

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL

DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS



**OBTENCIÓN DE SUBPRODUCTOS DE INTERÉS A PARTIR DE EXTRACTOS
DE ESQUILMOS DE BRÓCOLI POR SISTEMA HIBRIDO (ULTRASONIDO Y
MICROONDAS)**

Por:

BRAYAN FLORES ELIAS

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Saltillo, Coahuila de Zaragoza, México.

Enero, 2023.

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISION DE CIENCIA ANIMAL

Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos

**OBTENCIÓN DE SUBPRODUCTOS DE INTERÉS A PARTIR
EXTRACTOS DE ESQUILMOS DE BRÓCOLI POR SISTEMA
HIBRIDO DE ULTRASONIDO Y MICROONDAS**

Presentada por

BRAYAN FLORES ELIAS

T E S I S

Que se somete a la consideración del H. Jurado examinador como requisito para
obtener el título de:

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

Aprobado por el comité de Asesoría:



Dra. Dolores Gabriela Martínez Vázquez

Director Interno



Dra. Lluvia de Abril Alexandra Soriano Melgar

Director Externo

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México

Enero de 2023

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISION DE CIENCIA ANIMAL

Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos

**OBTENCIÓN DE SUBPRODUCTOS DE INTERÉS A PARTIR
EXTRACTOS DE ESQUILMOS DE BRÓCOLI POR SISTEMA
HIBRIDO DE ULTRASONIDO Y MICROONDAS**

Presentada por

BRAYAN FLORES ELIAS

TESIS

Que se somete a la consideración del H. Jurado examinador como requisito para
obtener el título de:

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

Aprobada por:

Dra. Dolores Gabriela Martínez Vázquez

Presidente

Dra. Ana Verónica Charles Rodríguez

Vocal

Dr. Francisco Hernández Centeno

Vocal

Dra. Judith Amador Hernández

Vocal Suplente

Dr. Ricardo Vásquez Aldape

Coordinador de la División
de Ciencia Animal

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México

Enero de 2023

OBTENCIÓN DE SUBPRODUCTOS DE INTERÉS A PARTIR

bajos en los que me he sentido a lo largo de la carrera y evitar la rendición ante las adversidades que tuve.

Los apoyos que **MIS PADRES** me dieron siempre que los dejaba, con lágrimas en los ojos y el deseo de demostrarles que su hijo sería capaz de avanzar en la carrera y llenarlos de orgullo al ver que su hijo obtenga el gran logro de terminar una profesión, y darme la oportunidad de poder estudiar tan lejos de ellos en una gran universidad.

Mis queridos **HERMANOS Jonathan, Miguel y Pedro**, siempre me apoyaron, me dieron ánimos a lo largo de la carrera, siempre se apreciaron los ánimos, aconsejadas, enseñanzas y regañadas. Los admiro mucho y quiero superar sus expectativas en esta vida.

A mi **ALMA TERRA MATER**, por acogerme y refugiarme bajo su manto, ser mi segunda casa, mi segunda familia y permitirme conocer a excelentes amistades. Me brindó grandes oportunidades y una excelente formación profesional, siempre BUITRE DE CORAZÓN.....

Al la **Dra. Lluvia de Soriano Melgar** por el apoyo dado a lo largo del proceso de investigación de mi tesis y siempre tenerme paciencia en las dudas que tenía, gracia. Y a M.C Alma Leticia por apoyo en material.

Al **Doctor Aldana (Alergólogo)**, por todas las veces que me enfermé en la universidad y siempre recetarme algo, me contestaba rápido y amablemente, gracias a eso me pude mantener sano estando lejos de mi casa.

Al buen amigo **Román Villalpando**, por enseñarme conceptos de la vida que no comprendía, me ayudaste de una manera indirecta con algunas enseñanzas que no necesariamente me las decías a mí, pero yo las tome y fue una forma de no seguir malos caminos en la universidad.

A mis buenos amigos **Armando Pérez, David Rafael y Mary Lara**, al principio cuando no conocía a muchas personas en la universidad, ustedes estaban ahí para contestar mis mensajes en momentos de soledad.

DEDICATORIA

A mi amada familia

Mis padres y hermanos me apoyaron de todo corazón al abandonar mi casa y comenzar esta gran travesía en mi vida.

A mi abuelo paterno y mis abuelos maternos que hoy en día ya no están conmigo pero que me cuidan desde el cielo.

A dios por permitirme tener una gran familia.

FINANCIAMIENTO Y AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por el fondo FOP08-2021-03 “Desarrollo de Innovaciones Tecnológicas para una Agricultura Mexicana Libre de Agroinsumos Tóxicos” a través del Proyecto CONACyT 316010 titulado: “Efecto de subproductos de brócoli sobre la calidad del melón poscosecha”.

Los Autores agradecen a CONACyT por el financiamiento para este proyecto y el apoyo económico al estudiante Brayan Flores Elias.

DECLARACIÓN DE INTEGRIDAD

Por medio de la presente manifiesto que he realizado mi tesis con integridad. Aseguro que no he recurrido a ningún plagio en el proceso de los resultados de elaboración de tesis.



Brayan Flores Elias

ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN.	1
2. JUSTIFICACIÓN.	3
3. OBJETIVOS.	4
3.1. Objetivo general.	4
3.2. Objetivos particulares.	4
4. HIPÓTESIS.	5
5. ESTADO DEL ARTE.	6
5.1. Residuos de crucíferas.	6
5.2. Compuestos presentes en los residuos de crucíferas.	7
5.3. Brócoli.	8
5.4. Conservación del brócoli y sus compuestos de interés.	8
5.4.1. <i>Glucosinolatos (GLS)</i>	9
5.5. Métodos de extracción.	11
5.5.1. <i>Microondas</i>	11
5.5.2. <i>Ultrasonido</i>	13
5.6. Solventes en los métodos de extracción.	13
6. MATERIALES Y MÉTODOS.	15
6.1. Material vegetal.	15
6.2. Métodos de extracción.	16
6.3. Tratamientos a base de diferentes solventes.	16
6.4. Generación de extractos a partir de esquilmos de brócoli.	16
6.5. Caracterización de los extractos	17
6.5.1. <i>Contenido de glucosinolatos</i>	17
6.5.2. <i>Clorofilas a, b y totales</i>	19
6.5.3. <i>Proteínas</i>	21
6.5.4. <i>Vitamina C</i>	21
6.5.5. <i>Compuestos fenólicos totales</i>	22
6.5.6. <i>Capacidad antioxidante total</i>	22
6.6. Diseño experimental.	23
6.7. Análisis estadístico.	23
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	24

7.1. Glucosinolatos.....	24
7.2. Clorofila <i>a</i>	26
7.3. Clorofila <i>b</i>	28
7.4. Clorofilas totales.....	29
7.5. Carotenos.	31
7.6. Proteínas totales.	33
7.7. Vitamina C.....	35
7.8. Compuestos fenólicos totales.	37
7.9. Capacidad antioxidante total.....	39
8. CONCLUSIÓN.	40
9. PERSPECTIVAS.....	43
10. REFERENCIAS.....	44
11. ANEXOS.	53

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de los glucosinolatos más representativos en el brócoli y sus productos de hidrólisis (Rodríguez Hernández, 2013).	7
Tabla 2. Constates físicas y factores de disipación de solventes utilizados en MAE (adaptada de Bai <i>et al.</i> , 2018 y Afoakwah <i>et al.</i> , 2012).....	14
Tabla 3. Parámetros utilizados para el Sistema Híbrido utilizado en la obtención de los extractos (Gallaher <i>et al.</i> , 2012).	16

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Cultivo de Brócoli, Puebla, México (Imagen Propia).....	6
Figura 2. A) Esquilmos de brócoli (materia prima) y B) esquilmos almacenados en cuarto frío a 4 °C (Imágenes propias).....	9
Figura 3. Hidrólisis de glucosinolatos por la enzima mirosinasa y sus diferentes productos (imagen adaptada de Vig <i>et al.</i> , 2009).	10
Figura 4. Equipo de extracción ultrasonido, microondas e híbrido (Imagen propia).	12
Figura 5. Condiciones de operación por el método de microondas (Imagen propia).	12
Figura 6. Condiciones de operación por el método de ultrasonido.....	13
Figura 7. Proceso de obtención de polvos de esquilmos de brócoli.	15
Figura 8. Proceso de obtención de los extractos de esquilmos de brócoli por Sistema Híbrido.	17
Figura 9. Bomba de vacío (ROCKER 300, AC 100V-120V, Taiwán) y cartucho (LC-SAX).	18
Figura 10. Liofilizador (Labconco, FreeZone 2.5 plus, EUA).	19
Figura 11. Espectrofotómetro GENESYS 10w.	20
Figura 12. Centrifuga VALED PRIME.....	21
Figura 13. Titulación (cambio de color rosa) para la cuantificación de vitamina C.....	22

Figura 14. Glucosinolatos (g de GLS kg ⁻¹ de tejido vegetal) en extractos de esquilmos de brócoli obtenidos mediante extracción híbrida (microondas y ultrasonido) y 3 diferentes solventes (etanol 70 %, metanol 70 % y agua).....	24
Figura 15. Contenido de clorofila a (µg de clorofila a mL ⁻¹) en extractos de esquilmos de brócoli obtenidos mediante extracción híbrida (microondas y ultrasonido) y 3 diferentes solventes (etanol 70 %, metanol 70 % y agua).....	26
Figura 16. Contenido de clorofila b (µg de clorofila b mL ⁻¹) en extractos de esquilmos de brócoli obtenidos mediante extracción híbrida (microondas y ultrasonido) y 3 diferentes solventes (etanol 70 %, metanol 70 % y agua).....	28
Figura 17. Contenido de clorofilas totales (µg de clorofilas mL ⁻¹) en extractos de esquilmos de brócoli obtenidos mediante extracción híbrida (microondas y ultrasonido) y 3 diferentes solventes (etanol 70 %, metanol 70 % y agua).....	30
Figura 18. Contenido de carotenos (µg de carotenos mL ⁻¹) en extractos de esquilmos de brócoli obtenidos mediante extracción híbrida (microondas y ultrasonido) y 3 diferentes solventes (etanol 70 %, metanol 70 % y agua).....	32
Figura 19. Contenido de proteína (mg de proteína mL ⁻¹) en extractos de esquilmos de brócoli obtenidos mediante extracción híbrida (microondas y ultrasonido) y 3 diferentes solventes (etanol 70 %, metanol 70 % y agua).....	34
Figura 20. Contenido de vitamina C (mg de ácido ascórbico 100 mL ⁻¹) en extractos de esquilmos de brócoli obtenidos mediante extracción híbrida (microondas y ultrasonido) y 3 diferentes solventes (etanol 70 %, metanol 70 % y agua).....	36
Figura 21. Contenido de compuestos fenólicos totales (µg EAG mL ⁻¹) en extractos de esquilmos de brócoli obtenidos mediante extracción	

hibrida (microondas y ultrasonido) y 3 diferentes solventes (etanol 70 %, metanol 70 % y agua).....38

Figura 22. Capacidad antioxidante total ($\mu\text{moles EAG mL}^{-1}$) en extractos de esquilmos de brócoli obtenidos mediante extracción híbrida (microondas y ultrasonido) y 3 diferentes solventes (etanol 70 %, metanol 70 % y agua).....40

1. INTRODUCCIÓN.

Un organismo especializado en la dirección de las actividades internacionales encaminadas a erradicar el hambre es la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, mejor conocida como la FAO, la cual indica que la demanda en la producción de alimentos es proporcional al aumento constante de la población mundial, creando retos excepcionales a los agricultores a nivel mundial por satisfacer dicha demanda (FAO, 2009). Pero se ha demostrado que, durante la precosecha, poscosecha y el tiempo de consumo de los alimentos, existen pérdidas de hasta un 50 % de los alimentos, demostrando que existe una mayor área de oportunidad en la reducción de dichas pérdidas que en producir cantidades más grandes de alimentos (Porat *et al.*, 2018). Los desechos orgánicos producidos anualmente por la agroindustria a nivel mundial se miden por toneladas (ton), cerca de 75 millones en México, siendo esta el área de aprovechamiento que, mediante la aplicación de tecnologías alternativas, pueden ser utilizadas en la creación de productos con alto potencial, proporcionándoles un valor agregado y consiguiendo la disminución de residuos (Valdez *et al.*, 2010).

En los procesos de precosecha y poscosecha es donde se genera la mayor cantidad de residuos debido a la corta vida de los alimentos, puesto que son altamente perecederos (Parfitt *et al.*, 2010). Durante el año 2019, a nivel mundial se produjeron 70,150,406 ton de crucíferas (incluyendo brócoli), mientras que, en México se produjeron 203,986 ton, según datos proporcionados por FAOSTAT (2021). En el caso del brócoli, entre el 60 a 75 % representa pérdidas generadas en la recolección, teniendo un monto de 15 millones de toneladas de desperdicios generados tan solo en el año 2017 (Petkowicz y Williams, 2020).

Un caso conocido de residuo agroindustrial es el esquilmo de brócoli, éste cuenta con actividad biológica benéfica, ya que el ciclo celular y la apoptosis son detenidos gracias a la descomposición metabólica de los isotiocianatos y los nitrilos, los cuales se generan a partir de los glucosinolatos. Los glucosinolatos son compuestos nutraceuticos, cuya descomposición genera sulfurafanos, en los cuales se han encontrado propiedades anticancerígenas (Domínguez-Perles *et al.*,

2010). Estos residuos de brócoli son una gran fuente de elementos de interés, de los cuales se pueden extraer una gran cantidad de compuestos con capacidad antimicrobiana (Pacheco-Cano *et al.*, 2017), compuestos fenólicos y antioxidantes (Aires *et al.*, 2017), minerales (Zhivkova y Zlateva, 2019) y glucosinolatos (Domínguez-Perles *et al.*, 2010). Estos compuestos naturales tienen un gran potencial como nueva tecnología alternativa biológicamente compatible con productos hortofrutícolas, con un alto potencial para sustituir el uso de pesticidas sintéticos y fungicidas utilizados para el control de patógenos.

Dentro de los pocos reportes sobre la utilización de los esquilmos de brócoli como tratamiento poscosecha, se han reportado que la utilización de isotiocianatos en pimiento puede inhibir en un 100 % las enfermedades causadas por la *Alternaria*, causante de la podredumbre (Troncoso *et al.*, 2005). Mientras que Gao, (2020) reportó que los isotiocianatos presentes en las crucíferas pueden inhibir el desarrollo de microorganismos, tales como: *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Escherichia coli*, entre otros, con el único contratiempo que su fuerte olor podría limitar su uso para la conservación en poscosecha de verduras y frutas.

2. JUSTIFICACIÓN.

La generación de desperdicios agroindustriales, alimentos y diversos residuos vegetales puede alcanzar niveles altos, lo que produce una pérdida considerable de material vegetal del cual todavía se pueden obtener diferentes compuestos de interés. Es por ello que la economía circular pretende retomar procedimientos más sostenibles que regresen a la cadena de valor, diferentes subproductos a base de residuos, dando valor agregado a los productos e incentivando a las industrias con mayores ganancias, evitando los desechos.

En el caso particular del brócoli, de este solo se consume la inflorescencia, dejando diferentes residuos (hojas, tallos, restos de la planta), ya sea en campo o durante su procesamiento para su transporte y venta. Estos residuos no compiten con material comestible y presenta una gran cantidad de compuestos bioactivos que pueden ser reutilizados, tales como: las clorofilas, compuestos fenólicos y los glucosinolatos. Los glucosinolatos se convierten en isotiocianatos, los cuales han demostrado tener propiedades antifúngicas, además de que al ser aplicados como tratamientos poscosecha, inhiben la producción de la hormona de maduración (etileno), retrasando la senescencia de los productos. Es por ello que, el encontrar el procedimiento adecuado para la generación de extractos a partir de esquilmos de brócoli, puede generar una metodología que permita la obtención de compuestos de interés como subproductos con potencial de ser utilizado en la industria alimentaria, siendo estos extractos de origen natural.

3. OBJETIVOS.

3.1. Objetivo general.

Determinar el efecto del empleo de diferentes solventes durante la generación de extractos mediante un sistema híbrido (microondas y ultrasonido) en residuos agroindustriales de brócoli.

3.2. Objetivos particulares.

- a) Establecer el procedimiento para la generación de extractos mediante un modelo híbrido (microondas y ultrasonido) y diferentes solventes (agua, etanol y metanol) para la obtención de compuestos de interés a partir de residuos (esquilmos) de brócoli.
- b) Determinar el contenido de glucosinolatos en los extractos empleando diferentes solventes (agua, etanol y metanol) mediante un método híbrido (microondas y ultrasonido).
- c) Valorar el contenido de vitamina C, clorofilas (*a*, *b* y totales), compuestos fenólicos y capacidad antioxidante total de los extractos generados mediante el método híbrido (microondas y ultrasonido) y el empleo de diferentes solventes (agua, etanol y metanol).
- d) Evaluar el contenido de proteína total en los extractos de brócoli por el método híbrido (microondas y ultrasonido) y por el efecto de la aplicación de diferentes solventes (agua, etanol y metanol).
- e) Definir el solvente adecuado (agua, etanol y metanol) para la obtención de compuestos de interés a partir del uso de residuos agroindustriales (esquilmos) del brócoli.

4. HIPÓTESIS.

La generación de extractos mediante el uso de microondas y ultrasonido variando el tipo de solvente (agua, etanol y metanol) permitirá acarrear diferentes compuestos de interés, permitiendo encontrar el procedimiento óptimo para obtener subproductos que puedan reintroducirse en la cadena de valor a partir de fuentes de origen vegetal considerados como desechos.

5. ESTADO DEL ARTE.

5.1. Residuos de crucíferas.

Las crucíferas de la familia de plantas Brassicaceae, son un grupo de especies hortícolas importantes, tales como: brócoli, coliflor, repollo, col china y col de Bruselas; siendo sembradas en extensiones grandes por su valor de producción y siendo las crucíferas las de mayor importancia mundial (Jaramillo y Díaz, 2006). Durante el proceso de cosecha, se generan grandes cantidades de residuos o excedentes y en la mayoría de los casos no se encuentran en mal estado (Figura 1), pero son rechazados de la cadena productiva por otros factores, como ejemplo está la superación de un parámetro que el cliente haya establecido como aceptación del producto como en el caso del peso, cuando este es superado se toman ajustes en el corte del producto, siendo dejados en el campo con los cuales alimentan al ganado o en otros casos se utiliza el residuo como material apto para realizar composta, lo anterior genera pérdidas económicas significativas al horticultor, ya que no puede darle un mejor uso a su cosecha ignorando otras serie de posibilidades para su comercialización (Appendino y Bardelli, 2010).



Figura 1. Cultivo de Brócoli, Puebla, México (Imagen Propia).

El poder emplear los residuos y reintroducirlos a la cadena de valor genera una gran ventaja, ya que esto se traduce en darle un uso a los desechos hortícolas y obtener subproductos a partir de residuos de alimentos de origen vegetal. En el caso de las crucíferas, en particular el brócoli, se puede realizar la

recuperación de compuestos como los glucosinolatos (GLS) y los isotiocianatos (IC) a partir de dichos desechos (Deng *et al.*, 2015). Para esto se han propuesto varias tecnologías que dan paso a importantes consideraciones en una estrategia general de recuperación de los subproductos en esta fuente de residuos agroindustriales (Galanakis, 2015). Estos desarrollos llevan a una recuperación económicamente viable, sostenible y segura en la obtención de productos con un alto valor a partir de los subproductos del procesado de la materia prima.

5.2. Compuestos presentes en los residuos de crucíferas.

En el transcurso de los años, se han llevado a cabo numerosas investigaciones en frutas y vegetales frescos en busca de moléculas bioactivas potentes, las cuales provean de propiedades promotoras a la salud y a la prevención de enfermedades. Actualmente, existe suficiente evidencia de que las plantas vegetales de la familia Brassicaceae, especialmente el brócoli (*Brassica oleracea* var. *Italica*), son ricas en compuestos bioactivos como: vitaminas (ácido ascórbico), minerales (manganeso, potasio y selenio), glucosinolatos y sus moléculas de degradación, carbohidratos (fibras dietéticas) y polifenoles (flavonoides y ácidos hidroxicinámicos) (Moreno *et al.*, 2006; Vasanthi *et al.*, 2009). En la Tabla 1 se presentan algunos GLS que se encuentran presentes en el brócoli y sus productos de hidrólisis.

Tabla 1. Clasificación de los glucosinolatos más representativos en el brócoli y sus productos de hidrólisis (Rodríguez Hernández, 2013).

Estructura	Nombre común	Isotiocianato asociado
Alifáticos	Glucouberina (GI)	Iberina (IB)
	Glucorafanina (GR)	Sulforafano (SFN)
	Glucouerucina (GE)	Erucina (ER)
Aromáticos	Gluconasturtina (GN)	Fenetil-iso-tiocianato (PEITC)
Indólicos	Glucobrasicina (GB)	Indol-3-carbinol (I3C)
	Neoglucobrasicina (NGB)	

5.3. Brócoli.

El brócoli (*Brassica olearacea* L. var *Itálica*), tiene sus orígenes en las costas del mediterráneo y Asia Occidental, encontrándose en la actualidad en Grecia, Turquía y Siria, para después ser llevada a España, Francia, Holanda, Dinamarca e Inglaterra. Su nombre proviene del italiano “broco” referenciando al brote, una parte comestible de la planta (Jaramillo y Díaz, 2006). En la actualidad, la temperatura media de las regiones donde se cultiva es de 18 a 23 °C. En 2011, la FAO reconoció a China como el principal productor de *Brassica* con una producción anual de más de ocho millones de toneladas por año (ton/año), en segundo lugar, la India con seis millones de ton/año, España con alrededor de un millón de ton/año y en cuarto lugar a América Latina (incluyendo a México) en cuanto a la producción mundial de brócoli (FAOSTAT, 2011).

Grandes grupos de la población le dan un alto valor a este alimento, no solo por sus buenas características organolépticas, sino por sus excelentes beneficios a la salud como sus propiedades antioxidantes, antimicrobianas, bactericidas y anticancerígenas (Ares *et al.*, 2013). La alta recomendación de verduras como las crucíferas es debido a los beneficios que aporta a la salud. Los glucosinolatos (GLS) y sus productos bioactivos de hidrólisis los isotiocianatos (IC) incluyen un grupo de glucósidos que contienen nitrógeno y azufre en abundancia en plantas de crucíferas y especies vegetales del género Brassicaceae, tales como: el brócoli, las especies de mostaza, el nabo, la col rizada, la colza, las coles, la coliflor, el repollo, etc. (Barba *et al.*, 2014).

5.4. Conservación del brócoli y sus compuestos de interés.

La necesidad de la conservación de las verduras *Brassica* surge por su naturaleza estacional y perecedera, la disponibilidad de poder contar con estos alimentos para consumo posterior y de entrega a distancias largas de las áreas agrícolas. Los productos alimentarios de *Brassica* antes de ser llevados al consumidor son procesados por diversos tratamientos poscosecha que incluyen corte, picado, refrigeración y almacenamiento (Nugrahedí *et al.*, 2015).



Figura 2. A) Esquilmos de brócoli (materia prima) y B) esquilmos almacenados en cuarto frío a 4 °C (Imágenes propias).

Durante el procesamiento, los GLS tienden a tener cambios y pérdidas, el poder predecir el grado que se presentará es una tarea difícil, ya que la naturaleza de sus productos de hidrólisis genera una gran cantidad de parámetros que estarán afectando el proceso. Estos factores en general influyen en las clases de los GLS que están dentro del material vegetal (Figura 2A), algunos incluyen parámetros de almacenamiento (variaciones en el control de la temperatura, envejecimiento o congelamiento en atmósferas controladas), las intensidades de tratamientos poscosecha (tratamiento térmicos o no térmicos) y métodos de cocción (métodos culinarios, de cortado y la temperatura de cocción) (Hanschen y Schreiner, 2017). Estudios han demostrado que las verduras de *Brassica* (brócoli, coles de Bruselas, coliflor y coles) no disminuyen significativamente su contenido de GLS estando almacenados a temperatura ambiente (12 a 22 °C) por un periodo de 7 días (Song y Thornalley, 2007). La humedad relativa ha demostrado ser un factor crítico en la retención de los GLS, por lo tanto, son esenciales las temperaturas frías (0 a 4 °C) (Figura 2B), para mantener la calidad (Rangkadilok *et al.*, 2002).

5.4.1. Glucosinolatos (GLS).

Los GLS de la familia de plantas Brassicaceae son compuestos que contienen nitrógeno y azufre, resultantes de la unión de un azúcar reductor y

donde el azufre no cuenta con hidrato de carbono (aglicona) (Schonhof *et al.*, 2004), son contribuyentes del aroma y el sabor de las Brassicaceae; esto está bajo su poder biológico que incrementa luego de ser hidrolizados (Lampe, 2003). Los GLS son estables normalmente en el interior de las células vegetales, pero, cuando sufren daños las células y tejidos vegetales, comenzarán a ser hidrolizados (Gu *et al.*, 2012).

Los principales productos que se abarcan en la descomposición de los GLS son: IC, nitrilos, tiocianatos y epitionitrilos (Figura 3). Los IC e índoles biológicamente activos se forman como resultado de la hidrólisis enzimática. El transcurso del proceso de hidrólisis de los GLS consta de dos etapas: (1) la mirosinasa se unirá covalentemente con el residuo de glucosa del glucosinolato liberando aglicona, conocido como el paso de glicosilación (Avato *et al.*, 2013; Rask *et al.*, 2000); (2) se libera la glucosa y la enzima se activará en presencia de una molécula de agua, conocida como desglicosilación. La aglicona puede ser el inestable y transformarse a ácido tioximidato-O-sulfónico para luego convertirse en IC. Los IC formados de los GLS con un grupo adherido derivado de fenilalanina o metionina, a un pH cercano a neutro, no sufren ninguna transformación adicional. A diferencia, los IC se estarán sometiendo a ciclización a oxazolidina-2-tionas (Figura 3). Los IC de los GLS con cadena lateral indol (derivada del triptófano) se convertirán en alcoholes (Patyra *et al.*, 2016; Grubb *et al.*, 2006).

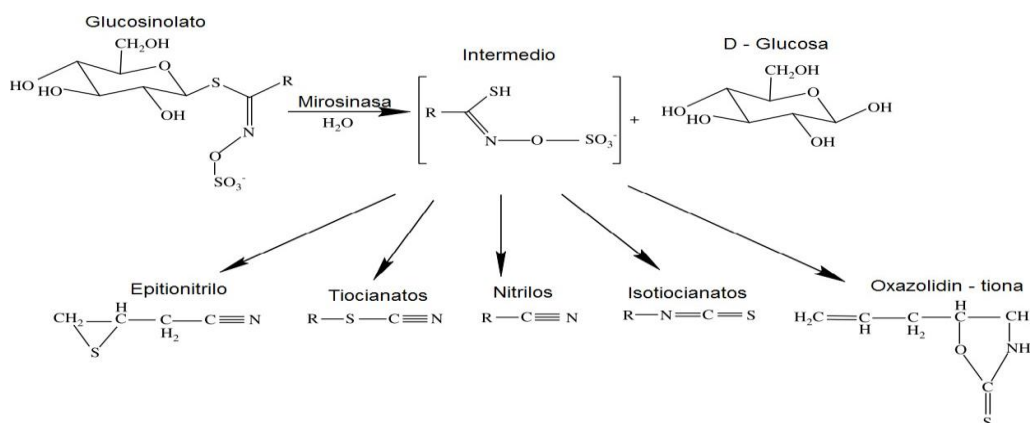


Figura 3. Hidrólisis de glucosinolatos por la enzima mirosinasa y sus diferentes productos (imagen adaptada de Vig *et al.*, 2009).

La investigación de los GLS sobre sus diferentes propiedades y aplicaciones de los IC en áreas como farmacéutica, biotecnología y alimentos es menor en comparación con investigaciones de otros bioactivos, tales como: los polifenoles y los carotenoides (Deng *et al.*, 2015). Futuras investigaciones de GLS y CI brindarán grandes oportunidades en los entornos académicos de los GLS, su aprovechamiento aún tiene un amplio camino debido a sus compuestos antimicrobianos potentes (Sultanbawa, 2011), ejemplo, la inhibición de la flora microbiana en tofu por el IC alilo (Shin *et al.*, 2010) y *Escherichia coli* O157:H7 cultivada en carne fresca (Nadarajah *et al.*, 2005). Los GLS tienen sabores únicos y característicos por los que son utilizados como saborizantes en alimentos, ejemplo, el sabor de la mostaza y el sabor del rábano picante provienen de los IC alilo, mientras que el sabor de las verduras (*Brassica*) amargo proviene de la sinigrina y progoitrina (Van Doorn *et al.*, 1998).

5.5. Métodos de extracción.

Los métodos emergentes y alternativos utilizados en la extracción son conocidos por sus beneficios, tales como: la reducción significativa en el tiempo de extracción, la reducción de los solventes orgánicos, los cuales representan un riesgo a la salud por el grado de toxicidad. La aplicación de una técnica híbrida en el procesamiento de residuos agroindustriales, basado en el conocimiento teórico con el efecto sinérgico concomitante y la experimentación permitan la eliminación de los defectos de cada técnica individual (Chen *et al.*, 2016), el uso de la irradiación simultánea inducida por la mejora de la transferencia de masa (ultrasonido) y calor (microondas) (Lou *et al.*, 2017).

5.5.1. Microondas.

La extracción asistida por microondas (MAE) se considera como una técnica de extracción verde por sus beneficios, tales como: la reducción del tiempo de extracción y el bajo consumo de disolventes. El método de MAE consiste en la aplicación de radiación electromagnética de microondas, éste calienta un dieléctrodo por rotación dipolar molecular de los componentes polares presentes

en la matriz (Ran *et al.*, 2019), el equipo se observa en la Figura 4. Se conoce que el método de MAE consta de 4 etapas distintas, esto por los resultados de los gradientes de calor y de masa generados de la matriz: (1) la penetración del solvente a la matriz, (2) la solubilización y/o descomposición de los componentes, (3) los compuestos solubilizados de la matriz soluble se transportan a la solución a granel y (4) la separación de la fase líquida y sólida residual (Veggi *et al.*, 2013; Talmaciu *et al.*, 2015). Hay varios parámetros a considerar en la optimización del proceso de MAE, tales como: relación de sólido a solvente, temperatura, potencia de extracción y tiempo de extracción (Figura 5). Una clave importante en la extracción por MEA es la cantidad de solvente, ya que al elegirse adecuadamente se garantizará una completa inmersión de la muestra en el proceso de irradiación, evitando gastos innecesarios de energía y tiempo en la recuperación final de los compuestos extraídos (Talmaciu *et al.*, 2015).



Figura 4. Equipo de extracción ultrasonido, microondas e híbrido (Imagen propia).

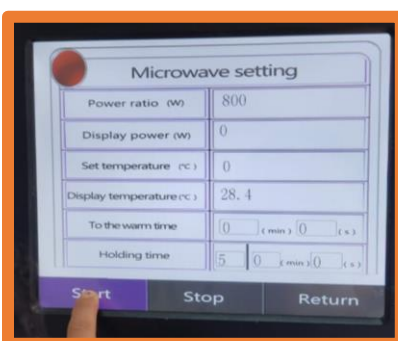


Figura 5. Condiciones de operación por el método de microondas (Imagen propia).

5.5.2. Ultrasonido.

La extracción asistida por ultrasonido (UAE) al igual que la MAE, cuenta con las ventajas de la reducción del tiempo y la cantidad de disolvente, los cuales son necesarios para realizar una extracción eficiente en los residuos agroindustriales. La UAE es considerado como uno de los procedimientos más simples, pues se requiere de equipamiento de laboratorio común, el equipo se observa en la Figura 6. La UAE se basa en el proceso de cavitación asociada al paso de ultrasonidos (frecuencia 20 – 100 MHz) a través de la muestra, los parámetros de óptimos se observan en la Figura 6. Las colisiones entre partículas son debidas a la implosión de las burbujas de cavitación, que dan como resultado la disrupción de las partículas, una mayor difusión de los compuestos extraíbles en el solvente, entre otros. Las características como reología, consistencia y movilidad de las partículas provocan una ineficiencia en la dispersión de la energía ultrasónica, por lo tanto, afectarían la eficiencia de la UAE (Talmaciu *et al.*, 2015).

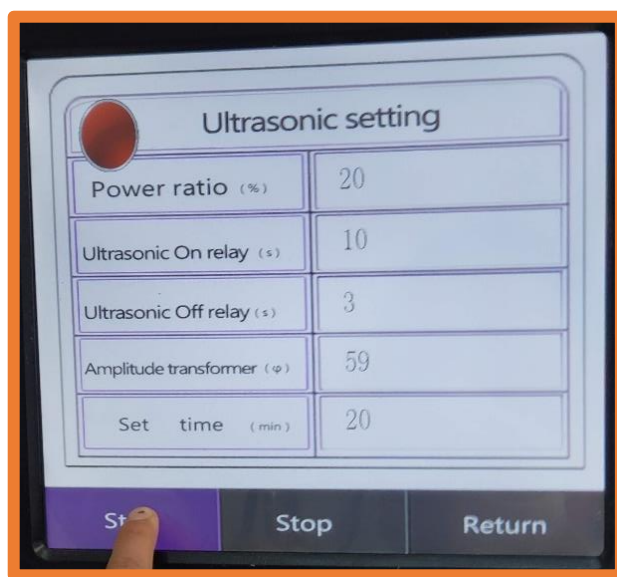


Figura 6. Condiciones de operación por el método de ultrasonido (Imagen propia).

5.6. Solventes en los métodos de extracción.

Una característica peculiar de los antioxidantes es su solubilidad, por lo que no existe un método universal de extracción con determinado solvente específico

para obtener los diferentes compuestos de interés. Los solventes como etanol, metanol y agua, en diversas proporciones, han sido ampliamente utilizados comúnmente en la extracción de compuestos fenólicos. El método MAE permite una completa extracción de los compuestos de interés, evitando la modificación química (Santos y Gonçalves, 2016), la destreza del solvente en MAE depende de su absorción de energía y pasarla en forma de calor, lo que depende en parte del factor de disipación. En la Tabla 2, se presentan algunos parámetros dieléctricos y factores de disipación de algunos solventes utilizados (Bai *et al.*, 2018; Afoakwah *et al.*, 2012).

Tabla 2. Constates físicas y factores de disipación de solventes utilizados en MAE (adaptada de Bai *et al.*, 2018 y Afoakwah *et al.*, 2012).

Disolvente	Constante dieléctrica (g)	Momento dipolar	Factor de disipación Tan δ (x'4)	Punto de ebullición (°C)
Etanol	24.3	1.96	2500	78
Metanol	32.6	2.87	6400	65
Agua	79.3	2.30	1570	100

Cuando se emplea UAE como método de extracción, se entiende como un método poco selectivo por la polaridad del solvente empleado, un ejemplo utilizado es el agua como solvente en la extracción asistida por UAE, en el extracto final se encontrarán con todas las sustancias de naturaleza polar, ya que las sustancias tienen afinidad con el agua y son solubles en ella (Chemat *et al.*, 2016).

6. MATERIALES Y MÉTODOS.

6.1. Material vegetal.

En la elaboración de los diferentes extractos (Figura 7), el residuo agroindustrial (esquilmos de brócoli) fue obtenido de Puebla, México. Tras la llegada de la materia prima, ésta fue almacenada a 4 °C en un cuarto frío para su posterior uso. Los esquilmos de brócoli pasaron por un lavado, posteriormente se cortaron en trozos más pequeños los cuales fueron colocados en charolas de aluminio, después fueron llevados a una estufa (Yamato, Constant temperature oven, China) para su secado a 45 °C por un lapso de tiempo de 24 h. El reducir el tamaño del esquilmo brinda una mayor deshidratación en menos tiempo.

Las hojas secadas pasaron por un proceso de triturado en molino industrial (American, EUA) durante 1 min. La molienda se realizó por tandas y el material obtenido fue almacenado en papel aluminio para evitar el contacto con la luz solar y en un desecador para evitar la humedad. Estas muestras pasaron por un tamizado en malla número 100, con el fin de obtener partículas con un tamaño $\leq 150 \mu\text{m}$, lo que resultó en un polvo fino de esquilmos de brócoli. Las muestras fueron guardadas al igual que antes, envueltas en papel aluminio para evitar factores externos y colocadas en el desecador.



Figura 7. Proceso de obtención de polvos de esquilmos de brócoli.

6.2. Métodos de extracción.

El método de extracción empleado fue el sistema híbrido, donde se utilizan los métodos de microondas y ultrasonido mediante el equipo Ultrasonic – Microwave Cooperative Workstation (potencia del equipo 2500 W, Atpio, XO-SM400, Nanjing, China) (Gallaher *et al.*, 2012). Los parámetros utilizados observan en la Tabla 3.

Tabla 3. Parámetros utilizados para el Sistema Híbrido utilizado en la obtención de los extractos (Siguiendo la metodología de Gallaher *et al.*, 2012).

Microondas	Ultrasonido
800 W - power ratio	20 W - power ratio
0 - display pwr	10 w - on relay
70 °C - set temperature	3 - off relay
0 – to the warm time	59 - amp. transferer
50 min - holding time	20 min - set time

6.3. Tratamientos a base de diferentes solventes.

Lo solventes empleados fueron agua, etanol y metanol, por lo que se contó con un total de 3 diferentes extractos considerados como: (1) agua (extracto acuoso) [B-HIB-A], (2) etanol al 70 % [B-HIB-E] y (3) metanol al 70 % [B-HIB-M].

6.4. Generación de extractos a partir de esquilmos de brócoli.

Para la obtención de los extractos (Figura 8), se pesaron 44.44 g de la muestra tamizada de los esquilmos de brócoli, colocándolos en una hoja pequeña de aluminio. El tratamiento consistió en la inactivación de la enzima mirosinasa, iniciando con el calentamiento del solvente en una parrilla eléctrica (Talboys, Hotplate/Stirrer, EUA) hasta alcanzar y mantener la temperatura en 80 °C, una vez alcanzada la temperatura se mezclaron por un lapso de tiempo de 20 min (cada solvente tuvo el mismo procedimiento), una vez atemperados los extractos se

filtraron 3 veces con malla tela y papel filtro antes de llevarlos a almacenar para su posterior caracterización.



Figura 8. Proceso de obtención de los extractos de esquilmos de brócoli por Sistema Híbrido.

6.5. Caracterización de los extractos

6.5.1. Contenido de glucosinolatos.

El proceso de determinación de glucosinolatos comenzó con la purificación del extracto. Primeramente, se realizó un pretratamiento del extracto centrifugando (Centrifuga VALED_{PRIME}, EUA) 5 mL de extracto a 4000 rpm por un lapso de 3 min. El primer paso fue la purificación del extracto con cartuchos LC-SAX (Supelco®, Analytical Products, EUA), el cartucho fue colocado en una aguja de jeringa en un corcho, se utilizó como tapón en un matraz de vacío conectado a una bomba de

vacío (ROCKER 300, AC 100 V-120 V, Taiwán; Figura 9) para una rápida filtración. Con la bomba activa, el cartucho fue primeramente activado 3 mL de metanol, 3 mL de agua, 2.5 mL de acetato de sodio 0.5 M y 2 mL de agua (agregando uno tras otro lentamente), después se agregaron 3 mL de extracto y se lavó con 2.5 mL de agua y, finalmente, se realizó una emulsión con 3 mL de NaCl 0.5 M, colocando un tubo de ensaye para recuperar el extracto purificado.



Figura 9. Bomba de vacío (ROCKER 300, AC 100 V-120 V, Taiwán) y cartucho (LC-SAX).

El extracto purificado fue liofilizado (Labconco, FreeZone 2.5 plus, EUA) durante 36 h, el liofilizado se colocó en tubos de microcentrífuga. En un tubo diferente se colocaron 40 mg de liofilizado adicionando 700 μ L de buffer de acetato 0.2 M, pH 4.2 a temperatura ambiente, se agitó por 15 min, pasando los minutos se agregaron 100 μ L de acetato de plomo y bario a 0.5 M, agitando en vórtex (Genie 1, Touch Mixer, EUA). Una vez agitado se añadieron 50 mg de PVPP (polivinil polipirrolidona) y se incubó por 10 min a temperatura ambiente, seguido por 100 μ L de sulfato de sodio 2 M y se centrifugó (PrismR, Lobnet international, EUA) a 13000 rpm por 5 min a temperatura ambiente.



Figura 10. Liofilizador (Labconco, FreeZone 2.5 plus, EUA).

Después de la centrifugación, se tomaron 0.2 mL de la purificación tratada con PVPP y se mezclaron con 0.2 mL de hidróxido de sodio 2 M, incubándolo por 30 min. Posteriormente, se añadió 30 μ L de ácido clorhídrico concentrado y se centrifugó a 4000 rpm por 10 min. Para la medición espectrofotométrica se tomaron 100 μ L de la purificación tratada y se mezcló con 100 μ L de solución de ferricianuro 2 mM en buffer fosfato 0.2 M, pH 7. Finalmente, se midió la absorbancia de la solución a 420 nm antes de 15 s, utilizando como blanco el buffer de fosfato 0.2 M, pH 7. Se calculó el contenido de glucosinolatos totales con la fórmula de la pendiente obtenida de la curva de calibración de sinigrina empleando las siguientes ecuaciones (1 y 2):

$$y = mx + b \text{ (formula de la pendiente)} \quad (\text{Ecuación 1}).$$

$$x = (y - b) / m \text{ (despeje)} \quad (\text{Ecuación 2}).$$

6.5.2. Clorofilas a, b y totales.

Para la medición de las clorofilas, los tres extractos generados a partir de diferentes solventes fueron diluidos apropiadamente con metanol al 80 %: el extracto B-HIB-E tuvo una dilución con relación 1:10, el extracto B-HIB-Me tuvo

una dilución con relación 1:2, el extracto B-HIB-A se mantuvo sin diluir. Posteriormente, se centrifugaron a 4000 rpm por 15 min. Se realizó un triplicado de cada extracto y se midió la absorbancia a 652, 665 y 470 nm en un espectrofotómetro (GENESYS 10uv, EUA) (Figura 11).



Figura 11. Espectrofotómetro GENESYS 10w.

Se calculó el contenido de clorofilas mediante las siguientes ecuaciones (3-5):

$$Cl a = 16.72A_{665} - 9.16A_{652} \quad (\text{Ecuación 3}).$$

$$Cl b = 34.09A_{652} - 15.28A_{665} \quad (\text{Ecuación 4}).$$

$$Cl \text{ totales} = Cl a + Cl b \quad (\text{Ecuación 5}).$$

Para el cálculo del contenido de carotenoides se empleó la siguiente ecuación (6):

$$C_x + c = (1000 A_{470} - 1.63 Cl a - 104.96 Cl b)/221 \quad (\text{Ecuación 6}).$$

Finalmente, la concentración de los diferentes pigmentos se reportó en el contenido de clorofilas en $\mu\text{g g}^{-1}$ de tejido o peso fresco $\mu\text{g mL}^{-1}$ de extracto.

6.5.3. *Proteínas.*

Un total de 500 μL del extracto (por triplicado) se homogenizó con 5 mL de solución de fosfatos (buffer de fosfatos, pH 7, 1 M) junto con 25 mg de PVPP en frío. La solución se centrifugó (Centrifuga VALED_{PRIME}, EUA) (Figura 12) a 3000 rpm. La mezcla de reacción está constituida por tres partes: 100 μL de la muestra (homogenizada), 200 μL de colorante de Bradford y 700 μL de agua destilada. Su absorbancia se determinó a 620 nm. Se realizó una curva estándar con albúmina de suero bovino. Los resultados del contenido de proteínas se reportaron como mg de proteína mL^{-1} de extracto.



Figura 12. Centrifuga VALED PRIME.

6.5.4. *Vitamina C.*

Una alícuota de 1 mL del extracto (por triplicado) se le añadió 1 mL de solución metafosfórico/ácido acético, junto a 8 mL de agua destilada. Se emplearon 2 gotas de fenolftaleína para su titulación con el reactivo de Thielmann, hasta el viraje (cambio de color a un rosa, Figura 13) y anotando los mL empleados del reactivo de Thielmann.



Figura 13. Titulación (cambio de color rosa) para la cuantificación de vitamina C.

El contenido de vitamina C fue calculado mediante la siguiente ecuación, donde se obtuvo el porcentaje de ácido ascórbico:

$$\% \text{ ácido ascórbico} = \frac{\text{mL gastados de reactivo de Thielmann} * \text{FT} * \text{FD} * 100}{\text{VA} * \text{P}} \quad (\text{Ecuación 7}).$$

6.5.5. Compuestos fenólicos totales.

La medición de los compuestos fenólicos totales se realizó por espectrofotometría a 765 nm, cuya mezcla de reacción consistió en 100 µL del extracto (B-HIB-E, B-HIB-Me y B-HIB-A, por triplicado), 500 µL del reactivo Folin-Ciocalteu (dilución con agua 1:10 v/v) y dejándolos reaccionar por 1 min. Con su tiempo de reacción concluido, se agregaron 400 µL de carbonato de sodio al 7.5 % (p/v) y se homogenizó, dejando incubar por 30 min a temperatura ambiente. Una vez concluido el tiempo se midió la absorbancia a 765 nm (GENESYS 10w, EUA). Se empleó una curva patrón de ácido gálico (0-100 µg de ácido gálico mL⁻¹) para reportar los resultados como µg equivalentes de ácido gálico (EAG) mL⁻¹ de extracto.

6.5.6. Capacidad antioxidante total.

La capacidad antioxidante se mide mediante la reacción de una mezcla de 50 µL del extracto diluido (5 µL de extracto y 45 µL de metanol al 80 %) junto a la

adición de 950 μL de DPPH, con un tiempo de reacción de 15 min para posteriormente pasar a leer la absorbancia a 515 nm en el espectrofotómetro (GENESYS 10w, EUA). Se empleó una curva patrón de ácido gálico (0-294 μmoles de ácido gálico mL^{-1}) para reportar los resultados como μmoles EAG mL^{-1} de extracto.

6.6. Diseño experimental.

Se generarán 3 diferentes extractos a partir de diferentes solventes (agua, etanol y metanol) mediante un método híbrido empleando microondas y ultrasonido en esquilmos de brócoli. Se analizará el contenido de compuestos de interés por triplicado.

6.7. Análisis estadístico.

Cada una de las pruebas se realizó por triplicado, representándolas con una media \pm desviación estándar con el objetivo de asegurar la reproducibilidad de los resultados, lográndose a través de un análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de significancia de $p < 0.05$, utilizando la prueba de comparación múltiple de Tukey-Kramer a través del programa estadístico NCSS (2004). Se utilizó el programa SigmaPlot (versión 14.0) para la obtención de las gráficas.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

7.1. Glucosinolatos.

El contenido de glucosinolatos presentes en la Figura 14, muestra que los extractos con solvente metanol y agua no presentan diferencia significativa entre ellos ($p>0.05$), mientras que el solvente etanol mostró diferencia significativa ($p<0.05$); siendo el solvente que permitió extraer una mayor cantidad de GLS.

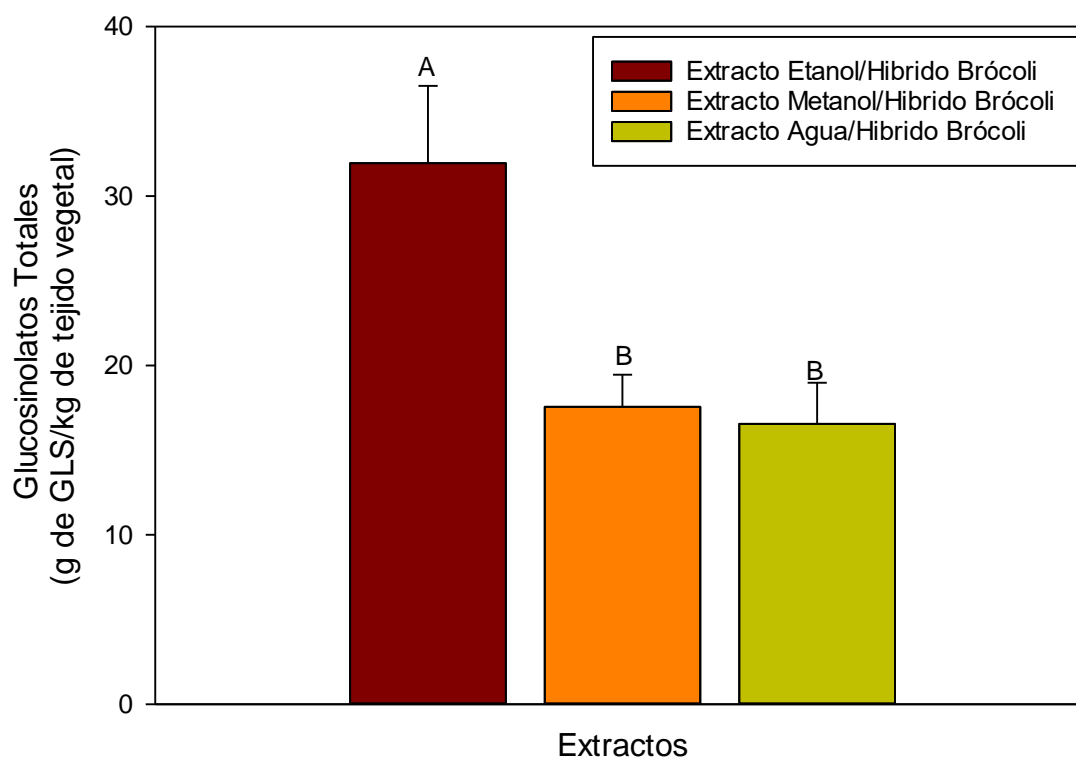


Figura 14. Glucosinolatos (g de GLS kg^{-1} de tejido vegetal) en extractos de esquilmos de brócoli obtenidos mediante extracción híbrida (microondas y ultrasonido) y 3 diferentes solventes (etanol 70 %, metanol 70 % y agua). Letras diferentes indican diferencias significativas entre solventes ($p<0.05$) mediante un análisis de varianza (ANOVA) y prueba *post hoc* de Tukey.

Omrou *et al.* (2009) analizaron la extracción de glucosinolatos de *Eruca sativa* (Rúcula) por un sistema de microondas, en el cual se desarrolló y optimizó el proceso con dos diferentes solventes: etanol y metanol. Los Autores compararon el método de extracción de microondas con el de ultrasonido y con el método ISO-9167. Sus resultados indican que, mediante el uso de microondas y

el solvente metanol, la extracción de los GLS se optimiza. Además, Omirou *et al.* (2009) demostraron que tanto su método como el ISO, mostraron eficiencias comparables con un total de GLS aproximado de 110 $\mu\text{mol/g}$, pero con un tiempo más corto (10 min). Por lo tanto, la extracción empleando microondas demostró ser un método más rápido y sencillo, útil para la extracción de GLS de vegetales *Brassica* (Omirou *et al.*, 2009). Los resultados de este trabajo se correlacionan con los solventes y estándar (sinigrina) para la determinación de los glucosinolatos, donde el sistema híbrido se benefició al emplear el solvente etanol, teniendo una gran capacidad de extracción (con 31.4 g/kg de tejido vegetal), utilizando un solvente menos tóxico en comparación con el metanol, con un periodo de extracción corto y un método sencillo, siendo un sistema óptimo para la extracción de GLS (etanol/sistema híbrido).

Radosevic *et al.* (2017) investigaron el potencial *in vitro* de los glucosinolatos de *Brassica* (*Brassica oleracea* var. *Acephala* L.), realizando una extracción convencional de inflorescencias de brócoli, utilizando metanol al 70 %; donde obtuvieron un contenido total de 297.66 mmol 100 g⁻¹ peso fresco de glucosinolatos.

La técnica de ultrasonido utilizada en la industria alimentaria mejora la extracción debido a la creación de ondas de presión de la técnica en los solventes, conocido como fenómeno de cavitación (Soria *et al.*, 2010). Esto fomenta la penetración de disolventes y la difusión de masa (Vilkhu *et al.*, 2008). Mientras que la técnica de microondas es la irradiación electromagnética del solvente polar y los materiales resultantes del sobrecalentamiento de las células vegetales (Wang *et al.* 2006).

Deng *et al.* (2015) evaluaron los efectos del procesamiento convencional y no convencional de los glucosinolatos para establecer las condiciones óptimas para preservar glucosinolatos de vegetales *Brassica*, donde el sistema híbrido presenta un mayor rendimiento ante el método convencional. Wang *et al.* (2006) demostraron que las extracciones por microondas y ultrasonido logran mayores

rendimientos en glucosinolatos en comparación a los procesos tradicionales, correlacionando con los resultados del sistema híbrido en rendimiento y eficiencia.

7.2. Clorofila a.

El conteo de clorofila a mostró concentraciones diferenciadas entre tratamientos, observando que cada solvente proporcionó diferentes concentraciones de este compuesto de interés. La Figura 15, presenta los resultados de la clorofila a, donde se observa que el extracto acuoso (agua) contiene la mayor cantidad de clorofila a ($\mu\text{g g}^{-1}$) de manera significativa ($p < 0.05$), seguido del extracto con solvente de etanol y, finalmente, la menor cantidad extraída fue por el solvente metanol (Figura 15).

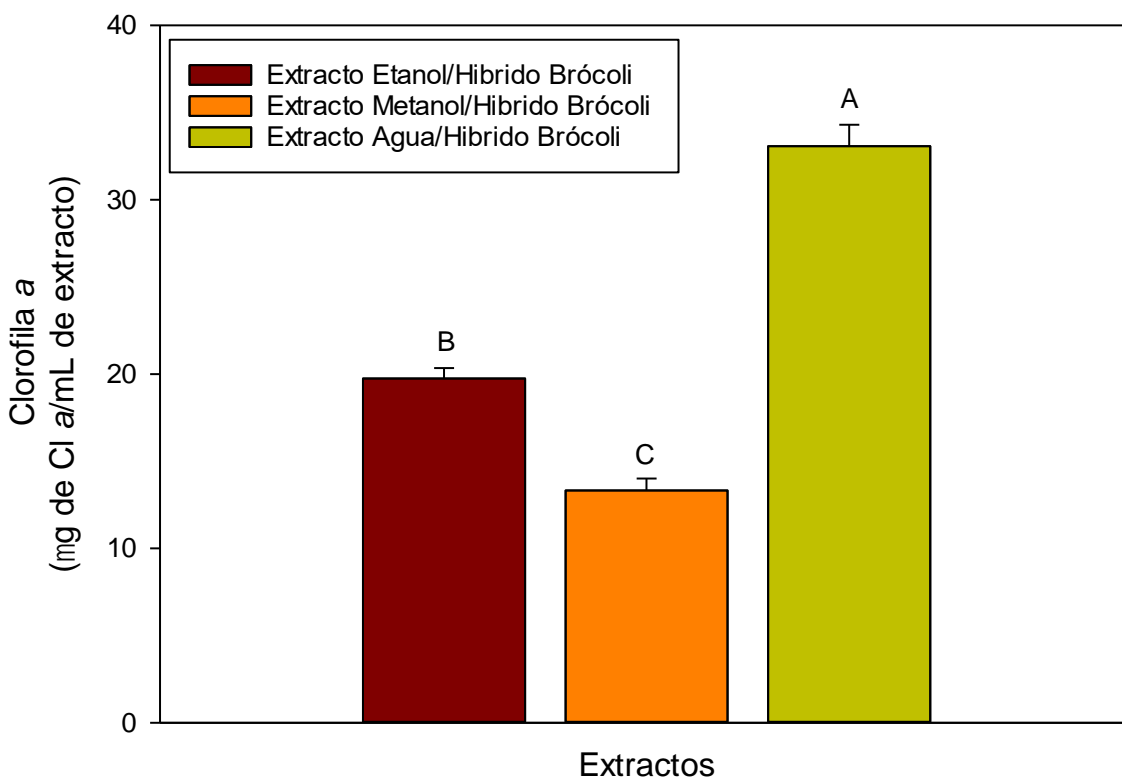


Figura 15. Contenido de clorofila a (μg de clorofila a mL^{-1}) en extractos de esquilmos de brócoli obtenidos mediante extracción híbrida (microondas y ultrasonido) y 3 diferentes solventes (etanol 70 %, metanol 70 % y agua). Letras diferentes indican diferencias significativas entre solventes ($p < 0.05$) mediante un análisis de varianza (ANOVA) y prueba *post hoc* de Tukey.

El trabajo realizado por Kong *et al.* (2014) emplearon microalgas, éstas producen una gran variedad de biomateriales, uno de ellos es la clorofila. Chen y

Jiang, (1999) informaron que la mayoría de las algas cultivadas en condiciones óptimas contenían alrededor del 4 % del peso seco de clorofila del peso total de las células. Las cianobacterias suelen contener clorofila *a* (Deng *et al.* 2008). El objetivo del trabajo fue aplicar métodos estadísticos para optimizar los parámetros UAE de las clorofilas de los residuos de algas verdes, donde determinación el contenido de clorofila empleando metanol y etanol como solvente de extracción. El contenido máximo de clorofila *a* (4.76 mg/g) se obtuvo empleando etanol al 80 % (Deng *et al.* 2008).

El sistema híbrido utilizado en este trabajo utilizó solventes similares, para observar su rendimiento con un sistema híbrido, la correlación entre ambos trabajos está en que se logró obtener buenos rendimientos, con el beneficio del sistema híbrido. Sin embargo, el solvente agua fue el que permitió obtener una mayor cantidad de clorofila *a*. Si bien, las cantidades extraídas no son comparables entre trabajos, el sistema híbrido con valores más bajos en la potencia de ultrasonido benefició al solvente más seguro (agua), con algunas diferencias significativas entre solventes.

La comparación cinética de la radiación de microondas y ultrasonido en el secado de brócoli por realizado por Cao *et al.* (2020), observando el efecto sobre las propiedades fitoquímicas del brócoli, la protección sobre la clorofila *a* fue más elevada con la radiación de microondas obteniendo 1,365.6 µg/g de peso seco, seguido del ultrasonido con 1,087.9 µg/g de peso seco.

El estudio realizado por Gudiño *et al.* (2022) evaluaron los subproductos del cultivo de brócoli (hoja, tallo e inflorescencia), mediante la utilización del ultrasonido y el etanol al 80 % como solvente, obteniendo la mayor concentración de la clorofila *a* en hoja con 56.39 mg/100 g de peso seco. Al igual que en el sistema híbrido, que busca los mejores efectos en la combinación de ambas técnicas (ultrasonido, microondas) y la utilización de solventes ecoamigables.

7.3. Clorofila *b*.

La Figura 16 presenta las cantidades obtenidas en la extracción de la clorofila *b* en cada uno de los solventes (etanol, metanol y agua), mostrando las diferentes cantidades de la clorofila *b* extraídas durante el método híbrido. Demostrando que el mejor solvente es el agua con una diferencia significativa ($p < 0.05$) con el solvente etanol y la menor cantidad extraída pertenece al solvente metanol.

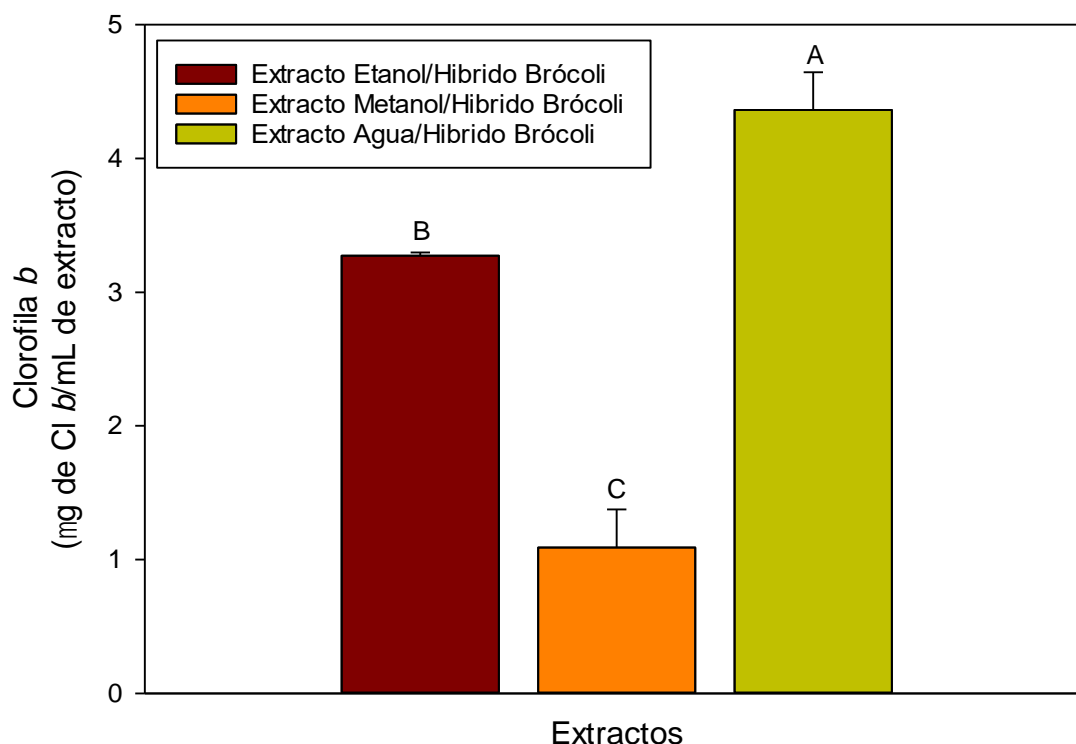


Figura 16. Contenido de clorofila *b* (μg de clorofila *b* mL^{-1}) en extractos de esquilmos de brócoli obtenidos mediante extracción híbrida (microondas y ultrasonido) y 3 diferentes solventes (etanol 70 %, metanol 70 % y agua). Letras diferentes indican diferencias significativas entre solventes ($p < 0.05$) mediante un análisis de varianza (ANOVA) y prueba *post hoc* de Tukey.

En el trabajo realizado por Kong *et al.* (2014) emplearon *Chlorella*, la cual es un tipo de alga comestible, donde bajo el sistema de ultrasonido optimizado y utilizando solventes verdes (acetona, metanol, etanol y combinaciones) obtuvieron la extracción de clorofilas. Según Chen y Jiang, (1999) la *Chlorella* es un organismo unicelular que crece en el agua y tiene un alto valor nutricional,

mientras que las especies de algas verdes en su mayoría tienen clorofila *b* (Deng *et al.* 2008).

El objetivo principal del trabajo de Kong *et al.* (2014) fue aplicar métodos estadísticos para optimizar los parámetros UAE de las clorofilas de los residuos de algas verdes, donde el contenido máximo de clorofila *b* (9.48 mg/g) se obtuvo con etanol al 80 %. En nuestro trabajo, el sistema híbrido correlaciona con los resultados de Kong *et al.* (2014), donde la relación solvente/agua es menor. El sistema híbrido permite obtener una buena cantidad de clorofila empleando el solvente más seguro (agua), con algunas diferencias significativas entre solventes.

La comparación cinética de secado por la radiación de microondas y ultrasonido en las propiedades fitoquímicas del brócoli realizado por Cao *et al.* (2020), observando el mayor efecto en la radiación de microondas sobre la protección de la clorofila *b*, obteniendo 415.5 µg/g de peso seco, seguido del ultrasonido con 331 µg/g de peso seco. El estudio realizado por Gudiño *et al.* (2011) evaluaron los diferentes subproductos (hoja, tallo e inflorescencia) procedentes del cultivo del brócoli, como una fuente valiosa de compuestos bioactivos, mediante la utilización del ultrasonido y el etanol al 80 % como solvente, obteniendo el mayor rendimiento de clorofila *b* en hoja con 20.04 mg/100 g de peso seco. Cao *et al.* (2020) y Gudiño *et al.* (2011) correlacionan con el sistema híbrido, ya que demuestran que ambas técnicas benefician la extracción de clorofila, utilizando una metodología simple y ecoamigable.

7.4. Clorofilas totales.

El contenido de ambas clorofilas (*a* y *b*) se representa como clorofilas totales en µg mL⁻¹ (Figura 17). Cada uno de los solventes utilizados (etanol, metanol y agua) presentaron diferencias significativas, donde el mejor solvente para la extracción de clorofilas totales fue el solvente agua con un nivel de significancia de $p < 0.05$. De forma escalonada, se observa que el siguiente mejor solvente es el metanol, no muy por debajo del agua, dejando al final al etanol que mostró la menor cantidad extraída de clorofilas totales (Figura 17).

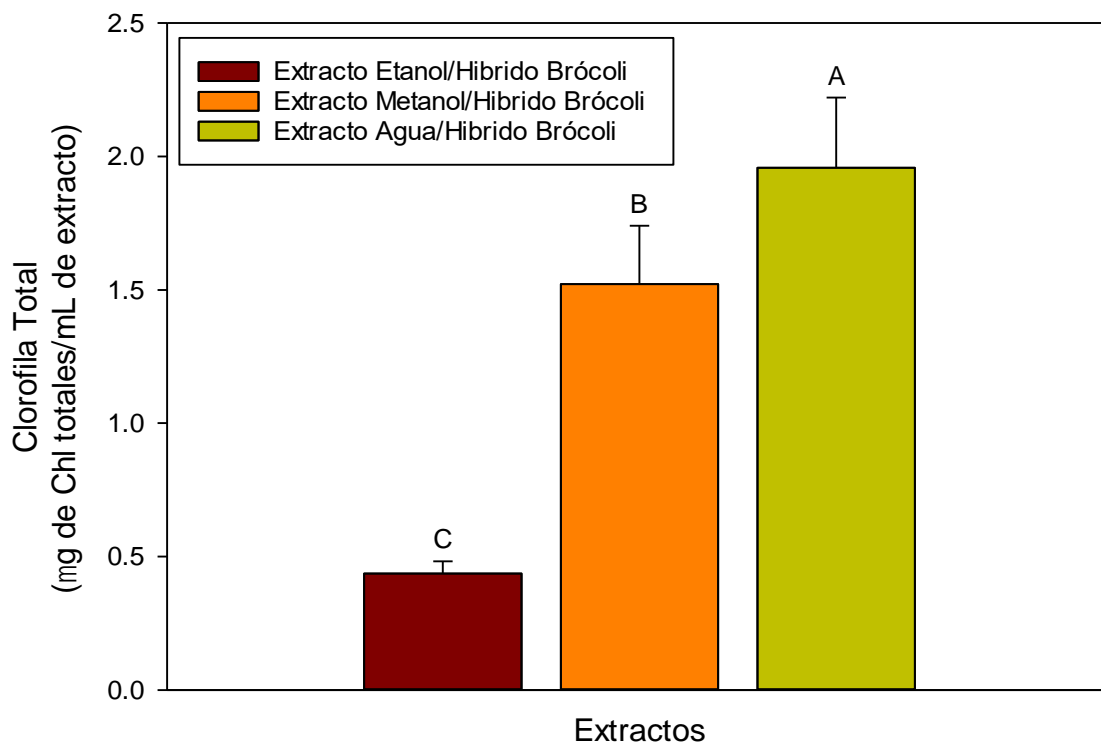


Figura 17. Contenido de clorofilas totales (μg de clorofilas mL^{-1}) en extractos de esquilmos de brócoli obtenidos mediante extracción híbrida (microondas y ultrasonido) y 3 diferentes solventes (etanol 70 %, metanol 70 % y agua). Letras diferentes indican diferencias significativas entre solventes ($p < 0.05$) mediante un análisis de varianza (ANOVA) y prueba *post hoc* de Tukey.

Nakanishi, (2001) reporta que el alto contenido de clorofila de la *Chlorella* se le atribuye el otorgamiento de muchas de sus propiedades beneficiosas. El trabajo realizado por Kong *et al.* (2014) contiene altas cantidades de clorofila, utilizando ultrasonido optimizado para la extracción de clorofila mediante solventes como metanol y etanol. El metanol al 80 % fue el solvente más eficiente para la extracción de clorofila total (14.2 mg/g). En nuestro trabajo se logró obtener la mayor cantidad de clorofilas totales con el solvente más seguro (agua).

El estudio realizado por Cao *et al.* (2020), utilizando la radiación de microondas y ultrasonido en el secado del brócoli y el efecto observado en las propiedades fitoquímicas, observando el mayor efecto en la radiación de microondas sobre la protección de la clorofila total, obteniendo 1,781.1 $\mu\text{g/g}$ de peso seco, seguido del ultrasonido con 1,419 $\mu\text{g/g}$ de peso seco. Observando que

microondas obtuvo una mayor retención de clorofilas, mientras que el efecto del ultrasonido fue mejorar la protección de los compuestos bioactivos del brócoli.

Gudiño *et al.* (2022) evaluaron los compuestos bioactivos de subproductos de brócoli (hoja, tallo e inflorescencia), mediante la utilización de ultrasonido y etanol al 80 % como solvente, obteniendo el mayor rendimiento de clorofila total en hoja con 76.42 mg/100 g de peso seco. El sistema híbrido presenta ambas técnicas (ultrasonido, microondas), por sus efectos combinados en la extracción de clorofila y para evitar la degradación térmica, utilizando de solventes verdes en tiempos cortos, minimizando costos, ecoamigable y económico para la industria alimentaria.

7.5. Carotenos.

El sistema híbrido (microondas – ultrasonido), permitió obtener carotenos, aunque se presenta una diferencia significativa ($p < 0.05$) con el solvente etanol, ya que este presentó una cantidad superior en comparación con los dos solventes restantes (metanol y agua), el segundo mejor solvente fue el metanol y, finalmente, el que menor cantidad obtuvo fue el solvente agua (Figura 18). Si bien estos últimos tienen cantidades elevadas de carotenos, estos no superan al extracto con etanol.

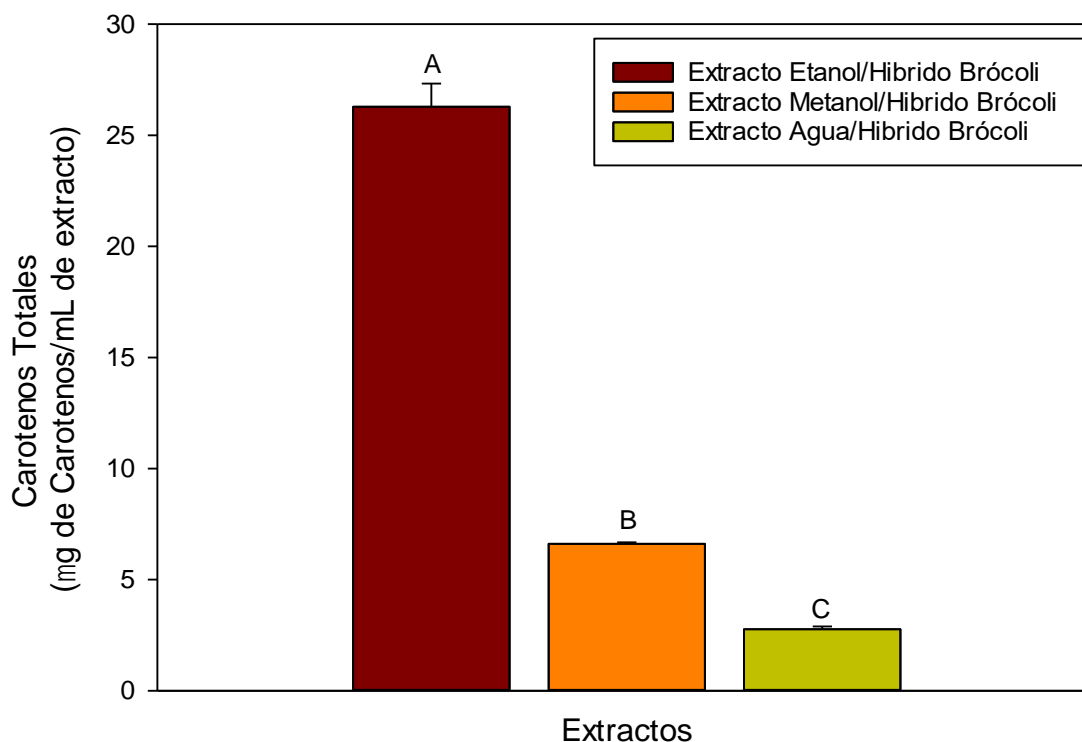


Figura 18. Contenido de carotenos (μg de carotenos mL^{-1}) en extractos de esquilmos de brócoli obtenidos mediante extracción híbrida (microondas y ultrasonido) y 3 diferentes solventes (etanol 70 %, metanol 70 % y agua). Letras diferentes indican diferencias significativas entre solventes ($p < 0.05$) mediante un análisis de varianza (ANOVA) y prueba *post hoc* de Tukey.

Vieira *et al.* (2022) extrajeron carotenos de hojas de *Sechium edule*, mediante ultrasonido y microondas de forma independiente cada método, y utilizando un total de siete solventes diferentes (etanol, agua, acetona y combinaciones al 80 %), resultado que el método ultrasonido es el más efectivo para la extracción de pigmentos como carotenos. Kim *et al.* (2016) emplearon el sistema optimizado de ultrasonido y solvente (50:50 de etanol y agua), donde demostraron una mayor eficiencia en la extracción de carotenoides de hasta 0.85 ± 0.02 mg/g de peso seco de extracto.

El método de ultrasonido ofrece un enfoque rentable y eficiente en cuanto a tiempo para la extracción de compuestos de valor (Chen *et al.*, 2020). El presente estudio empleando sistema híbrido (ultrasonido-microondas) utilizó parámetros de ultrasonido más bajos (20 Watts) a un tiempo menor de 20 min, junto un nivel alto de extracción por el solvente etanol al 70 %, con $26.28 \mu\text{g}$ de carotenos mL^{-1} ,

demostrando que igualmente los esquilmos de brócoli son una fuente con un buen contenido de carotenos.

Chuyen *et al.* (2018) reportaron que la cáscara de la fruta *Momordica cochinchinensis* Spreng posee altos niveles de carotenos, comparando los sistemas de microondas y ultrasonido como técnicas de extracción. Los Autores utilizaron acetato de etilo como solvente, obteniendo valores más elevados con ultrasonido con rendimiento de 268 mg/100 g de peso seco y 262 mg/100 g de peso seco, respectivamente (microondas y ultrasonido). El sistema híbrido presenta ambas técnicas (ultrasonido y microondas) correlacionando en la efectividad y el uso de solventes considerados “verdes”, siendo un sistema económico para el área industrial de alimentos.

Saini *et al.* (2018) reportaron métodos de extracción de carotenos, mediante la utilización del método por microondas; la cual es aplicable a una gran variedad de muestras. Aunque no se puede evitar la degradación de algunos compuestos, el método de extracción por microondas sigue siendo un procedimiento viable y optimizable con varios niveles de potencia de microondas, utilización de radiación intermitente y volumen de solvente (Saini *et al.*, 2018). La optimización del ultrasonido se centra en la potencia ultrasónica, temperatura, intensidad y proporción de muestra a solvente; los cuales son factores para una eficiente extracción de metabolitos. Al igual que en el sistema híbrido, el uso de microondas es un método donde se optimizan los factores a favor de la obtención de compuestos de interés a partir de las hortalizas *Brassica*, logrando un sistema simple, rápido y económico.

7.6. Proteínas totales.

El contenido de proteínas se observa en la Figura 19, donde se muestra que el solvente con un mayor acarreo de proteínas fue el agua. Los solventes etanol y metanol no mostraron diferencias significativas entre sí, pero fueron los

solventes que permitieron el menor acarreo de proteínas a partir de los esquilmos de brócoli.

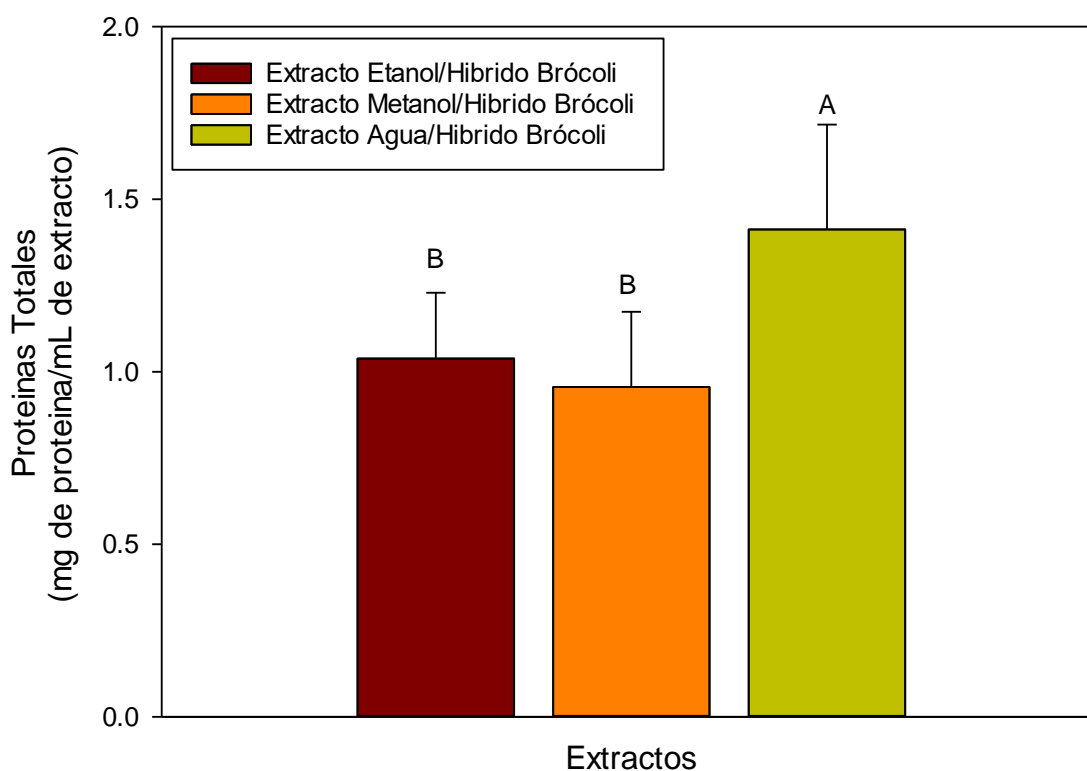


Figura 19. Contenido de proteína (mg de proteína mL⁻¹) en extractos de esquilmos de brócoli obtenidos mediante extracción híbrida (microondas y ultrasonido) y 3 diferentes solventes (etanol 70 %, metanol 70 % y agua). Letras diferentes indican diferencias significativas entre solventes ($p < 0.05$) mediante un análisis de varianza (ANOVA) y prueba *post hoc* de Tukey.

Las microalgas son excelentes fuentes de macronutrientes como proteínas, lípidos y carbohidratos (Morais *et al.* 2015; Wells *et al.*, 2017); por eso son utilizadas como modelo de estudio para la extracción de compuestos de interés. En el trabajo realizado por Hildebrand *et al.* (2020) empleando *Chlorella vulgaris*, el uso de ultrasonido y tres disolventes diferentes [agua (pH 7), HCl (0.4 M, pH 4) y NaOH (0.4 M, pH 13.6)] se obtuvo que, el solvente agua logró un rendimiento de entre 35 y 40 % mayor en comparación con los otros disolventes. Estos resultados correlacionan con lo reportado en este trabajo (método híbrido), donde el agua es un buen solvente para la recuperación de proteína (1.41 mg de proteína mL⁻¹ de extracto). Empleando el sistema híbrido no se requiere de agua alcalina, sino que

demuestra ser un proceso simple, adicionando las ventajas del microondas. El trabajo realizado por Khan *et al.* (2011) analizaron aislados de proteína extraídos de salvado de arroz estabilizado, utilizando agua desionizada como solvente y microondas como un tratamiento estabilizador, obteniendo un rendimiento de 71.32 % de proteína bruta, con una mejor retención de compuestos bioactivos.

El estudio de la tecnología de microondas realizado por Hu *et al.* (2021) con un enfoque de transformación novedoso para metabolitos naturales, el uso de la radiación de microondas en proteínas vegetales no afectó de manera negativa. En otro estudio hecho por Hernandez *et al.* (1998), los Autores observaron que el uso de la radiación de microondas mejoraba algunas características y descomponía las proteínas dañinas. El sistema híbrido correlaciona con los beneficios del uso de la radiación del microondas como una técnica ecoamigable, la cual favorece la extracción de proteína como se observaron en los resultados empleando esquilmos de brócoli.

7.7. Vitamina C.

La Figura 20 contiene los resultados de la vitamina C, en donde se observa que las cantidades oscilan entre 12-20 mg/mL. Los resultados presentan diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los extractos, ya que el mejor solvente es el etanol y de forma descendente el metanol como segundo mejor solvente, finalmente el solvente con menor cantidad de vitamina C se encuentra el agua (Figura 20).

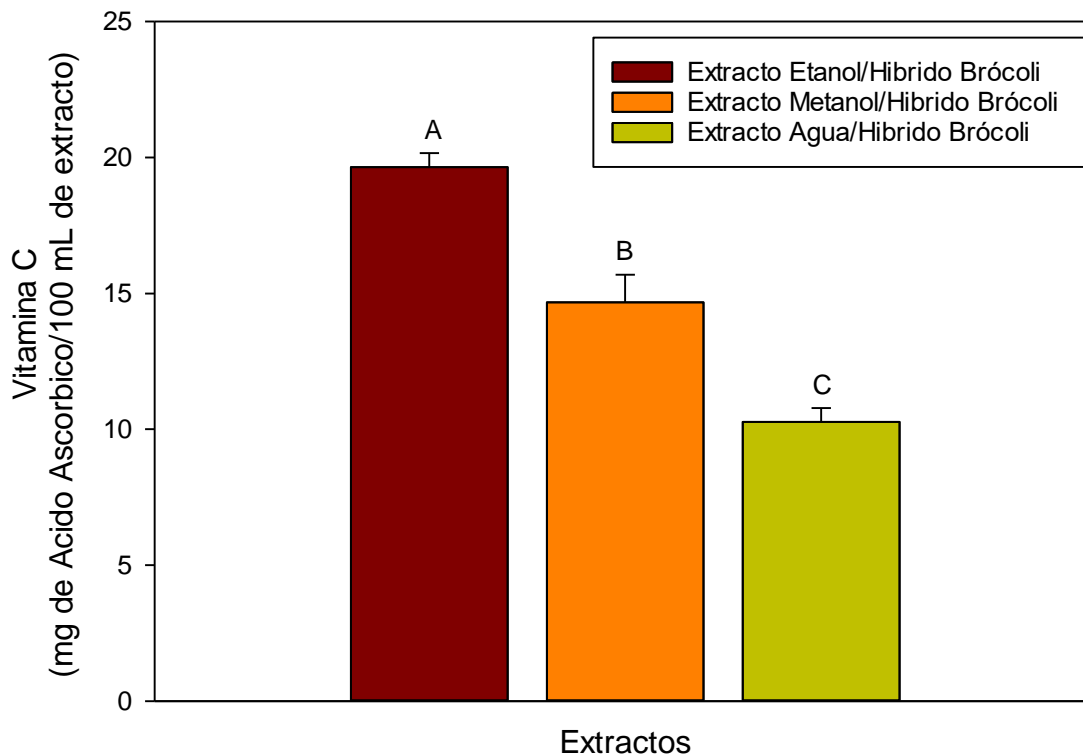


Figura 20. Contenido de vitamina C (mg de ácido ascórbico 100 mL⁻¹) en extractos de esquilmos de brócoli obtenidos mediante extracción híbrida (microondas y ultrasonido) y 3 diferentes solventes (etanol 70 %, metanol 70 % y agua). Letras diferentes indican diferencias significativas entre solventes ($p < 0.05$) mediante un análisis de varianza (ANOVA) y prueba *post hoc* de Tukey.

En el trabajo realizado por Yu *et al.* (2009) donde emplearon microondas y dos tipos de solventes (ácido metafosfórico al 0.25 % y metanol) para la extracción de ácido ascórbico (vitamina C) protegido con nitrógeno en guayaba, se reportó una concentración de entre 2.2-2.9 mg de ácido ascórbico g⁻¹ de peso fresco, mostrando una reproducibilidad y recuperación aceptables. El sistema híbrido (ultrasonido - microondas) con la utilización del solvente etanol contó con un rendimiento de 19.65 mg de ácido ascórbico 100 mL⁻¹ de extractos de esquilmos de brócoli, demostrando que es un método simple pero eficaz.

Weng *et al.* (2007) y Woźniakiewicz *et al.* (2008) indicaron que el método de microondas, por ser más fácil de usar y más económico, es un método adecuado para la obtención de compuestos bioactivos. Gracias a estas ventajas, la MAE ha generado interés creciente en la extracción de compuestos activos de diversas

matrices vegetales (Sánchez-Ávila *et al.*, 2009). En el trabajo realizado por Rodríguez *et al.* (2020), los Autores evaluaron la técnica de un proceso secuencial ecoamigable (ultrasonido y osmosis inversa) para la extracción de compuestos bioactivos de *camu-camu* y así obtener un producto con alto contenido de vitamina C cuantificada por HPLC. Los solventes utilizados fueron agua, donde reportan una concentración de 52 mg/g.

Stan *et al.* (2014) evaluaron 3 métodos (molienda, ultrasonido y microondas) para la extracción de ácido ascórbico de perejil, eneldo y apio utilizando combinaciones de soluciones acuosas y ácidos (ácido acético, ácido metafosfórico, ácido tricloroacético). Stan *et al.* (2014) reportaron que el perejil obtuvo el mejor rendimiento de ácido ascórbico 264 mg/100 g de planta fresca. Las técnicas presentes en el sistema híbrido (ultrasonido y microondas) en el presente trabajo correlacionan en la efectividad y ventajas que presenta el sistema de microondas y ultrasonido de manera independiente, al ser ecoamigable y económico para la industria alimentaria y una técnica accesible para la obtención de metabolitos de interés como es el caso de la vitamina C en los residuos de brócoli.

7.8. Compuestos fenólicos totales.

La gráfica del contenido de fenoles totales (Figura 21) presentes en cada uno de los solventes (etanol, metanol y agua) presenta la eficiencia de la extracción, donde los solventes etanol y agua generaron la extracción de la mayor cantidad de compuestos fenólicos y, a su vez, no presentan diferencias significativas ($p > 0.05$) entre ellos. Sin embargo, el solvente agua contuvo una menor cantidad de compuestos fenólicos de manera significativa ($p < 0.05$) en comparación con los solventes antes mencionados. El contenido de compuestos fenólicos oscila entre 460-620 $\mu\text{g EAG mL}^{-1}$.

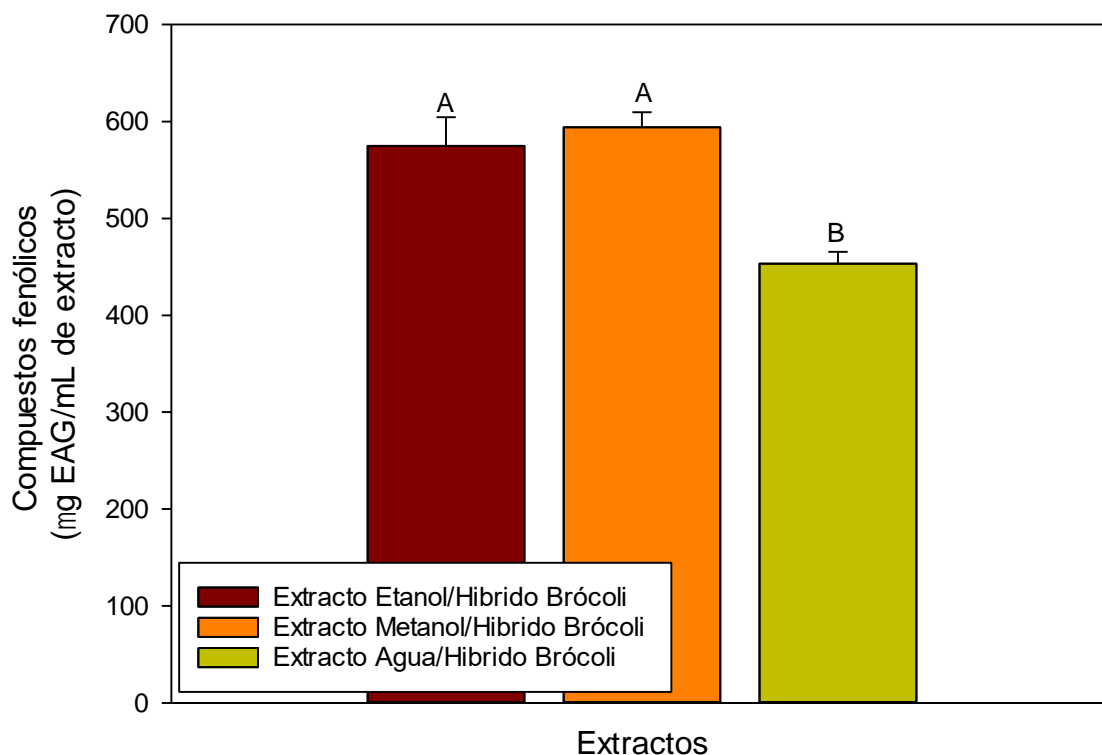


Figura 21. Contenido de compuestos fenólicos totales ($\mu\text{g EAG mL}^{-1}$) en extractos de esquilmos de brócoli obtenidos mediante extracción híbrida (microondas y ultrasonido) y 3 diferentes solventes (etanol 70 %, metanol 70 % y agua). Letras diferentes indican diferencias significativas entre solventes ($p < 0.05$) mediante un análisis de varianza (ANOVA) y prueba *post hoc* de Tukey.

Wu *et al.* (2015), trabajaron con la fruta *N. tangutorum* debido a sus buenas actividades antioxidantes y antifatiga, y el contenido de compuestos fenólicos; donde emplearon un método de extracción enzimático simultáneo asistido por microondas/ultrasonido y diferentes solventes [etanol, metanol y acetona en forma pura (absoluta) y también en mezclas con agua]. Wu *et al.* (2015) reportaron que el método de microondas, ultrasonido y extracción enzimática mejora la eficiencia de extracción de los compuestos fenólicos que los métodos de extracción tradicionales, obteniendo hasta 157.54 ± 5.42 mg EAG/g. En los esquilmos de brócoli empleando el método híbrido y los solventes etanol y metanol al 70 %, se obtuvieron hasta 594.1 $\mu\text{g EAG mL}^{-1}$, obteniendo que el método híbrido con una metodología simple logró obtener una extracción eficiente tanto con metanol y etanol.

Chen *et al.* (2020) realizaron la extracción de compuestos bioactivos de *Elaeocarpus serratus* L. asistida por ultrasonido y comparándola con extracción por agitación. Los solventes utilizados en la extracción fueron metanol, agua y etanol a diferentes concentraciones, y el contenido fenólico total se determinó con el método de Folin-Ciocalteu (Singleton *et al.* 1965). El etanol al 95 % obtuvo el mejor rendimiento con 92 mg GAE/g de hojas seca, demostrando una gran diferencia en comparación a la extracción por agitación. Vieira *et al.* (2022) trabajaron con el uso de hojas de *Sechium edule* mediante extracción convencional, ultrasonido y microondas, utilizando agua destilada, etanol, acetona y combinaciones. El extracto que presentó el mejor resultado fue el hidroetanólico al 50 % con 5.10 mg GAE/g muestra seca. Ambos trabajos de Chen *et al.* (2020) y Vieira *et al.* (2022) correlacionan con el sistema híbrido, ya que demuestran que el ultrasonido es una técnica eficiente en la extracción de compuestos fenólicos totales junto a la utilización de solventes verdes ecoamigables.

7.9. Capacidad antioxidante total.

Los resultados de la capacidad antioxidante total mostraron que en el caso de los solventes etanol y metanol no presentaron una diferencia significativa entre ellos (Figura 22). Para este caso, el metanol fue el que contuvo una mayor capacidad antioxidante, dejando por debajo con una diferencia significativa ($p < 0.05$) al solvente agua (Figura 22).

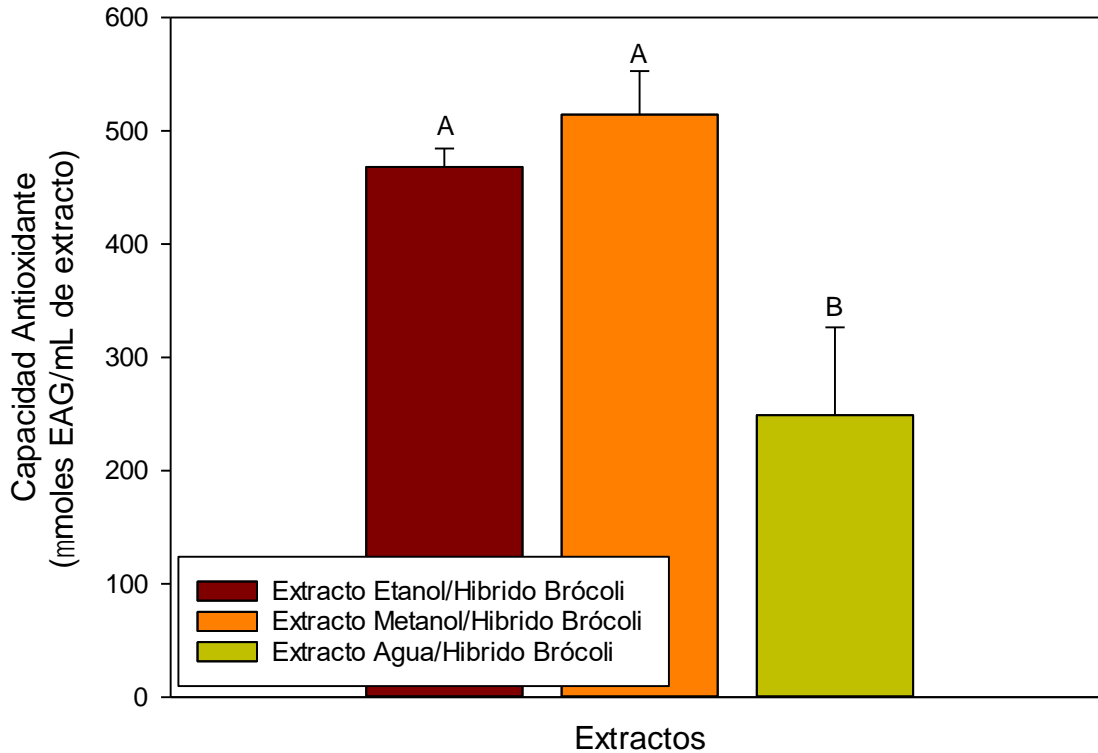


Figura 22. Capacidad antioxidante total ($\mu\text{moles EAG mL}^{-1}$) en extractos de esquilmos de brócoli obtenidos mediante extracción híbrida (microondas y ultrasonido) y 3 diferentes solventes (etanol 70 %, metanol 70 % y agua). Letras diferentes indican diferencias significativas entre solventes ($p < 0.05$) mediante un análisis de varianza (ANOVA) y prueba *post hoc* de Tukey.

Wu *et al.* (2015) reportó que la fruta de *N. tangutorum* utilizando un método de extracción enzimático simultáneo asistido por microondas/ultrasonido y diferentes solventes [etanol, metanol y acetona en forma pura (absoluta) y combinaciones acuosas], se obtiene 219.73 ± 7.03 mg TE/g; cuya conclusión de los Autores es de que los métodos de extracción empleados son más eficientes que los métodos de extracción tradicionales. Los resultados obtenidos con esquilmos de brócoli mediante el método híbrido y diferentes solventes (agua, etanol y metanol al 70 %), permitió obtener hasta $514.4 \mu\text{moles EAG mL}^{-1}$ con metanol al 70 %, encontrando que el sistema híbrido es eficiente para la extracción de compuestos con actividad antioxidante.

Vieira *et al.* (2022) reportaron que el potencial de hojas de *Sechium edule* mediante extracción convencional, ultrasonido y microondas, empleados para la

valoración de la capacidad antioxidante y utilizando agua destilada, etanol, acetona y combinaciones. La capacidad antioxidante observada fue 5.25 mg GAE/g extracto seco. Chen *et al.* (2020) evaluaron la capacidad antioxidante de *Elaeocarpus serratus L.* realizando una extracción asistida por ultrasonido y comparándola con extracción por agitación. Los solventes utilizados en la extracción fueron metanol, agua y etanol a diferentes concentraciones, obteniendo 199 mg FSE/g de muestra seca utilizando etanol al 95 %. Ambos estudios Chen *et al.* (2020) y Vieira *et al.* (2022) demuestran que el uso de solventes verdes beneficia al ultrasonido correlacionando con el presente trabajo donde el sistema híbrido agrega los beneficios del microondas al proceso de extracción de compuestos de interés.

8. CONCLUSIÓN.

El método híbrido (microondas y ultrasonido) empleado en la obtención de los diversos compuestos de interés por medio de los diferentes solventes (etanol, metanol y agua), demostraron que cada solvente benefició a determinados compuestos, siendo el solvente agua con el que se obtuvo la mayor cantidad de compuestos, tales como: clorofilas (*a*, *b* y totales) junto a la cantidad de proteína. Con el solvente metanol se obtuvo mayor cantidad de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante, pues aportó cantidades significativas de los componentes. El etanol obtuvo cantidades mayores en el contenido de GLS, carotenos y vitamina C. Por lo que se requiere definir cuál es el compuesto de interés a partir de los esquilmos de brócoli a obtener para utilizar el solvente con mayor rendimiento para su extracción.

9. PERSPECTIVAS.

1. Seguir con la investigación de los compuestos de interés extraídos de los esquilmos de brócoli por el método híbrido, puesto que, si rendimiento es aceptable para continuar su investigación, para encontrar intervalos diferentes que puedan ayudar a este método.
2. Las diferentes variedades de brócoli generan al igual residuos agroindustriales (esquilmos), en los cuales se podrían aplicar estos métodos para observar si alguna variedad puede contener mayores cantidades de compuestos de interés.
3. Prolongar el tiempo de la investigación con el fin de poder observar la vida útil de los extractos y que tanto pueden conservar sus componentes, ya sea a través de diferentes tipos de almacenamiento.
4. Realizar pruebas en que los solventes en temperatura ambiente, en comparación de los solventes calientes y ver si la temperatura afectaría perjudicialmente o beneficiarían en proceso de extracción.
5. Tener un mejor control en las condiciones de almacenamiento y transporte de los residuos agroindustriales.

10. REFERENCIAS.

- Ares AM, Bernal J, Nozal MJ, Turner C, Plaza M. (2015). Fast determination of intact glucosinolates in broccoli leaf by pressurized liquid extraction and ultra high-performance liquid chromatography coupled to quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Food Research International*, 76, 498-505. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.06.037>
- Appendino G, Bardelli A. (2010). Broccoli, PTEN deletion and prostate cancer: where is the link? *Molecular Cancer*, 9(1), 308. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-9-308>
- Avato P, D'Addabbo T, Leonetti P, Argentieri MP. (2013). Nematicidal potential of Brassicaceae. *Phytochemistry Reviews*, 12(4), 791-802. <https://doi.org/10.1007/s11101-013-9303-7>
- Bai X, Zhou T, Lai T, Zhang H. (2018). Optimization of the microwave extraction of polyphenols from red pitaya peel using response surface methodology, 1, 9–20.
- Barba FJ, Esteve MJ, Frigola A. (2014). Studies in natural products chemistry. In: Rahman A (ed) Studies in natural products chemistry. Elsevier, Amsterdam, pp. 321–346.
- Cao Y, Tao Y, Zhu X, Han Y, Li D, Liu C, Show PL. (2020). Effect of microwave and air-borne ultrasound-assisted air drying on drying kinetics and phytochemical properties of broccoli floret. *Drying Technology*, 38(13), 1733-1748. <https://doi.org/10.1080/07373937.2019.1662437>
- Chen F, Jiang Y (1999). Biotechnology of microalgae. Light Industry Press of China, Beijing, pp. 56–58.
- Chen, Y.H.; Yang, C.Y. (2020) Ultrasound-assisted extraction of bioactive compounds and antioxidant capacity for the valorization of *Elaeocarpus serratus* L. leaves. *Processes*, 8, 1218. <https://doi.org/10.3390/pr8101218>
- Chen X, Zhang Q, Zhang X, Du L, Yang Y, Zu F, Yang (2016). Simultaneous synergistic microwave–ultrasonic extraction and hydrolysis for preparation of

- trans-resveratrol in tree peony seed oil-extracted residues using imidazolium-based ionic liquid. *Ind Crops Prod*, 94, 266-280. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.08.048>
- Chemat F, Rombaut N, Sicaire A, Meullemiestre A, Abert-vian M. (2016). Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. *Ultrasonics - Sonochemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.06.035>
- Chuyen HV, Nguyen MH, Roach PD, Golding JB, Parks SE. (2018). Microwave-assisted extraction and ultrasound-assisted extraction for recovering carotenoids from Gac peel and their effects on antioxidant capacity of the extracts. *Food Science & Nutrition*, 6(1), 189-196. <https://doi.org/10.1002/fsn3.546>
- Deng Q, Zinoviadou KG, Galanakis CM, Orlie V, Grimi N, Vorobiev E, Lebovka N, Barba FJ. (2015). The effects of conventional and non-conventional processing on glucosinolates and its derived forms, isothiocyanates: extraction, degradation, and applications. *Food Eng Rev*, 7, 357–381. <https://doi.org/10.1007/s12393-014-9104-9>
- Deng Z, Hu Q, Lu F, Liu G, Hu Z. (2008). Colony development and physiological characterization of the edible blue-green alga, *Nostoc sphaeroides* (Nostocaceae, Cyanophyta). *Prog Nat Sci*. 18, 1475–1484. <https://doi.org/10.1016/j.pnsc.2008.03.031>
- Deng Q, Zinoviadou KG, Galanakis CM. (2015). The effects of conventional and non-conventional processing on glucosinolates and its derived forms, isothiocyanates: extraction, degradation, and applications. *Food Eng Rev*. 7, 357–381. <https://doi.org/10.1007/s12393-014-9104-9>
- de Morais MG, Da Silva Vaz B, de Morais EG, Costa JAV. (2015). Biologically active metabolites synthesized by microalgae. *Biomed Res Int*. 83576. <https://doi.org/10.1155/2015/835761>
- Domínguez-Perles R, Martínez-Ballesta MC, Carvajal M, García-Viguera C, Moreno DA. (2010). Broccoli derived by products. A promising source of

- bioactive ingredients. *J Food Sci*, 75, 383-392. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01606.x>
- Galanakis CM. (2015). Development of a Universal Recovery Strategy. En: Galanakis CM. (Ed.), *Food Waste Recovery: Processing Technologies and Techniques*. Elsevier Inc., Waltham.
- Gallaher CM, Gallaher DD, Peterson S. (2012). Development and validation of a spectrophotometric method for quantification of total glucosinolates in cruciferous vegetables. *J Agricult Food Chem*, 60(6), 1358-1362. <https://doi.org/10.1021/jf2041142>
- Gu ZX, Guo QH, Gu YJ. (2012). Factors influencing glucoraphanin and sulforaphane formation in brassica plants: a review. *Journal of Integrative Agriculture*, 11(11), 1804-1816. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(12\)60185-3](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(12)60185-3)
- Gudiño I, Martín A, Casquete R, Prieto MH, Ayuso MC, Córdoba MDG. (2022). Evaluation of broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) crop by-products as sources of bioactive compounds. *Scientia Horticulturae*, 304, 111284. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2022.111284>
- Grubb CD, Abel S. (2006). Glucosinolate metabolism and its control. *Trends in Plant Science*, 11(2), 89-100. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2005.12.006>
- Hanschén FS, Schreiner M. (2017). Isothiocyanates, nitriles, and epithionitriles from glucosinolates are affected by genotype and developmental stage in *Brassica oleracea* varieties. *Frontiers of Plant Science*, 8, 1095. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01095>
- Hayes M, Bastiaens L, Gouveia L. (2019). Microalgal bioactive compounds including protein, peptides, and pigments: applications, opportunities, and challenges during biorefinery processes. En: Hayes M (ed) *Novel proteins for food, pharmaceuticals and agriculture*. Wiley, Chichester, pp. 239–255. <https://doi.org/10.1002/9781119385332.ch12>
- Hernandez-Infante M, Sousa V, Montalvo I, Tena E (1998). Impact of microwave heating on hemagglutinins, trypsin inhibitors and protein quality of selected

- legume seeds. *Plant Foods Hum Nutr.* 52:199–208.
<https://doi.org/10.1023/A:1008033610737>
- Hildebrand G, Poojary MM, O'Donnell C, Lund MN, Garcia-Vaquero M, Tiwari BK. (2020). Ultrasound-assisted processing of *Chlorella vulgaris* for enhanced protein extraction. *Journal of Applied Phycology*, 32(3), 1709–1718. <https://doi.org/10.1007/s10811-020-02105-4>
- Hu Q, He Y, Wang F, Wu J, Ci Z, Chen L, Zhang D. (2021). Microwave technology: A novel approach to the transformation of natural metabolites. *Chinese Medicine*. 16(1), 1-22. <https://doi.org/10.1186/s13020-021-00500-8>
- Jaramillo J, Díaz CA. (2006). El cultivo de las crucíferas. Brócoli, coliflor, repollo y col china. (Eds.), Corpoica. Rionegro, Antioquia, Colombia.
- Khan SH, Butt MS, Sharif MK, Sameen A, Mumtaz S, Sultan MT. (2011). Functional properties of protein isolates extracted from stabilized rice bran by microwave, dry heat, and parboiling. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 59(6), 2416-2420. <https://doi.org/10.1021/jf104177x>
- Kim MJ, Hyun JM, Kim SS, Seong KC, Lim CK, Kang JS, Yun SH, Park KJ, Na HJ, Park KS. (2016). In vitro screening of subtropical plants cultivated in Jeju Island for cosmetic ingredients. *Orient J Chem*. 32, 807. DOI:10.13005/ojc/320206
- Kong W, Liu N, Zhang J, Yang Q, Hua S, Song H, Xia C. (2014). Optimization of ultrasound-assisted extraction parameters of chlorophyll from *Chlorella vulgaris* residue after lipid separation using response surface methodology. *Journal of Food Science and Technology*, 51(9), 2006-2013. <https://doi.org/10.1007/s13197-012-0706-z>
- Moreno DA, Carvajal M, Lopez-Berenguer C, Garcia-Viguera C. (2006). Chemical and biological characterization of nutraceutical compounds of broccoli. *J Pharm Biomed Anal*, 41, 1508-1522. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2006.04.003>
- Nadarajah D, Han JH, Holley RA. (2005). Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in packaged ground beef by allyl isothiocyanate. *International Journal of Food*

<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.08.019>

Nakanishi, K. (2001). Chlorophyll rich and salt resistant chlorella. *European Patent, 1*.

Nugrahedhi PY, Verkerk R, Widianarko B, Dekker M. (2015). A mechanistic perspective on process-induced changes in glucosinolate content in *Brassica* vegetables: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55(6), 823e838. <https://doi.org/10.1080/10408398.2012.688076>

Pacheco-Cano RD, Salcedo-Hernández R, López-Meza JE, Bideshi DK, Barboza-Corona JE. (2017). Antimicrobial activity of broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) cultivar Avenger against pathogenic bacteria, phytopathogenic filamentous fungi and yeast. *J App Microbiol*, 124(1), 126-135. <https://doi.org/10.1111/jam.13629>

Parfitt J, Barthel M, Macnaughton S. (2010). Food waste within food supply chains: quantification and potential for change to 2050. *Philosoph Trans Royal Soc B: Biol Sci*, 365, 3065-3081. <https://doi.org/10.1098/rstb.2010.0126>

Paz M, Gúllon P, Barroso MF, Carvalho AP, Domingues VF, Gomes AM, Becke H, Longhinotti E, Delerue-Matos C. (2015). Brazilian fruit pulps as functional foods and additives: Evaluation of bioactive compounds. *Food Chem*, 172, 462–468. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.09.102>

Porat R, Lichter A, Terry LA, Harker R, Buzby J. (2018). Postharvest losses of fruit and vegetables during retail and in consumers' homes: Quantifications, causes, and means of prevention. *Postharvest Biol Technol*, 139, 135-149. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2017.11.019>

Patyra E, Kowalczyk E, Kwiatek K. (2016). Anti-nutritional and health promoting properties of glucosinolates. *Życie Weterynaryjne*, 91(7), 516-520.

Radosevic K, Srcek VG, Bubalo MC, Rimac Brncic S, Takacs K, Redovnikovic IR, (2017). Assessment of glucosinolates, antioxidative and antiproliferative activity of broccoli and collard extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, 61, 59–66. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2017.02.001>

- Ran X, Zhang M, Wang Y, Adhikari B. (2019). Novel technologies applied for recovery and value addition of high value compounds from plant byproducts: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 59, 450-461. doi: 10.1080/10408398.2017.1377149
- Rangkadilok N, Tomkins B, Nicolas ME, Premier RR, Bennett RN, Eagling DR, Taylor PWJ. (2002). The effect of post-harvest and packaging treatments on glucoraphanin concentration in broccoli (*Brassica oleracea* var. italica). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (25), 7386e7391. <https://doi.org/10.1021/jf0203592>
- Rask L, Andréasson E, Ekblom B, Eriksson S, Pontoppidan B, Meijer J. (2000). Myrosinase: gene family evolution and herbivore defense in Brassicaceae, *Plant Mol Biol*, 42(1), 93-113. <https://doi.org/10.1023/A:1006380021658>
- Rodríguez-Hernandez MDC. (2013). Respuestas fisiológicas, moleculares y fitoquímicas de variedades de *Brassica oleracea* (Grupo Italica) sometidas a estrés abiótico. Tesis Doctoral, 247. Retrieved from <http://nadir.uc3m.es/alejandro/phd/thesisFinal.pdf>
- Rodrigues LM, Romanini EB, Silva E, Pilau EJ, da Costa SC, Madrona GS. (2020). Camu-camu bioactive compounds extraction by ecofriendly sequential processes (ultrasound assisted extraction and reverse osmosis). *Ultrasonics Sonochemistry*, 64, 105017. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2020.105017>
- Saini RK, Keum YS. (2018). Carotenoid extraction methods: A review of recent developments. *Food Chemistry*, 240, 90-103. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.07.099>
- Safi C, Charton M, Pignolet O, Silvestre F, Vaca-Garcia C, Pontalier P. (2013). Influence of microalgae cell wall characteristics on protein extractability and determination of nitrogen-to-protein conversion factors. *J Appl Phycol*, 25, 523–529. <https://doi.org/10.1007/s10811-012-9886-1>
- Stan M, Soran ML, Marutoiu C. (2014). Extraction and HPLC determination of the ascorbic acid content of three indigenous spice plants. *Journal of Analytical Chemistry*, 69(10), 998-1002. <https://doi.org/10.1134/S106193481410013X>

- Schonhof I, Krumbein A, Brückner, B. (2004). Genotypic effects on glucosinolates and sensory properties of broccoli and cauliflower. *Nahrung - Food*, 48(1), 25–33. <https://doi.org/10.1002/food.200300329>
- Shin IS, Han JS, Choi KD, Chung DH, Choi GP, Ahn J. (2010). Effect of isothiocyanates from horseradish (*Armoracia rusticana*) on the quality and shelf life of tofu. *Food Control*, 21(8), 1081e1086. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2009.12.030>
- Shirzad H, Niknam V, Taheri M, Ebrahimzadeh H. (2017). Ultrasound-assisted extraction process of phenolic antioxidants from olive leaves: A nutraceutical study using RSM and LC-ESI-DAD-MS. *J Food Sci Technol*, 54, 2361–2371. <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2676-7>
- Singleton VL, Rossi JA. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic- phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic*. 16, 144–158.
- Song LJ, Thornalley PJ. (2007). Effect of storage, processing and cooking on glucosinolate content of Brassica vegetables. *Food and Chemical Toxicology*, 45(2), 216e224. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2006.07.021>
- Soria AC, Villamiel M. (2010). Effect of ultrasound on the technological properties and bioactivity of food: a review. *Trends Food Sci Technol*, 21, 323–331. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2010.04.003>
- Sultanbawa Y. (2011). Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances. En: Mendez-Vilas, A. (Ed.), Formatex Research Center, Spain, pp. 1084-1093.
- Talmaciu AI, Volf I, Popa VI. (2015). A comparative analysis of the “green” techniques applied for polyphenols extraction from bioresources. *Chem Biodivers*, 12, 1635-1651. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201400415>
- Troncoso R, Espinoza C, Sánchez-Estrada A, Tiznado ME, García HS. (2005). Analysis of the isothiocyanates present in cabbage leaves extract and their potential application to control *Alternaria* rot in bell peppers. *Food Res Int*, 38(6), 701-708. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2005.02.004>

- Valdez-Vazquez I, Acevedo-Benitez JA, Hernandez-Santiago C. (2010). Distribution and potential of bioenergy resources from agricultural activities in Mexico. *Renew Sustain Energy Rev*, 14, 2147-2154. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2010.03.034>
- Vasanthi HR, Mukherjee S, Das DK. (2009). Potential Health Benefits of Broccoli - A Chemical - Biological Overview. *Mini Revisiones en Química Medicinal*, 9(6), 749-759. <https://doi.org/10.2174/138955709788452685>
- Van Doorn HE, Van Holst GJ, Van Der Kruk GC, Raaijmakers-Ruijs NCME, Postma E. (1998). Quantitative determination of the glucosinolates sinigrin and progoitrin by specific antibody ELISA assays in Brussels sprouts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 793e800. <https://doi.org/10.1021/jf970523z>
- Veggi PC, Martinez J, Meireles MAA. (2013). Fundamentals of microwave extraction. In: Chemat F, Gravotto G. editors. *Microwave-Assisted Extraction for Bioactive Compounds: Theory and Practice*. New York, NY: Springer, pp. 15-52. DOI: 10.1007/978-1-4614-4830-3_2
- Vilkhu K, Mawson R, Simons L, Bates D. (2008). Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry: a review. *Innov Food Sci Emerg Technol*, 9, 161–169. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2007.04.014>
- Vig AP, Rampal G, Thind TS, Arora S. (2009). Bio-protective effects of glucosinolates - A review. *LWT - Food Science and Technology*, 42(10), 1561-1572. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2009.05.023>
- Vieira EF, Souza S, Moreira MM, Cruz R, Silva AB, Casal S, Delerue Matos C. (2022). Valorization of phenolic and carotenoid compounds of *Sechium edule* (Jacq. Swartz) Leaves: comparison between conventional, ultrasound- and microwave-assisted extraction approaches. *Molecules*, 27, 7193. <https://doi.org/10.3390/molecules27217193>
- Wang L, Weller CL. (2006). Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends Food Sci Technol*, 17, 300–312. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2005.12.004>
- Wellburn AR. (1994). The spectral determination of chlorophylls a and b, as well

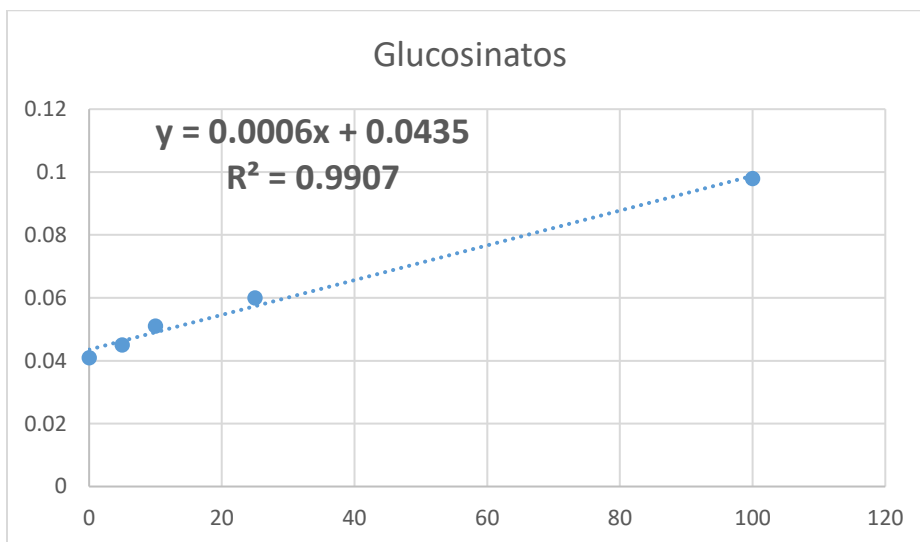
as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *J Plant Physiol.* 144, 307– 313. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)81192-2](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(11)81192-2)

Wells ML, Potin P, Craigie JS, Raven JA, Merchant SS, Helliwell KE, Smith AG, Camire ME, Brawley SH. (2017). Algae as nutritional and functional food sources: revisiting our understanding. *J Appl Phycol*, 29, 949–982. <https://doi.org/10.1007/s10811-016-0974-5>

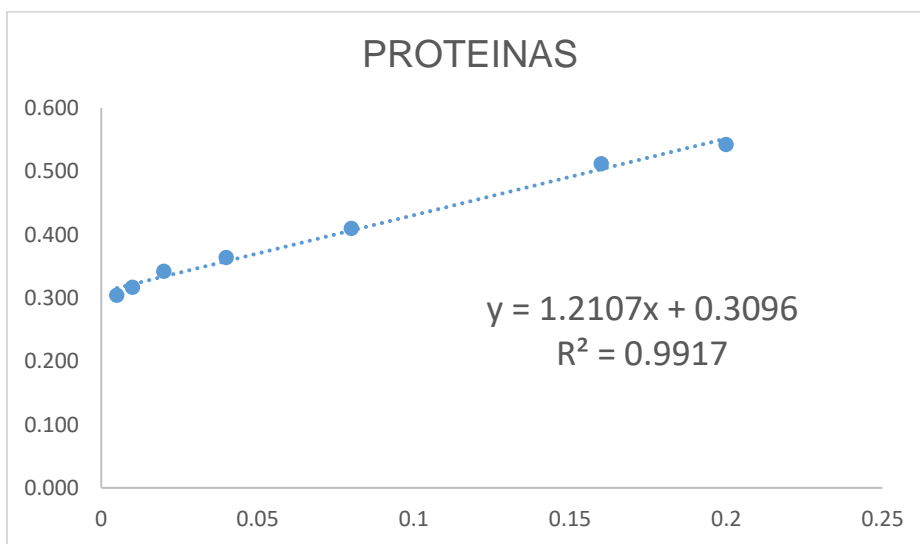
Wu D, Gao T, Yang H, Du Y, Li C, Wei L, Bi H. (2015). Simultaneous microwave/ultrasonic-assisted enzymatic extraction of antioxidant ingredients from *Nitraria tangutorun* Bobr. juice by-products. *Industrial Crops and Products*, 66, 229–238. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.12.054>

Yang X, Zhang H, Tang X, Liu Z, Yang S, Ni J. (2013). *Nitraria* resources in China and their utilization. *World For Res*, 26, 64–68.

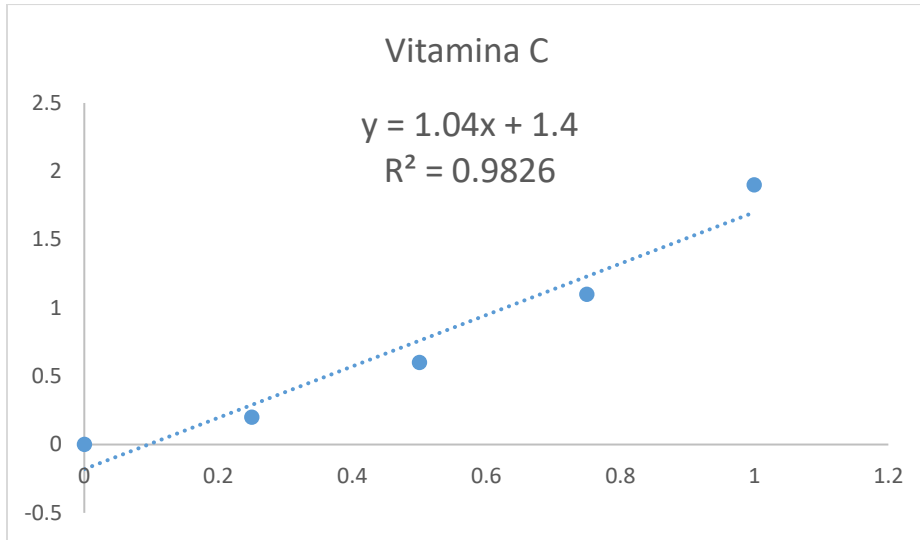
11. ANEXOS.



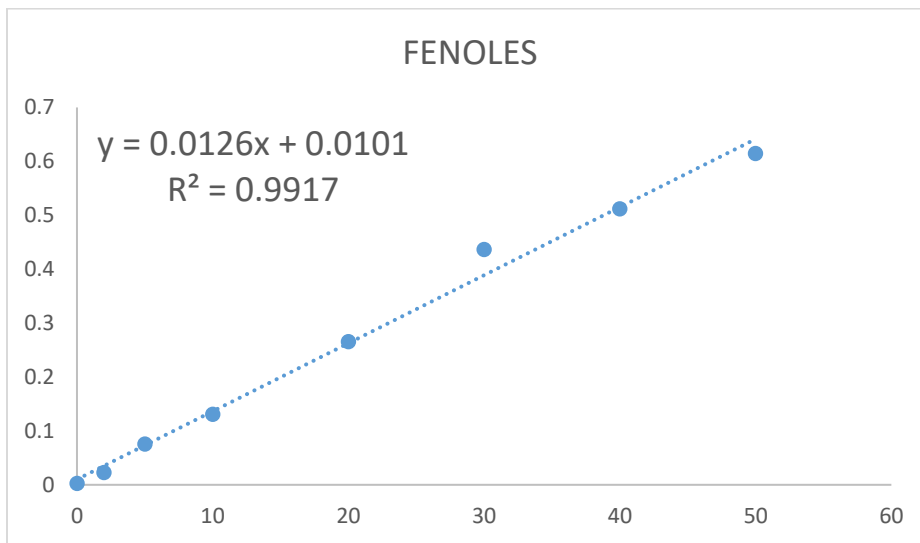
Anexo 1. Curva estándar de sinigrina para GLS.



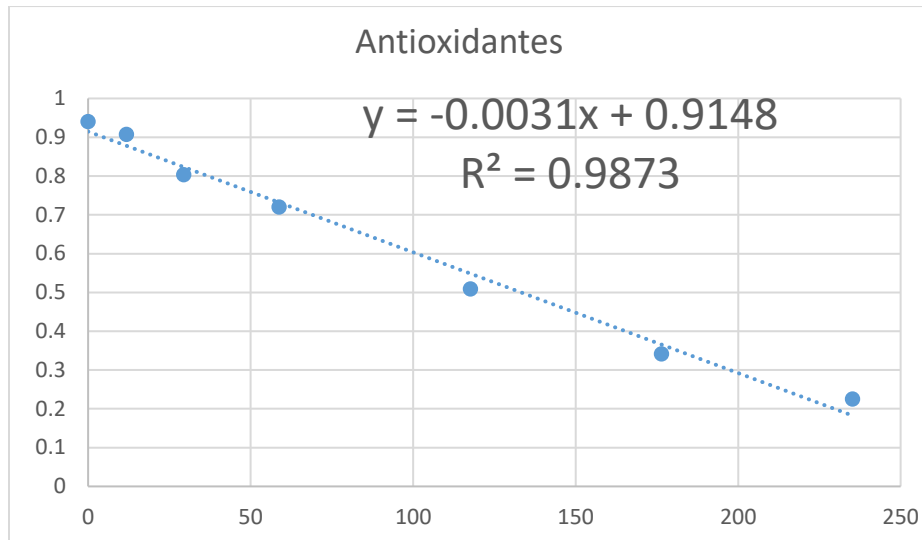
Anexo 2. Curva estándar de proteínas.



Anexo 3. Curva estándar de *Vitamina C*



Anexo 4. Curva estándar de *Compuestos Fenólicos Totales*.



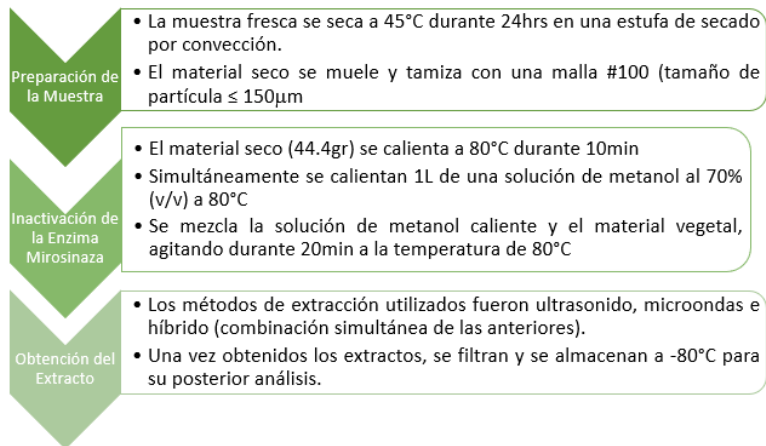
Anexo 5. Curva estándar de *Capacidad Antioxidante Total*.



Anexo 6. Esquilmos de Brócoli (hojas) en proceso de deshidratación (imagen propia).



Anexo 7. Proceso de tamizado del brócoli (imagen propia).

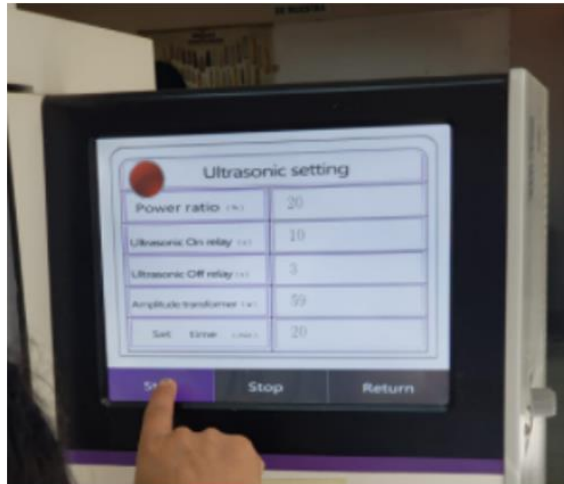


Anexo 8. Proceso de preparación de los extractos. Imagen modificada [Gallaher *et al.*, 2012]

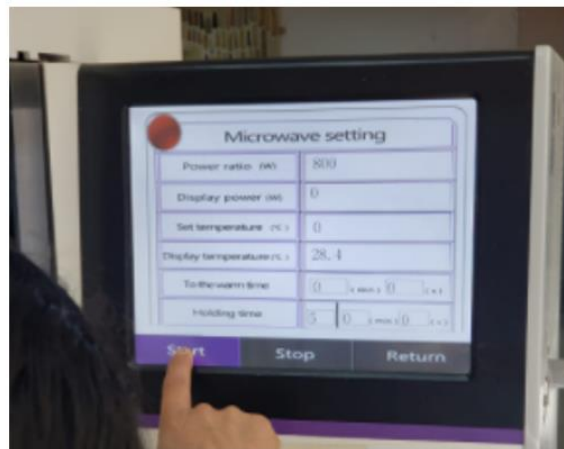
(a)



(b)



(c)



(a) Equipo de extracción ultrasonido, microondas e híbrido;
(b) Condiciones de operación por el método de ultrasonido,
(c) Condiciones de operación por el método de microondas.

Anexo 9. Equipo utilizado para la extracción.