, 2012.

KUMAR, S.; PANDEY, A. K. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. **The Scientific World Journal**, v. 2013, p. 1–16, 2013.

KUMAR, V. B. A.; MOHAN, T. C. K.; MURUGAN, K. Purification and kinetic characterization of polyphenol oxidase from Barbados cherry (*Malpighia glabra* L.). **Food Chemistry**, v. 110, n. 2, p. 328–333, 2008. 80

LANDRY, L. G.; CHAPPLE, C. C.; LAST, R. L. Arabidopsis mutants lacking phenolic sunscreens exhibit enhanced ultraviolet-B injury and oxidative damage. **Plant Physiology**, v. 109, n. 4, p. 1159–1166, 1995.

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

LEMOINE, M. L.; CHAVES, A. R.; MARTÍNEZ, G. A. Influence of combined hot air and UV-C treatment on the antioxidant system of minimally processed broccoli (*Brassica oleracea* L. var. Italica). **LWT - Food Science and Technology**, v. 43, n. 9, p. 1313–1319, 2010.

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* L. var. Italica). **Postharvest Biology and Technology**, v. 48, n. 1, p. 15–21, 2008.

LI, D.; LUO, Z.; MOU, W.; WANG, Y.; YING, T.; MAO, L. ABA and UV-C effects on quality, antioxidant capacity and anthocyanin contents of strawberry fruit (*Fragaria ananassa* Duch.). **Postharvest Biology and Technology**, v. 90, p. 56–62, 2014.

LI, G.; WAN, S.; ZHOU, J.; YANG, Z.; QIN, P. Leaf chlorophyll fluorescence, hyperspectral reflectance, pigments content, malondialdehyde and proline accumulation responses of castor bean (*Ricinus communis* L.) seedlings to salt stress levels. **Industrial Crops and Products**, v. 31, n. 1, p. 13–19, 2010.

LI, J.; HANSEN, B. G.; OBER, J. A.; KLIEBENSTEIN, D. J.; HALKIER, B. A. Subclade of flavin-monooxygenases involved in aliphatic glucosinolate biosynthesis. **Plant Physiology**, v. 148, n. 3, p. 1721–1733, 2008.

LUKENS, L.; ZOU, F.; LYDIATE, D.; PARKIN, I.; OSBORN, T. Comparison of a *Brassica oleracea* genetic map with the genome of *Arabidopsis thaliana*. **Genetics**, v. 164, n. 1, p. 359–372, 2003.

MAHARAJ, R. Effects of abiotic stress (UV-C) induced activation of phytochemicals on the postharvest quality of horticultural crops. In: **Phytochemicals - Isolation, Characterisation and Role in Human Health**. InTech, 2015, p.221–244. 81

MARTÍNEZ-BALLESTA, M. DEL C.; MORENO, D. A.; CARVAJAL, M. The physiological importance of glucosinolate on plant response to abiotic stress in Brassica. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 6, p.11607-11625, 2013.

MARTÍNEZ-HERNÁNDEZ, G. B.; GÓMEZ, P. A.; GARCÍA-TALAVERA, N. V.; ARTÉS-HERNÁNDEZ, F.; MONEDERO-SAIZ, T.; SÁNCHEZ-ÁLVAREZ, C.; ARTÉS, F. Human metabolic fate of glucosinolates from kailan-hybrid broccoli. Differences between raw and microwaved consumption. **Food Research International**, v. 53, n. 1, p. 403–408, 2013.

MARTÍNEZ-VILLALUENGA, C.; FRÍAS, J.; GULEWICZ, P.; GULEWICZ, K.; VIDAL-VALVERDE, C. Food safety evaluation of broccoli and radish sprouts. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 5, p. 1635–1644, 2008.

MAYER, A. M. Polyphenol oxidases in plants and fungi: Going places? A review. **Phytochemistry**, v. 67, n. 21, p. 2318–2331, 2006.

MEDINA, S.; DOMÍNGUEZ-PERLES, R.; MORENO, D. A.; GARCÍA-VIGUERA, C.; FERRERES, F.; GIL, J. I.; GIL-IZQUIERDO, Á. The intake of broccoli sprouts modulates the inflammatory and vascular prostanoids but not the oxidative stress-related isoprostanes in healthy humans. **Food Chemistry**, v. 173, p. 1187–1194, 2015.

MEWIS, I.; KHAN, M. A. M.; GLAWISCHNIG, E.; SCHREINER, M.; ULRICHS, C. Water stress and aphid feeding differentially influence metabolite composition in *Arabidopsis thaliana* (L.). **PLoS ONE**, v. 7, n. 11, p. e48661, 2012a.

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 and Cell Physiology**, v. 53, n. 9, p. 1546–1560, 2012b.

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, n. 1, p. 298–308, 2003.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, v. 7, n. 9, p. 405–410, 2002. 82

MORALES-BLANCAS, E. F.; CHANDIA, V. E.; CISNEROS-ZEVALLOS, L. Thermal inactivation kinetics of peroxidase and lipoxygenase from broccoli, green asparagus and carrots. **Journal of Food Science**, v. 67, n. 1, p. 146–154, 2002.

MOST, P.; PAPENBROCK, J. Possible roles of plant sulfurtransferases in detoxification of cyanide, reactive oxygen species, selected heavy metals and arsenate. **Molecules**, v. 20, n. 1, p. 1410–1423, 2015.

MULLINEAUX, P.; KARPINSKI, S. Signal transduction in response to excess light: getting out of the chloroplast. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 5, n. 1, p. 43–48, 2002.

NADEAU, F.; GAUDREAU, A.; ANGERS, P.; ARUL, J. Changes in the level of glucosinolates in broccoli florets (*Brassica oleracea* var. *italica*) during storage following postharvest treatment with UV-C. In: **IV International Conference Postharvest Unlimited 2011 945**. 2011, p.145–148.

NAFISI, M.; GOREGAOKER, S.; BOTANGA, C. J.; GLAWISCHNIG, E.; OLSEN, C. E.; HALKIER, B. A.; GLAZEBROOK, J. Arabidopsis cytochrome P450 monooxygenase 71A13 catalyzes the conversion of indole-3-acetaldoxime in camalexin synthesis. **The Plant Cell**, v. 19, n. 6, p. 2039–2052, 2007.

NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant Cell Physiology**, v. 22, n. 5, p. 867–880, 1981.

NAWKAR, G. M.; MAIBAM, P.; PARK, J. H.; SAHI, V. P.; LEE, S. Y.; KANG, C. H. UV-Induced Cell Death in Plants. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 1, p. 1608–1628, 2013.

OLSEN, H.; AABY, K.; BORGE, G. I. A. Characterization and quantification of flavonoids and hydroxycinnamic acids in curly kale (*Brassica oleracea* L. Convar.

acephala Var. sabellica) by HPLC-DAD-ESI-MSn. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 7, p. 2816–2825, 2009.

PANDA, S. K.; KHAN, M. H. Growth, oxidative damage and antioxidant responses in greengram (*Vigna radiata* L.) under short-term salinity stress and its recovery. **Journal of Agronomy and Crop Science**, v. 195, n. 6, p. 442–454, 2009. 83

PARK, M. H.; KIM, J. G. Low-dose UV-C irradiation reduces the microbial population and preserves antioxidant levels in peeled garlic (*Allium sativum* L.) during storage. **Postharvest Biology and Technology**, v. 100, p. 109–112, 2015.

PÉK, Z.; DAOOD, H.; NAGYNÉ, M. G.; NEMÉNYI, A.; HELYES, L. Effect of environmental conditions and water status on the bioactive compounds of broccoli. **Central European Journal of Biology**, v. 8, n. 8, p. 777–787, 2013.

PEREIRA, D. M.; VALENTÃO, P.; PEREIRA, J. A.; ANDRADE, P. B. Phenolics: from chemistry to biology. **Molecules**, v. 14, n. 6, p. 2202–2211, 2009.

PÉREZ-GREGORIO, M. R.; REGUEIRO, J.; GONZÁLEZ-BARREIRO, C.; RIAL-OTERO, R.; SIMAL-GÁNDARA, J. Changes in antioxidant flavonoids during freeze-drying of red onions and subsequent storage. **Food Control**, v. 22, n. 7, p. 1108–1113, 2011.

PERKINS-VEAZIE, P.; COLLINS, J. K.; HOWARD, L. Blueberry fruit response to postharvest application of ultraviolet radiation. **Postharvest Biology and Technology**, v. 47, n. 3, p. 280–285, 2008.

PINHEIRO, C.; CHAVES, M. M. Photosynthesis and drought: Can we make metabolic connections from available data? **Journal of Experimental Botany**, v. 62, n. 3, p. 869–882, 2011.

PODSEDEK, A. Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: A review. **LWT - Food Science and Technology**, v. 40, n. 1, p. 1–11, 2007.

PRICE, K. R.; CASUSCELLI, F.; COLQUHOUN, I. J.; RHODES, M. J. C. Composition and content of flavonol glycosides in broccoli florets (*Brassica olearacea*) and their fate during cooking. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 77, n. 4, p. 468–472, 1998.

RAI, R.; MEENA, R. P.; SMITA, S. S.; SHUKLA, A.; RAI, S. K.; PANDEY-RAI, S. UV-B and UV-C pre-treatments induce physiological changes and artemisinin

biosynthesis in *Artemisia annua* L. – An antimalarial plant. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 105, n. 3, p. 216–225, 2011.

RAMACHANDRAN, S.; FONTANILLE, P.; PANDEY, A.; LARROCHE, C. Gluconic acid: properties, applications and microbial production. **Food Technol. Biotechnol.**, v. 44, n. 2, p. 185–195, 2006. 84

RAMAKRISHNA, A.; RAVISHANKAR, G. A. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. **Plant Signaling & Behavior**, v. 6, n. 11, p. 1720–1731, 2011.

REDOVNIKOVIC, I. R.; GLIVETIC, T.; DELONGA, K.; VORKAPIC-FURAC, J. Glucosinolates and their potential role in plant. **Periodicum Biologorum**, v. 110, n. 4, p. 297–309, 2008.

RIBEIRO, C.; CANADA, J.; ALVARENGA, B. Prospects of UV radiation for application in postharvest technology. **Emirates Journal of Food and Agriculture**, v. 24, n. 6, p. 586–597, 2012.

RIEMANN, M.; DHAKAREY, R.; HAZMAN, M.; MIRO, B.; KOHLI, A.; NICK, P. Exploring jasmonates in the hormonal network of drought and salinity responses. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, p. 1077, 2015.

SAXENA, S. C.; JOSHI, P. K.; GRIMM, B.; ARORA, S. Alleviation of ultraviolet-C-induced oxidative damage through overexpression of cytosolic ascorbate peroxidase. **Biologia**, v. 66, n. 6, p. 1052, 2011.

SCHREINER, M.; KRUMBEIN, A.; MEWIS, I.; ULRICHS, C.; HUYSKENS-KEIL, S. Short-term and moderate UV-B radiation effects on secondary plant metabolism in different organs of nasturtium (*Tropaeolum majus* L.). **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 10, n. 1, p. 93–96, 2009.

SERRANO, M.; MARTINEZ-ROMERO, D.; GUILLÉN, F.; CASTILLO, S.; VALERO, D. Maintenance of broccoli quality and functional properties during cold storage as affected by modified atmosphere packaging. **Postharvest Biology and Technology**, v. 39, n. 1, p. 61–68, 2006.

SHA VALLI KHAN, P. S.; NAGAMALLAIAH, G. V.; DHANUNJAY RAO, M.; SERGEANT, K.; HAUSMAN, J. F. Abiotic stress tolerance in plants: insights from proteomics. In: **Emerging Technologies and Management of Crop Stress Tolerance**. 2. ed. Elsevier Inc., 2014, p.23–68.

SHAMA, G. Process challenges in applying low doses of ultraviolet light to fresh produce for eliciting beneficial hormetic responses. **Postharvest Biology and Technology**, v. 44, n. 1, p. 1–8, 2007.

SHARMA, P.; JHA, A. B.; DUBEY, R. S.; PESSARAKLI, M. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. **Journal of Botany**, v. 2012, p. 1–26, 2012. 85

SHEAHAN, J. J. Sinapate esters provide greater UV-B attenuation than flavonoids in *Arabidopsis thaliana* (brassicaceae). **American Journal of Botany**, v. 83, n. 6, p. 679–686, 1996.

SHU, D. F.; WANG, L. Y.; DUAN, M.; DENG, Y. S.; MENG, Q. W. Antisense-mediated depletion of tomato chloroplast glutathione reductase enhances susceptibility to chilling stress. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 49, n. 10, p. 1228–1237, 2011.

SIERRA, A. D. Abiotic stress hormesis: Hormetic stresses to maintain quality and enhance glucosinolates and phenolic compounds in broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) during storage. 2015. 330 f. Thèse (Doctorat en Sciences et Technologie des Aliments) - Université Laval, Québec, Canada, 2015.

SØNDERBY, I. E.; GEU-FLORES, F.; HALKIER, B. A. Biosynthesis of glucosinolates – gene discovery and beyond. **Trends in Plant Science**, v. 15, n. 5, p. 283–290, 2010.

SPREER, W.; ONGPRASERT, S.; HEGELE, M.; WU, J. N.; MU, J. Yield and fruit development in mango (*Mangifera indica* L. cv. Chok Anan) under different irrigation regimes. **Agricultural Water Management**, v. 96, n. 4, p. 574–584, 2009.

STEFFENS, J. C.; HAREL, E.; HUNT, M. D. Polyphenol oxidase. In: **Genetic Engineering of Plant Secondary Metabolism**. Boston, MA: Springer US. 1994, p. 275–312.

TANGUNE, B. F.; PEREIRA, G. M.; SOUZA, R. J. DE; GATTO, R. F. Response of broccoli to soil water tension under drip irrigation. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 37, n. 1, p. 7, 2016.

TARIQ, M.; WRIGHT, D. J.; BRUCE, T. J. A.; STALEY, J. T. Drought and root herbivory interact to alter the response of above-ground parasitoids to aphid infested plants and associated plant volatile signals. **PLoS ONE**, v. 8, n. 7, p. e69013, 2013.

TATTINI, M.; LORETO, F.; FINI, A.; GUIDI, L.; BRUNETTI, C.; VELIKOVA, V.; GORI, A.; FERRINI, F. Isoprenoids and phenylpropanoids are part of the antioxidant defense orchestrated daily by drought-stressed *Platanus x acerifolia* plants during Mediterranean summers. **New Phytologist**, v. 207, n. 3, p. 613–626, 2015.

TEIXEIRA, F. K.; MENEZES-BENAVENTE, L.; MARGIS, R.; MARGIS-PINHEIRO, M. Analysis of the molecular evolutionary history of the ascorbate 86 peroxidase gene family: inferences from the rice genome. **Journal of Molecular Evolution**, v. 59, n. 6, p. 761–770, 2004.

TEXTOR, S.; GERSHENZON, J. Herbivore induction of the glucosinolate–myrosinase defense system: major trends, biochemical bases and ecological significance. **Phytochemistry Reviews**, v. 8, n. 1, p. 149–170, 2009.

THIPYAPONG, P.; MELKONIAN, J.; WOLFE, D. W.; STEFFENS, J. C. Suppression of polyphenol oxidases increases stress tolerance in tomato. **Plant Science**, v. 167, n. 4, p. 693–703, 2004.

TUBEROSA, R. Phenotyping for drought tolerance of crops in the genomics era. **Frontiers in Physiology**, v. 3, p. 347, 2012.

TURTOI, M. Ultraviolet light treatment of fresh fruits and vegetables surface: A review. **Journal of Agroalimentary Processes and Technologies**, v. 19, n. 3, p. 325–337, 2013.

URANO, K.; MARUYAMA, K.; OGATA, Y.; MORISHITA, Y.; TAKEDA, M.; SAKURAI, N.; SUZUKI, H.; SAITO, K.; SHIBATA, D.; KOBAYASHI, M.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Characterization of the ABA-regulated global responses to dehydration in *Arabidopsis* by metabolomics. **The Plant Journal**, v. 57, n. 6, p. 1065–1078, 2009.

VALLEJO, F.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A.; FERRERES, F. Characterisation of flavonols in broccoli (*Brassica oleracea* L. var. italica) by liquid chromatography–UV diode-array detection–electrospray ionisation mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1054, n. 1–2, p. 181–193, 2004.

VARIYAR, P. S.; BANERJEE, A.; AKKARAKARAN, J. J.; SUPRASANNA, P. Role of glucosinolates in plant stress tolerance. **Emerging Technologies and Management of Crop Stress Tolerance**. v. 1, p.271–291, 2014.

VERMEULEN, M.; BOERBOOM, A.-M. M. J. F.; BLANKVOORT, B. M. G.; AARTS, J. M. M. J. G.; RIETJENS, I. M. C. M.; BLADEREN, P. J. VAN; VAES, W. H. J. Potency of isothiocyanates to induce luciferase reporter gene expression via the electrophile-

responsive element from murine glutathione S-transferase Ya. **Toxicology in Vitro**, v. 23, n. 4, p. 617–621, 2009. 87

VERSLUES, P. E.; JUENGER, T. E. Drought, metabolites, and Arabidopsis natural variation: a promising combination for understanding adaptation to water-limited environments. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 14, n. 3, p. 240–245, 2011.

WANG, C. Y.; CHEN, C.-T.; WANG, S. Y. Changes of flavonoid content and antioxidant capacity in blueberries after illumination with UV-C. **Food Chemistry**, v. 117, n. 3, p. 426–431, 2009.

WANG, Y.; XU, W.-J.; YAN, X.-F.; WANG, Y. Glucosinolate content and related gene expression in response to enhanced UV-B radiation in Arabidopsis. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 34, p. 6481–6491, 2011.

WASTERNAK, C.; HAUSE, B. Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review in Annals of Botany. **Annals of Botany**, v. 111, n. 6, p. 1021–1058, 2013.

WEBB, K. J.; COOKSON, A.; ALLISON, G.; SULLIVAN, M. L.; WINTERS, A. L. Gene expression patterns, localization, and substrates of polyphenol oxidase in red clover (*Trifolium pratense* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 31, p. 7421–7430, 2013.

WEI, Z. F.; LUO, M.; ZHAO, C. J.; LI, C. Y.; GU, C. B.; WANG, W.; ZU, Y. G.; EFFERTH, T.; FU, Y. J. UV-induced changes of active components and antioxidant activity in postharvest pigeon pea [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.] leaves. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 6, p. 1165–1171, 2013.

WIESNER, M.; HANSCHEN, F.; SCHREINER, M.; GLATT, H.; ZRENNER, R. Induced production of 1-methoxy-indol-3-ylmethyl glucosinolate by jasmonic acid and methyl jasmonate in sprouts and leaves of pak choi (*Brassica rapa* ssp. *chinensis*). **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 7, p. 14996–15016, 2013.

WILLEKENS, H.; VILLARROEL, R.; MONTAGU, M. VAN; INZÉ, D.; CAMP, W. VAN. Molecular identification of catalases from *Nicotiana plumbaginifolia* (L.). **FEBS Letters**, v. 352, n. 1, p. 79–83, 1994.

WOLUCKA, B. A.; GOOSSENS, A.; INZÉ, D. Methyl jasmonate stimulates the de novo biosynthesis of vitamin C in plant cell suspensions. **Journal of Experimental Botany**, v. 56, n. 419, p. 2527–2538, 2005.

WOLUCKA, B. A.; MONTAGU, M. VAN. GDP-mannose 3',5'-epimerase forms GDP-L-gulose, a putative intermediate for the *de novo* biosynthesis of vitamin C 88 in plants. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 48, p. 47483–47490, 2003.

WORMUTH, D.; HEIBER, I.; SHAIKALI, J.; KANDBINDER, A.; BAIER, M.; DIETZ, K. J. Redox regulation and antioxidative defence in *Arabidopsis* leaves viewed from a systems biology perspective. **Journal of Biotechnology**, v. 129, n. 2, p. 229–248, 2007.

WU, Q. J.; YANG, Y.; WANG, J.; HAN, L. H.; XIANG, Y. B. Cruciferous vegetable consumption and gastric cancer risk: A meta-analysis of epidemiological studies. **Cancer Science**, v. 104, n. 8, p. 1067–1073, 2013.

YI, G. E.; ROBIN, A.; YANG, K.; PARK, J. I.; HWANG, B.; NOU, I. S. Exogenous methyl jasmonate and salicylic acid induce subspecies-specific patterns of glucosinolate accumulation and gene expression in *Brassica oleracea* L. **Molecules**, v. 21, n. 10, p. 1417, 2016.

ZHANG, H.; SCHONHOF, I.; KRUMBEIN, A.; GUTEZEIT, B.; LI, L.; STÜTZEL, H.; SCHREINER, M. Water supply and growing season influence glucosinolate concentration and composition in turnip root (*Brassica rapa* ssp. *rapifera* L.). **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v. 171, n. 2, p. 255–265, 2008.

ZHAO, J.; ZHAO, L. Cruciferous vegetables intake is associated with lower risk of renal cell carcinoma: evidence from a meta-analysis of observational studies. **PLoS ONE**, v. 8, n. 10, p. e75732, 2013.

ZHAO, Z.; ZHANG, W.; STANLEY, B. A.; ASSMANN, S. M. Functional proteomics of *Arabidopsis thaliana* guard cells uncovers new stomatal signaling pathways. **The Plant Cell**, v. 20, n. 12, p. 3210–3226, 2008.

ZINGARETTI, S. M.; INÁCIO, M. C.; MATOS PEREIRA, L. DE; ANTUNES PAZ, T.; CASTRO FRANÇA, S. DE. Water stress and agriculture. In: **Responses of organisms to water stress**, InTech, 2013, p. 151–179.

## **Anexos**

**Anexo A** – Genes utilizados na meta-análise, obtidos a partir do estudo de GAO et al. (2014).

Nome do gene (Abreviatura)	ID em Arabidopsis
<b>Elongação da Cadeia Lateral de Aminoácidos</b>	
3 - Aminotransferase de aminoácidos de cadeia ramificada (BCAT3)	AT3g49680
3- Isopropilmalato desidrogenases (IPMDH3)	AT1g31180
<b>Biossíntese do Núcleo dos Glicosinolatos</b>	
Citocromo P450 83A1 (CYP83A1)	AT4g13770
Glutaciona S-transferase F11 (GSTF11)	AT3g03190
Gama-glutamilpeptidase 1 (GGP1)	AT4g30530
Sulfotransferase 17 (SOT17)	AT1g18590
Sulfotransferase 18 (SOT18)	AT1g74090
Glutamato-cisteína ligase (GSH1)	AT4g23100
B-triptofano-sintase 1 (TSB1)	AT5g54810
Triptofano N-mono-oxigenase 1 (CYP79B2)	AT4g39950
Triptofano N-mono-oxigenase 2 (CYP79B3)	AT2g22330
Citocromo P450 83B1 (CYP83B1)	AT4g31500
Glutaciona S-transferase F10 (GSTF10)	AT2g30870
Gama glutamil peptidase 1 (GGP1)	AT4g30530
S-alquil-tiohidroximato liase (SUR1)	AT2g20610
<b>Modificação da Cadeia Lateral</b>	
Flavina monooxigenase GS-OX2 (FMO <sub>GS-OX2</sub> )	AT1g62540
Flavina monooxigenase GS-OX5 (FMO <sub>GS-OX5</sub> )	AT1g12140
<b>Degradação</b>	
Mirosinase 1 (TGG1)	AT5g26000
Mirosinase 2 (TGG2)	AT5g25980
Subunidade gama-secretase (PEN2)	AT2g44490