



Revisión y criterios de seguridad en los procesos de oxidación avanzada en vegetales, mediados por radical hidroxilo.



| Informe | | |
|----------|--|------------------|
| Autores | Custodio-Sánchez, JD; Mtz-Vimbert, R, García - Raurich, J. | Date: 27/04/2020 |
| Aprobado | Josep Garcia Raurich | |

| | |
|------------|---|
| Lugar | ESEIAAT – UPC Campus de Terrassa |
| Objetivo : | Revisión y criterios de seguridad en los procesos de oxidación avanzada en vegetales, mediados por radical hidroxilo. |

Introducción

El etileno es un gas invisible, incoloro e inodoro, que no tiene ningún efecto peligroso conocido en humanos, en las concentraciones encontradas dentro de la cadena de almacenamiento y venta de frutas y verduras. La molécula de etileno es relativamente pequeña y simple: consta de dos átomos de carbono asociados con cuatro átomos de hidrógeno. El peso molecular del etileno es $28,05 \text{ g mol}^{-1}$ y las frutas y verduras producen diferentes cantidades de etileno a medida que maduran¹. Normalmente, el etileno no puede ser detectado por los humanos, aunque en ocasiones, sólo las personas experimentadas pueden oler grandes cantidades, pero a este hecho también contribuyen otros compuestos orgánicos volátiles de frutas y verduras². Como su peso específico (1.178 kg m^{-3} a $15 \text{ }^\circ\text{C}$) es similar al del aire (1.225 kg m^{-3} a $15 \text{ }^\circ\text{C}$), el etileno difunde libremente a cualquier otra fruta o verdura adyacente y a los espacios en los que éstas se almacenen.

Además del CO_2 y el O_2 , el etileno es el gas más importante para ser monitoreado y controlado en la cadena de suministro de frutas y verduras^{3,4}. Menos de 1 parte por millón (ppm) en volumen de gas etileno, es suficiente para desencadenar el proceso de maduración de la fruta climatérica (las que pueden seguir madurando, una vez recolectadas). El etileno es considerado una hormona vegetal que controla una amplia gama de procesos fisiológicos. Durante el almacenamiento, después de la cosecha de frutas y verduras, el etileno puede inducir efectos





negativos que incluyen senescencia, sobre-maduración, pérdida acelerada de calidad, mayor susceptibilidad a los patógenos de la fruta y afectar a distintos procesos fisiológicos. Además de la producción endógena de etileno por los tejidos vegetales, también existen fuentes externas como contaminantes y el propio metabolismo de plantas y hongos.

La concentración de etileno

Conocer la concentración de etileno en zonas de almacenamiento de frutas y verduras y la presencia de elementos perjudiciales para productos almacenados en cámaras frigorífica, es un problema para las empresas productoras y de consumo. Entre los elementos perniciosos cabe destacar los compuestos orgánicos volátiles (COV's), consecuencia del propio metabolismo de los productos almacenados, los hongos, dispersados por el aire a través de sus esporas y el etileno que, aunque englobado en los COV's, merece atención aparte, dado su carácter de hormona vegetal, desencadenante de los procesos de maduración en los frutos.

De forma rutinaria, se han empleado industrialmente soluciones basadas en procesos de oxidación avanzada (POA) a través de fotocatalisis, preferentemente con dióxido de titanio (TiO_2) y radiación ultravioleta (UV) que, a diferencia de los realizados con ozono (O_3), son más seguros al producir directamente radicales hidroxilos ($\text{OH}\bullet$) responsables de los procesos de oxidación, evitando la acumulación de gases tóxicos^{5,6}.

La producción de $\text{OH}\bullet$ ocurre naturalmente en los organismos, así como en la atmósfera. El $\text{OH}\bullet$ se forma en los sistemas biológicos por el metabolismo oxidativo en el cual, predominantemente en las mitocondrias, los radicales superóxido ($\text{O}_2\bullet^-$) se forman como un subproducto no deseado. El radical superóxido puede eliminarse mediante la enzima superóxido dismutasa. El producto, H_2O_2 , se puede eliminar¹² mediante otras enzimas (catalasas), o puede someterse a una reacción de Fenton en presencia de iones de metales de transición para generar $\text{OH}\bullet$.

En la oxidación del etileno hasta CO_2 y H_2O es necesario una serie de pasos que producen productos intermedios, que pueden resultar incluso peores que el producto original. Los productos intermedios en el caso del etileno son el óxido de etileno, formaldehído, o metanol dependiendo de las características oxidativas del medio, todos ellos con riesgos higiénicos. Esta situación se complica como mayor es el tamaño de la molécula a destruir, aumentando las posibilidades de productos intermedios. La medición de COV's permite determinar si el proceso depurador reduce los niveles presentes y si aparecen productos secundarios resultantes de la oxidación.

En un estudio realizado para determinar las concentraciones de etileno, de COV's y de unidades formadoras de colonias de hongos (UFC) en productos almacenados en cámaras frigoríficas expuestas a POA⁷, las muestras se analizaron con diferentes metodologías y, finalmente, se analizaron mediante desorción térmica y cromatografía de gases con espectrómetro de masas (CGMS) para la identificación de diferentes compuestos. Todos los resultados mostraron una reducción significativa de las variables de estudio. En el caso concreto de la cámara donde se almacenaban melones (*Cucumis melo*) las concentraciones de etileno antes y después del POA





pasaron de 1,5 - 3,4 ppm a 0,6 - 1,3 ppm respectivamente y en la cámara donde se almacenaban pimientos (*Capsicum annuum*), las UFC pasaron de una media de 149, antes del POA a 25 UFC después de aplicado el tratamiento. La elección de los parámetros de estudio se determinó, en el caso del etileno, por su importancia en los procesos de envejecimiento de los frutos limitando su duración en las cámaras frigoríficas; en el caso de las UFC debido a los problemas de enfermedades en los frutos almacenados y en los COV's debido a que son compuestos generalmente procedentes del propio metabolismo de los productos almacenados que producen los olores de los productos almacenados y porque pueden empeorar la calidad de éstos, al ser absorbidos por otras frutas o vegetales.

El radical OH• es altamente reactivo y reaccionará instantáneamente prácticamente con cualquier molécula que encuentre, reaccionando casi al instante en el lugar de su formación debido a su elevada reactividad y su corta vida media. La distribución de un ataque del radical OH• depende de la densidad de electrones en el sitio de la molécula atacada. Debido a su naturaleza electrofílica, el radical OH• se agrega preferentemente al sitio con la mayor densidad de electrones. Otras especies reactivas de oxígeno (ROS) que no están presentes en forma de radical, como el O₃ atraviesan las membranas biológicas ampliando su campo de acción y su toxicidad durante períodos de tiempo más largos^{8,9}.

Gran parte de los COV's presentes en la atmósfera provienen de las emisiones de los vegetales, lo que constituye una evidencia más que la composición de la atmósfera terrestre está determinada, en buena medida, por la actividad biológica. Las reacciones OH•/COV's conducen a la formación de radicales alquilo (R•), radicales alcoxi (RO•), radicales peroxi (RO₂•) y otras especies, que se transforman por descomposición, isomerización o hidrólisis, llevando a la formación de compuestos oxigenados, como los alcoholes, carbonilos (aldehídos o cetonas), ácidos carboxílicos e hidroxicarbonilos¹⁰. Tanto el OH• como el O₃ contribuyen más o menos por igual a la oxidación del d-limoneno¹¹.

Reacciones que involucran a los OH•

Hay 3 tipos principales de reacciones que involucran a los OH•: abstracción de hidrógeno, adición y transferencia de electrones. Todas estas reacciones predicen el efecto causado por el OH•. Básicamente, todas las reacciones conducen a la formación de nuevos radicales y, por lo tanto, propagan reacciones en cadena. Un ejemplo de abstracción es la reacción del OH• con alcoholes. El OH• extrae el H• y forma agua, dejando un electrón no apareado en el átomo de carbono del alcohol. Fácilmente, el OH• puede agregarse a dobles enlaces para formar un derivado un intermedio oxigenado que también puede participar en reacciones de transferencia de electrones¹². En el caso de un compuesto aromático, el OH• sigue el mecanismo de una SAE, durante el proceso de su incorporación al anillo aromático.



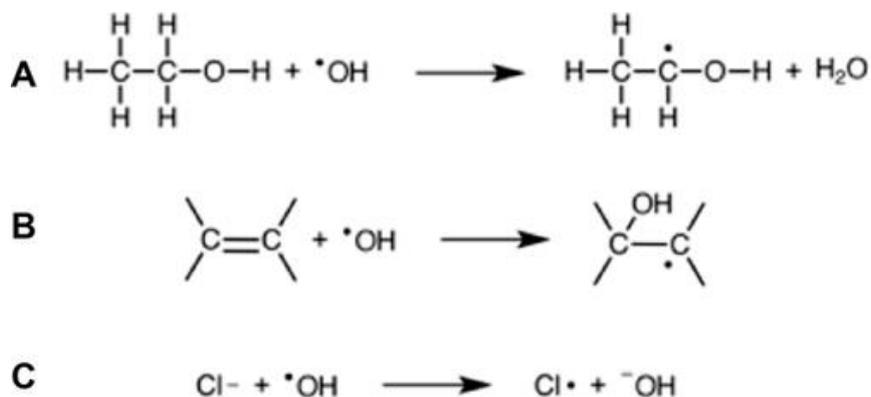


Imagen 1. Tres tipos principales de reacciones de OH•: (A) abstracción de hidrógeno; (B) adición al doble enlace; (C) transferencia de electrones. Tomado de Tremli & Šmejka, 2016: Flavonoids as Potent Scavengers of Hydroxyl Radicals.

Existe una diferencia entre los captadores de OH• y los antioxidantes. El mecanismo de acción de los eliminadores de OH• es el barrido directo, mientras que los antioxidantes incluyen eliminadores de OH•, transformar compuestos precursores de la oxidación (tales como el O₃), iones que participan en la quelación de metales y aumento de la actividad y producción de enzimas antioxidantes. Un desequilibrio de este proceso, conlleva a un desajuste en el control de los ROS, derivando en efectos sobre la funcionalidad celular vegetal. Así, se ha comprobado que la producción de etileno en tejidos de epicarpio de mandarina con manchas de color oscuro, fue menor que en los tejidos sin manchas y estas células mostraron aumentos significativos en la permeabilidad de la membrana, la producción de radicales hidroxilos y la peroxidación lipídica¹³.

Por otra parte, se tiene constancia que el OH• puede causar daños por oxidación que conducen al daño de la pared celular y al deterioro de la calidad de la fruta de plátano durante el almacenamiento¹⁴. El metabolismo de los ROS también puede depender de la acción del etileno¹⁵ y, por lo tanto, influye en la maduración y la senescencia y la vida útil de la fruta. Ren y col.¹⁶ sugieren que la mejora de la calidad y la prolongación de la vida útil de las frutas de mango pueden lograrse reduciendo el daño oxidativo causado por ROS durante la maduración. Otros autores consideran que, dado el papel del OH• en la modificación de los polisacáridos de la pared celular¹⁷, la inhibición del OH• podría contribuir al mantenimiento de la firmeza de estas frutas. En cambio, también se ha podido comprobar, como la biosíntesis de flavonoides en las plantas se ve mejorada casi exclusivamente por el estrés oxidativo¹⁸, de hecho, las funciones reductoras de los flavonoides son de importancia clave en las plantas, bajo condiciones severas de estrés.

Estrés oxidativo en vegetales

Las plantas exhiben una mayor síntesis de polifenoles como los ácidos fenólicos y los flavonoides en condiciones de estrés abiótico, lo que ayuda a la planta a hacer frente a las limitaciones ambientales. La exposición de un organismo a un estrés oxidativo desequilibrado tiene muchas consecuencias biológicas. El estrés oxidativo mediado por radicales libres termina siendo

beneficioso para la planta, ya que promueve la producción de metabolitos secundarios y la adaptación del sistema de defensa del vegetal contribuyendo de este modo a un mayor beneficio nutricional. Se ha sugerido que es necesario un nivel umbral de radicales libres, para el funcionamiento fisiológico normal de las plantas¹⁹.

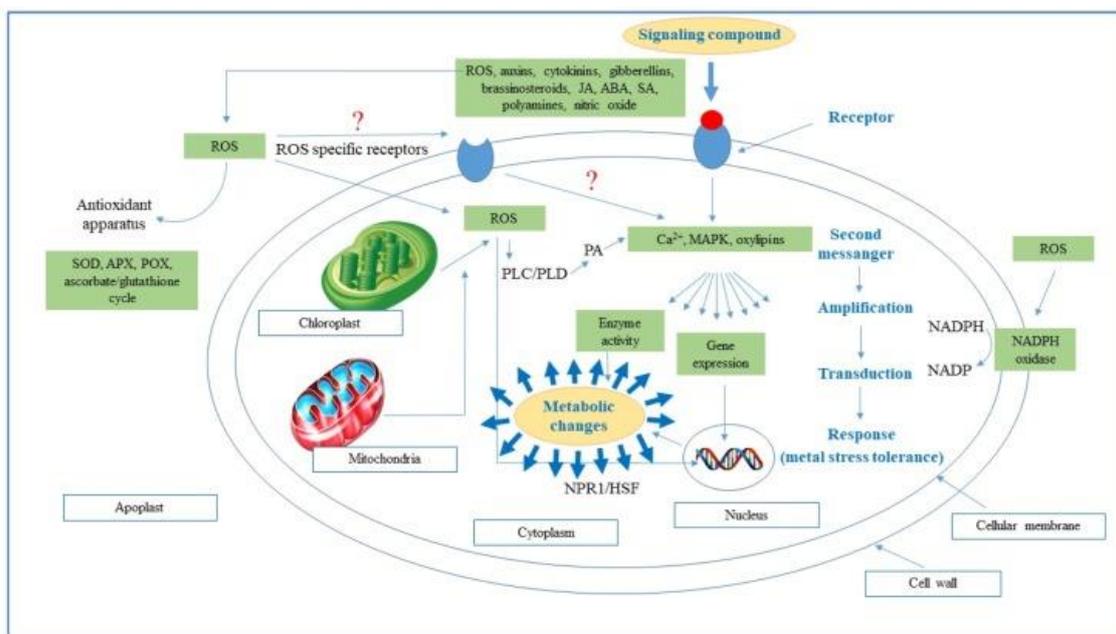


Imagen 2. Esquemata de la transmisión y transducción de señales en células vegetales. Abreviatura: ABA, ácido abscísico; APX, ascorbato peroxidasa; HSF, factor de transcripción sensible a redox; JA, ácido jasmónico; MAPK, proteína quinasa activada por mitógeno; NADP, nicotinamida adenina dinucleótido oxidado; NADPH, nicotinamida adenina dinucleótido reducido; NPR1, factor de transcripción sensible a redox; OXI1, serina / treonina quinasa; PA, ácido fosfatídico; PLC / PLD, fosfolipasas clase C y D; POX, peroxidasa; ROS, especies reactivas de oxígeno; SA, ácido salicílico; SOD, superóxido dismutasa. Tomado de: Farooq y col.,2019.

Los flavonoides eliminan los radicales hidroxilos (OH•) generados por la fotólisis UV del peróxido de hidrógeno²⁰. Veinticinco verduras (alcachofa, espárragos, remolacha, habas, brócoli, coles de Bruselas, zanahoria, coliflor, apio, achicoria, pepino, berenjena, escarola, ajo, judías verdes, puerro, lechuga, maíz, cebolla, guisante, pimiento, rábano, espinacas, acelgas y calabacín) se utilizaron para evaluar su actividad antioxidante. Todas las verduras frescas estudiadas pudieron eliminar los radicales lipoperoxilo e hidroxilo. Todos los vegetales también presentaron una buena capacidad antioxidante, excepto pepino, endibia, zanahoria y calabacín. Las verduras almacenadas (7 días) en un refrigerador doméstico registraron la misma actividad antioxidante que las muestras frescas, excepto el pepino y el calabacín (peroxidación lipídica) y el brócoli, las coles de Bruselas y el puerro. Las verduras enlatadas mostraron una pérdida más pronunciada de actividad antioxidante que las verduras congeladas en comparación con las verduras frescas. Durante la vida útil de los vegetales procesados (8 meses para vegetales congelados y 18 meses para vegetales enlatados), algunos productos mostraron pérdidas (19-48%) de su capacidad de eliminación de radicales lipoperoxilo y actividad antioxidante total²¹.



Las plantas que crecen en ambientes estresantes tienen la capacidad de biosintetizar más compuestos fenólicos en comparación con las plantas que crecen en condiciones normales.

Estos compuestos tienen propiedades antioxidantes y son capaces de eliminar los radicales libres, lo que resulta en la reducción de la peroxidación de la membrana celular²².

Los flavonoides pueden mejorar el proceso de quelación de metales, lo que ayuda a reducir los niveles de radicales hidroxilos dañinos en las células vegetales^{23,24} y esto encaja con la observación que los niveles de flavonoides en las plantas, se han incrementado por el exceso de metales²⁵. Bajo toxicidad por metales, la acumulación de flavonoides específicos que están involucrados en la ayuda al mecanismo de defensa de la planta también aumenta, incluidas las antocianinas y los flavonoles.

En base a los resultados de esta revisión, podemos sugerir que la conservación de frutas y verduras en cámaras frigoríficas es dependiente de la acumulación de COV's, de la proliferación de microorganismos, de las condiciones de las cámaras y las propias características de cada vegetal. La eliminación de los COV's (incluido el etileno) puede emplearse como indicador del funcionamiento de los procesos oxidantes como depuradores del ambiente de las cámaras de conservación y almacenamiento.

El comportamiento hasta ahora determinado del dispositivo Wadu02, permite afirmar que el radical OH• es el elemento oxidante responsable del POA utilizado y, en consecuencia, presenta una acción potencial sobre la modulación de los niveles de etileno que afectan favorablemente a frutas y verduras, así como su control microbiológico.

Referencias

1. Shiomi S, Wamocho LS, Agong SG. 1996. Ripening characteristics of purple passion fruit on and off the vine. *Postharvest Biol. Technol.* 7, 161–170.
2. Blanke M. 2008. Tragbares Ethylenmessgerät mit hoher Auflösung durch neue Sensortechnologie. *Erwerbs-Obstbau* 50, 77–84.
3. Voesenek LA, Vriezen WH, Smekens MJ, Huitink FH, Bogemann GM, Blom CW. 1997. Ethylene sensitivity and response sensor expression in petioles of *Rumex* species at low O₂ and high CO₂ concentrations. *Plant Physiol.* 114, 1501–1509.
4. Jedermann R, Geyer M, Praeger U, Lang W. 2012. Sea transport of bananas in containers—parameter identification for a temperature model. *J. Food Eng.* 115, 330–338.
5. Vitor RF, Lidon FC, Carvalho CS. Dark stained tissues of the epicarp of encore mandarin: interactions with the production of hydroxyl radicals. *Free Radic Res.* 1999;31 Suppl:S163-S169.
6. Cheng G, Duan X, Shi J, et al. Effects of reactive oxygen species on cellular wall disassembly of banana fruit during ripening. *Food Chem.* 2008;109(2):319-324.





7. Moreno, J; Moreno-Grau, S; Elvira-Rendueles, B; Vergara- Juárez, N; Martínez García, MJ; Aguilar- Tarbay, F; Abad Merín, J; Moreno Clavel, J (2006) Eliminación de etileno, hongos y olores en cámaras frigoríficas. *Horticultura*; 192: 48- 51.
8. Kohen R, Nyska A. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol Pathol.* 2002;30(6):620-650.
9. Betteridge DJ. 2000. What is oxidative stress? *Metabolism* 49:3–8.
10. Waring MS, Wells JR. Volatile organic compound conversion by ozone, hydroxyl radicals, and nitrate radicals in residential indoor air: Magnitudes and impacts of oxidant sources. *Atmos Environ* (1994). 2015; 106:382-391.
11. Carlsaw N. A mechanistic study of limonene oxidation products and pathways following cleaning activities. *Atmos. Environ.* 2013; 80:507–513.
12. Halliwell B, Gutteridge JMC. 2007. *Free radicals in biology and medicine*. 4th ed. Oxford: Oxford Univ. Press.
13. Vitor RF, Lidon FC, Carvalho CS. Dark stained tissues of the epicarp of encore mandarin: interactions with the production of hydroxyl radicals. *Free Radic Res.* 1999;31 Suppl: S163-S169.
14. Cheng G, Duan X, Shi J, et al. Effects of reactive oxygen species on cellular wall disassembly of banana fruit during ripening. *Food Chem.* 2008;109(2):319-324.
15. Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature.* 2000; 408:239–247
16. Ren Y, He J, Liu H, Liu G, Ren X. Nitric oxide alleviates deterioration and preserves antioxidant properties in ‘Tainong’ mango fruit during ripening. *Hortic Environ Biotechnol.* 2017; 58:27–37
17. Duan X, Liu T, Zhang D, Su X, Lin H, Jiang Y. Effect of pure oxygen atmosphere on antioxidant enzyme and antioxidant activity of harvested litchi fruit during storage. *Food Res Int.* 2011; 44:1905–1911.
18. Kumar S, Pandey AK. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *Scientific World Journal.* 2013; 2013:162750.
19. Farooq M.A., Niazi A.K., Akhtar J., Farooq M., Souri Z., Karimi N., Rengel Z. Acquiring control: The evolution of ROS-Induced oxidative stress and redox signaling pathways in plant stress responses. *Plant Physiol. Biochem.* 2019; 141:353–369.
20. Rafat H, Cillard J, Cillard P. Hydroxyl radical scavenging activity of flavonoids. *Phytoch.* 1987;26 (9):2489-2491.
21. Murcia, M. A., Jiménez, M. A. and Martínez-Tomé, M. “Vegetables antioxidant losses during industrial processing and refrigerated storage”. *Food Res. Int.*, 42, 1046-1052, 2009.





22. Schroeter H., Boyd C., Spencer J.P., Williams R.J., Cadenas E., Rice-Evans C. MAPK signaling in neurodegeneration: Influences of flavonoids and of nitric oxide. *Neurobiol. Aging*. 2002; 23:861–880.
23. Mira L., Fernandez M.T., Santos M., Rocha R., Florencio M.H., Jennings K.R. Interactions of flavonoids with iron and copper ions: A mechanism for their antioxidant activity. *Free Radic. Res*. 2002; 36:1199–1208.
24. Williams R.J., Spencer J.P., Rice-Evans C. Flavonoids: Antioxidants or signalling molecules? *Free. Radic. Biol. Med*. 2004; 36:838–849.
25. Handa N., Kohli S.K., Sharma A., Thukral A.K., Bhardwaj R., Alyemeri M.N., Wijaya L., Ahmad P. Selenium ameliorates chromium toxicity through modifications in pigment system, antioxidative capacity, osmotic system, and metal chelators in *Brassica juncea* seedlings. *S. Afr. J. Bot*. 2018; 119:1–10.

