

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL

DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS



**SUBPRODUCTOS A PARTIR DE EXTRACTOS DE ESQUILMOS DE BRÓCOLI
POR DIFERENTES SOLVENTES EMPLEANDO UN SISTEMA DE
MICROONDAS**

Por:

BRENDA LIZBETH ALVARADO CHAVERO

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Saltillo, Coahuila de Zaragoza, México.

Mayo, 2023.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL

Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos

**SUBPRODUCTOS A PARTIR DE EXTRACTOS DE ESQUILMOS DE BRÓCOLI
POR DIFERENTES SOLVENTES EMPLEANDO UN SISTEMA DE
MICROONDAS**

Presentada por:

BRENDA LIZBETH ALVARADO CHAVERO

TESIS

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

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Aprobada por el comité de Asesoría:

Dra. Dolores Gabriela Martínez Vázquez

Director Interno

Dra. Lluvia de Abril Alexandra Soriano Melgar

Director Externo

Saltillo, Coahuila, México

Mayo, 2023.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL

Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos

SUBPRODUCTOS A PARTIR DE EXTRACTOS DE ESQUILMOS DE BRÓCOLI POR DIFERENTES SOLVENTES EMPLEANDO UN SISTEMA DE MICROONDAS

Presentada por:

BRENDA LIZBETH ALVARADO CHAVERO

TESIS

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

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Aprobada por:

Dra. Dolores Gabriela Martínez Vázquez

Presidente

Dr. Karim de Alba Romenus

Vocal

Dra. Haydeé Yajaira López de la Peña

Vocal

Dra. Ana Verónica Charles Rodríguez

Vocal Suplente

M.C. Pedro Carrillo López
Coordinador de la División de
Ciencia Animal

Saltillo, Coahuila, México

Mayo, 2023.

Dedicatoria

El logro de este trabajo es dedicado principalmente a mi Dios padre por permitirme estar aquí y culminar uno de mis sueños.

A mis padres Celina Chavero Alvarado por todo su amor, apoyo y motivación y Eladio Alvarado Rodríguez que desde el cielo siempre me cuida y me acompaña en cada paso que doy.

A mi novio José Gregorio Galván Reséndiz por todo su amor, comprensión, por el gran apoyo que siempre me brinda.

A mis hermanos Antelmo, Eladio, Albino, Ruben, Briseida, Edson Manuel, Angel Carmelo, Uriel, Edgar Santiago y María Itzel, por su apoyo al alejarme de casa, por su cariño y comprensión en este largo camino.

Agradecimientos

A mi **Alma Terra Mater** la **Universidad Autonoma Agraria Antonio Narro** por abrirme las puertas y recibirme con mucho amor, por ser mi segunda casa y brindarme la oportunidad de ser lo que hoy soy, una profesionista, por darme compañeros y muy buenas amistades.

ORGULLO NARRO.

BUITRE POR SIEMPRE.

A la **Universidad de Autónoma de Coahuila** y al **Centro de Investigación de Química Aplicada** por permitirme llevar a cabo mi tesis.

A la **Dra. Dolores Gabriela Martínez Vázquez** y la **Dra. Lluvia de Abril Alexandra Soriano Melgar** por bríndame la confianza de ser parte de su proyecto, por la paciencia, apoyo incondicional para la realización de este trabajo, pero sobre todo por el conocimiento que han aportado en mi para crecimiento académico.

A todas las personas que estuvieron a mi lado en este tiempo.

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 a la estudiante Brenda Lizbeth Alvarado Chavero.

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.

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'Brenda Lizbeth Alvarado Chavero', written over a horizontal line.

Brenda Lizbeth Alvarado Chavero.

ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN.	1
2. JUSTIFICACIÓN.	2
3. OBJETIVOS.	3
3.1. Objetivo general.	3
3.2. Objetivos particulares.	3
4. HIPÓTESIS.	4
5. ANTECEDENTES.	5
5.1. Pérdidas de alimentos.	5
5.2. Compuestos de interés presentes en residuos agroindustriales.	6
5.3. Principales compuestos requeridos en la industria alimentaria a partir de residuos agroindustriales.	7
5.4. Residuos de crucíferas.	8
5.4.1. <i>Compuestos presentes en los residuos de brócoli.</i>	8
5.4.1.1. <i>Glucosinolatos.</i>	9
5.5. Métodos de extracción.	10
5.5.1. <i>Microondas.</i>	10
5.6. Solventes en los métodos de extracción.	11
6. MATERIALES Y MÉTODOS.	13
6.1. Material vegetal.	13
6.2. Métodos de extracción.	13
6.3. Tratamientos a base de diferentes solventes.	14
6.4. Determinaciones.	16
6.4.1. <i>Contenido de glucosinolatos.</i>	16
6.4.2. <i>Clorofilas a, b, totales y carotenos totales.</i>	18
6.4.3. <i>Vitamina C.</i>	19
6.4.4. <i>Proteínas.</i>	19
6.4.5. <i>Compuestos fenólicos totales.</i>	20
6.4.6. <i>Capacidad antioxidante total.</i>	20
6.5. Diseño experimental.	21
6.6. Análisis estadístico.	21
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	22

7.1. Contenido de glucosinolatos.	22
7.2. Clorofila <i>a</i>	23
7.3. Clorofila <i>b</i>	25
7.4. Clorofilas totales.	26
7.5. Carotenos.	28
7.6. Proteína.	30
7.7. Vitamina C.	31
7.8. Compuestos fenólicos totales.	33
7.9. Capacidad antioxidante total.	35
8. CONCLUSIÓN	37
9. PERSPECTIVAS.	38
10. REFERENCIAS.	39
11. ANEXOS.	48

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estufa para secado por convección.....	13
Figura 2. Equipo de microondas.....	14
Figura 3. Condiciones del equipo de microondas.....	14
Figura 4. Centrífuga.....	16
Figura 5. Bomba de vacío.....	17
Figura 6. Espectrofotómetro.	18
Figura 7. Contenido de glucosinolatos (g de glucosinolatos kg ⁻¹ de tejido vegetal) en los diferentes extractos de esquilmos de brócoli obtenidos mediante microondas y diferentes solventes (agua, metanol 70 % v/v y etanol 70 % v/v).	22
Figura 8. Contenido de clorofila <i>a</i> (µg de clorofila <i>a</i> mL ⁻¹) en los diferentes extractos de esquilmos de brócoli obtenidos mediante microondas y diferentes solventes (agua, metanol 70 % v/v y etanol 70 % v/v).	24
Figura 9. Contenido de clorofila <i>b</i> (µg de clorofila <i>b</i> mL ⁻¹) en los diferentes extractos de esquilmos de brócoli obtenidos mediante microondas y diferentes solventes (agua, metanol 70 % v/v y etanol 70 % v/v).	25
Figura 10. Contenido de clorofilas totales (µg de clorofilas mL ⁻¹) en los diferentes extractos de esquilmos de brócoli obtenidos mediante microondas y diferentes solventes (agua, metanol 70 % v/v y etanol 70 % v/v).	27
Figura 11. Contenido de carotenos (µg de carotenos mL ⁻¹) en los diferentes extractos de esquilmos de brócoli obtenidos mediante microondas y diferentes solventes (agua, metanol 70 % v/v y etanol 70 % v/v).	28
Figura 12. Contenido de proteína (mg de proteína mL ⁻¹) en los diferentes extractos de esquilmos de brócoli obtenidos mediante microondas y diferentes solventes (agua, metanol 70 % v/v y etanol 70 % v/v).	30
Figura 13. Contenido de vitamina C (mg de ácido ascórbico 100 mL ⁻¹) en los diferentes extractos de esquilmos de brócoli obtenidos mediante microondas y diferentes solventes (agua, metanol 70 % v/v y etanol 70 % v/v).	32
Figura 14. Contenido de compuestos fenólicos totales (µg EAG mL ⁻¹) en los diferentes extractos de esquilmos de brócoli obtenidos mediante microondas y diferentes solventes (agua, metanol 70 % v/v y etanol 70 % v/v).	33

Figura 15. Capacidad antioxidante total ($\mu\text{moles EAG mL}^{-1}$) en los diferentes extractos de esquilmos de brócoli obtenidos mediante microondas y diferentes solventes (agua, metanol 70 % v/v y etanol 70 % v/v).35

1. INTRODUCCIÓN.

Actualmente, se ha elevado la producción de brócoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) debido al valor nutritivo que brinda. El brócoli tiene un alto contenido de micronutrientes, minerales esenciales y capacidad antioxidante, ya que están implicados en las reacciones fisiológicas para mantener un balance metabólico (Jeffery *et al.*, 2009; Moreno *et al.*, 2007). El brócoli previene numerosas enfermedades crónicas, tales como: diabetes, enfermedades cardiovasculares, procesos inflamatorios, brindando un buen funcionamiento al tracto intestinal por el alto contenido de fibra (Jeffery *et al.*, 2009).

Hoy en día se han hecho grandes estudios acerca del uso de esquilmos de brócoli como una gran fuente de compuestos bioactivos, los cuales son derivados del metabolismo secundario de la planta, atribuyéndosele diversas funciones. Dentro de los componentes de interés principal del brócoli están los glucosinolatos y compuestos fenólicos, entre otros (Hooper *et al.*, 2006; Ares *et al.*, 2013). Hay interés de buscar nuevas alternativas para generar productos elaborados a base de esquilmos de brócoli (tallos, rebrotes y hojas); ya que estos tienen un gran potencial de aprovechamiento como fuente de ingredientes y compuestos bioactivos.

Una de las alternativas para el aprovechamiento de los esquilmos de brócoli, es la elaboración de extractos mediante tecnologías emergentes. La tecnología de microondas consiste en que las ondas electromagnéticas interaccionan con las moléculas de agua en el alimento y, por lo tanto, rotan por el efecto de las ondas las cuales generan calor. Se están evaluando diferentes solventes orgánicos (etanol y metanol) en los procesos de extracción mediante el empleo de las tecnologías emergentes (Liazid, 2012). Esta tecnología es considerada muy útil, puesto que permite la obtención de los compuestos bioactivos. Existe un gran interés sobre los subproductos de brócoli por los aportes que tiene, además que está reduciendo el impacto ambiental de los residuos (Hwang, 2015; Ferreira *et al.*, 2018).

2. JUSTIFICACIÓN.

De los desechos alimentarios, agroindustriales y diferentes residuos vegetales existe una elevada producción, del cual deriva a una numerosa pérdida de material vegetal de donde se pueden extraer compuestos de interés, por lo tanto, se aspira a realizar procedimientos sostenibles para el cuidado del ambiente y lograr que entren a la cadena de valor, residuos por medio de diversos subproductos, adquiriendo a los productos un valor agregado y motivar a las industrias con un mayor beneficio económico y así prevenir desechos.

En el brócoli específicamente, solo se utilizan la inflorescencia, teniendo así residuos de diferentes partes del brócoli como lo es tallos, hojas y los demás restos de la planta, esto sucede desde el campo o bien en la industria que abarca el proceso para su transporte y venta. Los residuos de brócoli no entran en la competencia con el material alimenticio, ofreciendo así una abundante dosis de compuestos bioactivos, los cuales serán factibles para ser aprovechados como lo es clorofilas, compuestos fenólicos, vitamina C y glucosinolatos. Estos compuestos tienen suma importancia por tener diferentes propiedades, tal como los glucosinolatos que se transforman en isotiocianatos demostrando tener propiedades antifúngicas, además inhiben la maduración (etileno) en alimentos poscosecha. Con esto, al obtener un apropiado procedimiento para producir los extractos a partir de esquilmos de brócoli, concibiendo así una metodología que posibilite la obtención de compuestos de interés de origen natural por medio de subproductos con la posibilidad de ser empleados dentro de la industria alimentaria.

3. OBJETIVOS.

3.1. Objetivo general.

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

3.2. Objetivos particulares.

a) Establecer el procedimiento para la generación de extractos mediante un modelo microondas de 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 microondas.

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 microondas 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 de microondas 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 empleo de microondas variando el tipo de solvente (agua, etanol y metanol) permitirá acarrear diferentes compuestos de interés, tales como: glucosinolatos, clorofilas, fenoles y otros antioxidantes de esquilmos de brócoli, permitiendo encontrar el solvente adecuado y, con ello, definir el procedimiento óptimo para reutilizar fuentes de origen vegetal que son considerados como desechos, pero de los cuales se pueden obtener una gran cantidad de compuestos que pueden reintroducirse en la cadena de valor.

5. ANTECEDENTES.

5.1. Pérdidas de alimentos.

Actualmente, unos de los temas de interés para la sociedad son la contaminación ambiental y la seguridad alimentaria. Según la FAO (2011 Global Food Loss and Wastage Report), “un tercio de los alimentos que se producen para el consumo humano se pierden o desperdician a nivel mundial”, lo que conlleva a tener anualmente alrededor de 186 kg de desperdicios por persona (Ottles *et al.*, 2015). Durante el manejo de los alimentos, que abarca desde la granja hasta la mesa, existen muchas pérdidas. En las etapas de poscosecha es donde se produce la mayor cantidad de pérdidas por diversos factores como: prácticas agrícolas inadecuadas, falta de tecnología, transporte, etc. Estos desperdicios de alimentos ocurren en países desarrollados, donde existe un derroche de alimentos y recursos a nivel consumidor y minoristas, esto se debe por los rigurosos requisitos de calidad del mercado y consumidores (Kummu *et al.*, 2012).

Por informes de la FAO (2011), en los países desarrollados, el desperdicio que existe de los alimentos corresponde a 222 millones de toneladas anualmente (ton/año). Ante ello, existe una gran preocupación por la excesiva generación de residuos de alimentos y por la contaminación ambiental, lo que atribuye a la emisión de gases de efecto invernadero y al cambio climático (Lipinski *et al.*, 2013). Es necesario mencionar que, la industria agroalimentaria es la principal responsable de un gran desperdicio de residuos orgánicos (biomasa), en donde han alcanzado 140 millones de ton/año. Estos subproductos son considerados una gran fuente de energía a un bajo costo, motivo por la cual está siendo utilizada para producir biocombustibles, además de esto, los subproductos contienen compuestos con valor agregado, ofreciendo una gran oportunidad al llevar a cabo su recuperación (Forster-Carneiro *et al.*, 2013; Perlatti *et al.*, 2014; Ayala *et al.*, 2018). Por lo anterior, los diferentes tipos de residuos agroindustriales presentan compuestos que pueden ser ingresados a la cadena de valor.

5.2. Compuestos de interés presentes en residuos agroindustriales.

Dentro de la cadena de producción existe materia prima que generalmente no se usa, conocida como residuos o subproductos, es produce en alguna parte del proceso productivo (Rosas *et al.*, 2016). Estos residuos se han clasificados como materiales sólidos adquiridos de la industrialización o de productos primarios, estos sirven para ser modificados y aprovechados, adquiriendo productos nuevos y con un valor monetario, debido a que no son usados dentro del proceso que los creó, los residuos agroindustriales se componen de lignocelulosa (lignina, celulosa y hemicelulosa) (Saval, 2012).

Diversos estudios han demostrado que las frutas y las verduras son provechosas para la salud de las personas, esto debido al gran contenido de vitaminas A, C y E, minerales, polifenoles, pigmentos, glucosinolatos e isotiocianatos, entre otros (Arts y Hollman, 2005, Hervert-Hernández *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2011; Weng y Yen, 2012; Denev *et al.*, 2014). Por lo que los productos naturales son de gran importancia debido a los compuestos de valor agregado que presentan, siendo útiles por su bioactividad (antibiótica, antifúngica, antioxidante, hipoglucemiante, entre otras). Lo que más se destaca de éstos son los compuestos fenólicos, los cuales se les atribuyen beneficios ante enfermedades cardiovasculares, en la prevención de cáncer y su acción antioxidante (Cory *et al.*, 2018; Serino *et al.*, 2019).

Se estima que cada año se generan grandes cantidades de desechos, los cuales no tienen un manejo fundamental, entre las partes de las plantas que se desperdician están principalmente los tallos, las hojas, los péndulos y los peciolos (Galanakis, 2012). Existen investigaciones actuales, en las cuales se ha demostrado que los residuos de origen vegetal tienen un buen potencial de uso en diversos desechos a manera de fuente natural de fitoquímicos. Es necesario recordar que, a pesar de las investigaciones, aun no existen o bien no se han ejecutado soluciones fundamentales para la mayor parte de los desechos. Asimismo, estos residuos generan grandes costos adicionales en la producción final dentro de la gestión ambiental (Devappa *et al.*, 2015; Katsampa *et al.*, 2015).

5.3. Principales compuestos requeridos en la industria alimentaria a partir de residuos agroindustriales.

Los residuos agrícolas mal operados no proporcionan ningún tipo de valor. La conversión agrícola de los desechos en subproductos es una excelente área de oportunidad. Según principios de química verde, los residuos agrícolas se pueden recuperar y convertirse en diferentes subproductos con una variedad de aplicaciones, como alimentos funcionales, entre otros (Singh *et al.*, 2019). Algunos residuos incluyen una gran cantidad de ingredientes alimentarios como lo es el azúcar, metales y proteínas, por lo que pueden ser una importante fuente biológica, así como, los fenoles y carotenos a los cuales se les consideran propiedades antioxidantes (Singh *et al.*, 2019). Compuestos como aceites esenciales, β -glucanos y sabores volátiles o colorantes naturales se sugiere como un aditivo promotor de la salud en la industria alimentaria debido a sus propiedades antioxidantes y antimicrobianas (Singh *et al.*, 2019).

Los polisacáridos y lignina forman a las fibras las cuales son muy importantes en los alimentos funcionales (Routray, 2017). Los compuestos fenólicos que son metabolitos secundarios, están presentes en las cáscaras de las papas, lo cual les sirve para que no se dé una infección microbiana. Éstas son muy comerciales y, por lo tanto, existe un gran desperdicio. Durante el procesamiento de la cáscara se da la extracción de estos compuestos, los más abundantes son el ácido clorogénico, cafeico y ferúlico, son considerados benéficos para la salud humana (Henderson *et al.*, 2012).

Dentro de los desechos (hojas, cáscaras, semillas, tallos y raíces) son grandes cantidades de residuos, contemplando que son generados principalmente de frutas y hortalizas, las cuales contienen lípidos, flavonoides, compuestos fenólicos, vitaminas, carotenoides, proteínas y otros compuestos de interés comercial, además de los desechos de frutas y hortalizas también se encuentran los desechos agrícolas como lo es salvados, semillas, tallos y cáscaras, estos son generados en cantidades enormes y son más nutritivos que la materia prima (Wall-Medrano *et al.*, 2020).

5.4. Residuos de crucíferas.

Las crucíferas son de suma importancia, sobre todo para la producción en México, puesto que se plantan 50 000 ha aproximadamente, esta plantación se conforma de brócoli con el 74 %, de col 12.45 % y de coliflor un 70 % (Suarez *et al.*, 2006). En el caso particular de las crucíferas, se sabe que su composición química y características nutricionales están presentes en las inflorescencias, lo cual es la parte comestible de la planta, principalmente en el caso del brócoli (Moreno *et al.*, 2007; Vallejo *et al.*, 2002). Esta parte de las inflorescencias representa entre el 5 y 35 % del material vegetal total de la planta, mientras que las hojas, los tallos y los rebrotes no son comercializables, siendo considerados como productos sin valor gastronómico, los cuales representan entre un 65 a 95 % del material vegetal total de la planta (Moreno *et al.*, 2007; Vallejo *et al.*, 2002). Esto implica que se puede obtener una cantidad considerable de biomasa a base de material vegetal que puede ser aprovechado para la obtención de subproductos de interés. Los residuos de crucíferas debido a los tejidos de las plantas, se destacan por tener elevados compuestos azufrados denominados glucosinolatos (Krikegaard y Sarwar, 1998).

5.4.1. Compuestos presentes en los residuos de brócoli.

El brócoli (*Brassica oleracea* L. var. *Italica*) de origen oriental del Mediterráneo de Europa. Hortaliza climatérica perecedera, se destaca por tener glucosinolatos, compuestos fenólicos, vitamina C, minerales y antioxidantes (Filannino *et al.*, 2015; Cai *et al.*, 2016; Bhandari *et al.*, 2019). Estos compuestos presentes en los diferentes tejidos vegetales de esta planta son principalmente compuestos nitrogenados y/o sulfurados, los cuales presentan actividad biológica, tanto los glucosinolatos como sus derivados, conocidos como isotiocianatos (Moreno *et al.*, 2007). Ambos compuestos se han descrito como subproductos del brócoli en diversas variedades, cuyos niveles de concentración más altos se encuentran en los tallos y en las hojas de la planta. En las hojas y los tallos se presentan una gran cantidad de compuestos fenólicos, pero estos polifenoles están presentes con una capacidad similar en las inflorescencias de la planta (Moreno *et*

al., 2007; Vallejo *et al.*, 2002). Se destaca sobre todo en las hojas; esto debido a su alto contenido en polifenoles derivados del metabolismo secundario, los cuales están compuestos de uno o más anillos fenólicos (Quiñones, 2012). Se han encontrado concentraciones de polifenoles en hojas deshidratadas de 7.8 mg EAG g⁻¹ (Murugan *et al.*, 2014) y hasta de 13.10 mg EAG g⁻¹ en hojas liofilizadas (Hwang y Lim 2015).

5.4.1.1. *Glucosinolatos.*

En Brassica la cantidad de los glucosinolatos varía dependiendo de condiciones ambientales como luz, temperatura, agua, nutrientes, condiciones de poscosecha y fase de crecimiento, así como, las etapas de crecimiento (Bhandari *et al.*, 2019). Los glucosinolatos son metabolitos vegetales secundarios con gran riqueza en azufre, que al ser removidos del material vegetal ya sea masticando, cortando, etc., se activan. La enzima mirosinasa es liberada de la planta, lo cual hace que actúe con los glucosinolatos, produciendo así una serie de metabolitos bioactivos. Existen diversos estudios de los glucosinolatos sobre los efectos hacia la resistencia de insectos en las plantas (Hopkins *et al.*, 2009). Debido a esto, el interés por la cuantificación de glucosinolatos es de amplio interés en métodos validados y aplicables en el análisis de éstos (Clarke, 2010).

Los glucosinolatos se caracterizan principalmente por tener un grupo de isotiocianato, el cual está combinado con tioglucosa y un grupo R adicional; la glucosa se modifica como el carbono central del isotiocianato, dando como resultado a una extensa gama de glucosinolatos. Desde 2001, se ha establecido que existen 120 estructuras de glucosinolatos individuales (Hopkins *et al.*, 2009). A los glucosinolatos se les atribuye el aroma y el sabor de las brassicas, con un bajo poder biológico, el cual aumenta cuando son hidrolizadas (Lampe, 2003). Generalmente, son compuestos que están estables en el interior de las células vegetales, en cambio cuando las células y tejidos son afectados, éstos se hidrolizan, en los glucosinolatos, la hidrólisis es moderada por la enzima mirosinasa, cuyo contenido es diferente entre las variedades de una misma especie (Fahey *et al.*,

2001). Debido a esta hidrólisis se obtienen los compuestos, tales como: isotiocianatos, tiocianatos, entre otros compuestos de interés (Verkerk *et al.*, 2009).

5.5. Métodos de extracción.

La extracción de compuestos bioactivos son una de las fuentes naturales que más se utiliza dentro de las industrias y, sobre todo, en la industria alimentaria. Existen métodos tradicionales como lo es la extracción con disolventes, alta presión hidrostática, destilación por arrastre de vapor, entre otros; que tienen como principal característica el uso de una gran cantidad de disolvente (Belova *et al.*, 2009). Estos métodos requieren de un extenso tiempo para la extracción, además de tener bajos rendimientos y requerir un elevado uso de energía, emplean altas temperaturas y presiones que en ocasiones dañan la calidad de los extractos obtenidos o bien se aniquila el compuesto de interés (Prashant *et al.*, 2011; Azmir *et al.*, 2013).

Existen algunos métodos de extracción que no dañan al medio ambiente, como la extracción asistida por ultrasonido permitiendo la extracción de vitaminas, o bien, el método de extracción mediante microondas por medio del cual se extraen compuestos de valor solubles en agua, en donde se han estado recuperado fitoquímicos recientemente (Ferreira *et al.*, 2018). Estos métodos de extracción son denominadas tecnologías verdes puesto que, necesitan energía en menor cantidad, disminuyen el tiempo de proceso, se utilizan productos naturales renovables y disminuyen el uso de sustancias peligrosas (Azaizeh *et al.*, 2011).

5.5.1. Microondas.

La técnica de extracción por microondas se ha nombrado como una técnica de extracción verde, esto debido a que acorta el tiempo de extracción, con lo cual se reduce el consumo del solvente. Éste se basa en un calentamiento dieléctrico, proceso por el cual una radiación electromagnética de microondas calienta un material debido a la rotación del dipolo de los componentes presentes (Ran *et al.*, 2019). Es decir, en la radiación las moléculas polares (ejemplo, agua) que están en los alimentos empiezan en movimiento para alinearse en dirección perpendicular, va cambiando la estructura conforme a la frecuencia del campo eléctrico donde las

moléculas que son alteradas se mueven apresuradas y así generan fricción produciendo calor (Chandrasekaran *et al.*, 2013).

Existen muchos parámetros, los cuales se deben de analizar para la optimización del proceso de microondas, tales como: la relación de solvente, la potencia del microondas, sólido del solvente, tiempo de extracción y la temperatura. Lo que respecta al solvente, ya sea el etanol (más comúnmente empleado junto con extracción por microondas) solo o bien con agua, mantiene una buena capacidad para concentrarse la energía del microondas y muestra propiedades buenas, solubles para los compuestos fenólicos. Se tiene que tener en cuenta la cantidad adecuada a utilizar del disolvente para así tener una entrada buena y completa de la muestra por la irradiación, con esto se evita el exceso de consumo de energía y tiempo, para la eliminación de la recuperación final de los compuestos. Es necesario mencionar que, para tener una estabilidad de los diferentes compuestos a extraer, se debe tener en cuenta la temperatura, tiempo de extracción y, sobre todo, la potencia de las microondas (Talmaciu *et al.*, 2015).

Por medio de la extracción por microondas se pueden adquirir una enorme cantidad de compuestos bioactivos como pueden ser; flavonoides, carotenoides y fenoles, cabe mencionar que microondas se puede llevar a cabo con o sin solvente (Soquetta *et al.*, 2018).

5.6. Solventes en los métodos de extracción.

Existen diferentes solventes como lo es el etanol, el metanol y la acetona, los cuales son combinadas con agua formado así una solución. Dentro de la extracción de compuestos fenólicos, existen diversas técnicas de extracción y, con éstos, el rendimiento que se obtenga dependerá de la polaridad del disolvente. Se sabe que la extracción con solventes orgánicos es sencilla, pero también es costosa, además de que es dañina para el ser humano. Debido a esto, se han encontrado reportes en donde se utilizan las concentraciones de etanol al 30 % (Hoffmann, 1996) o al 70 % para así disminuir el grado de toxicidad, con esto se considera ser más seguro y, por lo tanto, más eficiente (Xavier *et al.*, 2015).

Además, diversos estudios han demostrado que el etanol es un éxito como solvente orgánico debido a que es soluble con el dióxido de carbono. Sin embargo, la extracción de solubilidad es baja, teniendo un elevado peso molecular y, sobre todo, solutos polares (Galanakis, 2012).

Para la determinación de glucosinolatos se han manifestado el uso de metanol-agua, etanol-agua (1:1) y metanol-agua (7:3) para las muestras de los tejidos verdes que estén liofilizados (Wathelet *et al.*, 2004).

6. MATERIALES Y MÉTODOS.

6.1. Material vegetal.

Para la elaboración de los extractos se llevó a cabo la recolección de la materia prima (esquilmos de brócoli), los cuales se obtuvieron de Puebla, México. Posteriormente, se almacenaron en cuarto frío a una temperatura de 4 °C para su futuro uso, se lavaron y secaron mediante una estufa (Yamato, Constant temperatura oven, China; Figura 1) por convección a una temperatura de 45 °C durante 24 h. Las hojas fueron cortadas en trozos pequeños para que exista una deshidratación completa, las cuales fueron colocadas en charolas de aluminio. Las hojas secas fueron molidas en una licuadora durante 2 min, la muestra molida fue envuelta en papel aluminio para que no esté en contacto con los rayos del sol y la humedad, y fue almacenada en un desecador con los datos correspondientes (fecha y peso), posteriormente se tamizó la muestra molida con la ayuda de un tamiz con una malla número 100, obteniendo un polvo fino con un tamaño de partícula ≤ 150 μm . La muestra tamizada se volvió a almacenar en papel aluminio para evitar que entre en contacto con la luz y la humedad.



Figura 1. Estufa para secado por convección.

6.2. Métodos de extracción.

Para el método de microondas, se utilizó el equipo de ultrasonido/microondas (Ultrasonic Microwave Cooperative Workstation, Marca: Atpio, Modelo: XO-SM400, Nanjing, China; Figura 2). Potencia del equipo: 2500 W. Condiciones del equipo

microondas; power ratio: 800 W, display pwr: 0, set time: 70 °C, Holding time: 5 min (Figura 3).



Figura 2. Equipo de microondas.

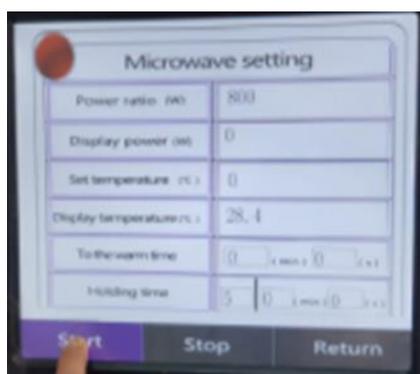


Figura 3. Condiciones del equipo de microondas.

6.3. Tratamientos a base de diferentes solventes.

El método de extracción consistió en microondas y diferentes solventes (agua, metanol y etanol), iniciando con la inactivación de la enzima mirosinasa. Se pesaron 44.4 g de la muestra tamizada en una charola pequeña de aluminio. La charola con la muestra se colocó en una parrilla eléctrica para dar inicio a la inactivación de la enzima mirosinasa durante 20 min, manteniendo una temperatura de 80 °C. Este procedimiento se llevó a cabo para cada solvente.

Agua (extracto acuoso): para el extracto acuoso se midieron 1000 mL de agua destilada, el agua se agregó en un matraz de Erlenmeyer para después ser calentada por 20 min manteniendo una temperatura de 80 °C, en una parrilla eléctrica. Una vez transcurrido el tiempo, se añadió la muestra haciendo una

homogenización completa. Después se colocó nuevamente el matraz con la muestra homogenizada en la parrilla, cumpliendo con la temperatura y tiempo antes ya mencionados. Se dejó enfriar para después vaciar la muestra en el reactor del microondas, con el cuidado y acomodo adecuado aplicando las condiciones mencionadas en los métodos de extracción. Se retiró el reactor del equipo para después filtrar el extracto en tela filtro y papel filtro de café comercial tres veces en cada uno de los filtros. Al tener el extracto filtrado se guardó en un recipiente de plástico envuelto en papel aluminio con la etiqueta correspondiente. Al tener el frasco con la etiqueta se guardó en un refrigerador a 4 °C para su futuro uso.

Etanol al 70 %: Para el extracto etanólico se midieron 700 mL etanol y 300 mL de agua destilada, el solvente se agregó en un matraz Erlenmeyer para después ser calentada por 20 min manteniendo una temperatura de 80 °C, en una parrilla eléctrica. Una vez transcurrido el tiempo se añadió la muestra haciendo una homogenización completa. Después se colocó nuevamente el matraz con la muestra homogenizada en la parrilla, cumpliendo con la temperatura y tiempo antes ya mencionados. Se dejó enfriar para después vaciar la muestra en el reactor del microondas, con el cuidado y acomodo adecuado aplicando las condiciones mencionadas en los métodos de extracción. Se retiró el reactor del equipo para después filtrar el extracto en tela filtro y papel filtro de café comercial tres veces en cada uno de los filtros. Al tener el extracto filtrado se guardó en un recipiente de plástico envuelto en papel aluminio con la etiqueta correspondiente. Al tener el frasco con la etiqueta se guardó en un refrigerador a 4 °C para su futuro uso.

Metanol al 70 %: Para el extracto metanólico se midieron 700 mL de metanol absoluto y 300 mL de agua destilada, el solvente se agregó en un matraz Erlenmeyer para después ser calentada por 20 min, manteniendo una temperatura de 80 °C en una parrilla eléctrica. Una vez transcurrido el tiempo, se añadió la muestra haciendo una homogenización completa. Después se colocó nuevamente el matraz con la muestra homogenizada en la parrilla, cumpliendo con la temperatura y tiempo antes ya mencionados. Se dejó enfriar para después vaciar la muestra en el reactor del microondas, con el cuidado y acomodo adecuado

aplicando las condiciones mencionadas en los métodos de extracción. Se retiró el reactor del equipo para después filtrar el extracto en tela filtro y papel filtro de café comercial tres veces en cada uno de los filtros. Al tener el extracto filtrado se guardó en un recipiente de plástico envuelto en papel aluminio con la etiqueta correspondiente. Al tener el frasco con la etiqueta se guardó en un refrigerador a 4 °C para su futuro uso.

6.4. Determinaciones.

Cada una de las determinaciones de los extractos se llevó a cabo por triplicado.

6.4.1. Contenido de glucosinolatos.

Para la determinación de glucosinolatos de los extractos se dio comienzo tomando 15 mL, los cuales se centrifugaron (Centrifuga VALEDPRIME, EUA; Figura 4) a 4000 rpm en un tiempo de 3 min.



Figura 4. Centrifuga.

Posteriormente, se realizó la purificación de los extractos la cual consta de cuatro etapas (acondicionamiento, adsorción, lavado y elusión), la purificación se efectuó con cartuchos LC-SAX (Supelco®, Analytical Products, EUA), el cual fue empleado en una aguja de jeringa en un corcho, se usó como tapón en un matraz apto para una bomba de vacío (ROCKER 300, AC 100V-120V, Taiwán; Figura 5) acelerando la filtración.

- I. Acondicionamiento: al cartucho se agregaron 3 mL de metanol seguido de 3 mL de agua para ser desplazado el metanol absoluto, posteriormente 2.5 mL de acetato de sodio al 0.5 M después se añadieron 2.5 mL de agua (gota a gota).
- II. Adsorción: se agregaron 3 mL del extracto (acuoso, etanol y metanol) al cartucho.
- III. Lavado: se añadieron 2.5 mL de agua para eliminar las impurezas que no son del interés.
- IV. Elusión: se le agregaron 3 mL de cloruro de sodio al 0.5 M para obtener los compuestos de interés, los cuales son almacenados en un tubo de ensaye.



Figura 5. Bomba de vacío.

Al tener el extracto purificado es liofilizado (Labconco, FreeZone 2.5 plus, EUA) en el trascurso de 36 h. Se tomaron 40 mg del extracto liofilizado, se le incorporo 700 μ L de buffer de acetato 0.2 M pH 4.2 a temperatura ambiente, se agitó durante 15 min, luego se incorporaron 100 μ L de acetato de plomo y bario a 0.5 M, agitando en vórtex (Genie 1, Touch Mixer, EUA) durante 2 min. Se agregaron 50 mg de polivinilpolipirrolidona (PVPP) incubándose a temperatura ambiente, en un tiempo de 10 min, pasado este tiempo se adicionaron 100 μ L de sulfato de sodio 2 M. Se centrifugó por 5 min a 13,000 rpm a temperatura ambiente. Del extracto centrifugado se tomaron 200 μ L mezclándose con 200 μ L de hidróxido de sodio 2 M y se incubaron en un tiempo de 30 min a temperatura ambiente. Después se

incorporaron 30 μL de ácido clorhídrico concentrado y se centrifugó durante 10 min a 4000 rpm.



Figura 6. Espectrofotómetro.

De esta mezcla se tomaron 100 μL del sobrenadante y se añadieron en una microplaca, añadiendo 100 μL de buffer de ferricianuro 0.2 M, pH 7.0. Midiendo finalmente la absorbancia a 420 nm antes de 15 s en el espectrofotómetro (EPOCH 2, Marca: BioTek, Figura 6) para así obtener los glucosinolatos, empleando como blanco el buffer de fosfato 0.2 M, pH 7. Se calculó el contenido de glucosinolatos totales empleando una curva de calibración de sinigrina mediante las siguientes ecuaciones (1 y 2) y la concentración se reportó como g kg^{-1} :

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

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

6.4.2. Clorofilas a, b, totales y carotenos totales.

Se tomaron 500 μL del extracto (acuoso, etanol y metanol) de brócoli por el sistema de microondas, homogenizándolo con 10 mL de metanol. La muestra homogenizada se centrifugó a 10000 rpm en un periodo de 15 min a 4 °C. Se realizó una disolución 1:10 (1 mL del extracto homogenizado en 9 mL de metanol). De las disoluciones de los extractos se tomó 1 mL para agregarlo en las celdas correspondientes del espectrofotómetro (Thermo Electron Corporation, GENESYS 10 UV, EUA), para leer su absorbancia a 652, 665 y 470 nm (Sumanta *et al.*, 2014).

Al tener cada una de las absorbancias se determinaron las clorofilas *a* (Chla), *b* (Chlb) y carotenos por medio de las siguientes ecuaciones:

$$Chla = 16.72 A_{665} - 9.16 A_{652} \quad (\text{ecuación 3}).$$

$$Chlb = 34.09 A_{652} - 15.28 A_{665} \quad (\text{ecuación 4}).$$

Para las clorofilas totales (Chl total) se realizó la suma de las clorofilas *a* y *b*.

$$Chl \text{ total} = Chla + Chlb \quad (\text{ecuación 5}).$$

Para la cuantificación de carotenos ($C_x + c$) se empleó la siguiente ecuación:

$$C_x + c = (1000 A_{470} - 1.63 Chla - 104.96 Chlb)/221 \quad (\text{ecuación 6}).$$

6.4.3. Vitamina C.

La determinación de la vitamina C se llevó a cabo por el método volumétrico 2,6-diclorofenolindofenol (Método 967,21 de la AOAC). Se tomó 1 mL de cada uno de los extractos y se añadió 1 mL de la solución metafosfórico/acético y 8 mL de agua destilada. Se tituló cada uno de las muestras con el reactivo del Thielmann, hasta obtener una coloración rosa la cual no desaparece durante 30 s. Para la determinación de vitamina C de cada una de los extractos se realizó la siguiente ecuación:

$$\text{Vitamina C mg/100 g} = \frac{\text{mL gastados} * FT * FD * 100}{VA * P} \quad (\text{ecuación 7}).$$

Donde:

FT = mg de ácido ascórbico equivalentes al reactivo de titulación.

FD = Factor de dilución.

VA = Volumen total en mL del extracto.

P = Peso de la muestra en gramos.

6.4.4. Proteínas.

La determinación de proteínas se llevó a cabo por el método de Bradford (Bradford, 1976). Una muestra de 500 μ L del extracto se homogenizó con solución

(buffer de fosfatos de sodio) y se añadieron 25 mg de PVPP. Posteriormente, se centrifugó a 3000 rpm durante 15 min. Del sobrenadante se utilizaron 100 μL , se le añadió 200 μL del reactivo de Bradford y 700 μL de agua destilada. Se leyó la absorbancia a 620 nm en el espectrofotómetro (Thermo Electron Corporation, GENESYS 10 UV, EUA). Los resultados se reportaron basándose en una curva patrón de albúmina, mediante las siguientes ecuaciones y la concentración de proteínas se reportó en mg mL^{-1} .

$$y = mx + b \text{ (formula de la pendiente)} \quad \text{(ecuación 8).}$$

$$x = (y - b) / m \text{ (despeje)} \quad \text{(ecuación 9).}$$

6.4.5. Compuestos fenólicos totales.

La determinación se realizó por el método de Folin-Ciocalteu, la cual se basa en la capacidad de los fenoles al estar en contacto con los agentes oxidantes (Singleton y Rossi, 1965). Se mezclaron 100 μL del extracto con la dilución 1:10 con 500 μL del reactivo Folin-Ciocalteu (dilución con agua 1:10 v/v) y se incubó durante 1 min. Se agregaron 400 μL de carbonato de sodio al 7.5 % (p/v). Se incubó la mezcla de reacción durante 30 min a temperatura ambiente, teniendo en cuenta que deben de estar tapadas con las cajas correspondientes. Trascurrido el tiempo, se midió la absorbancia a 765 nm en el espectrofotómetro (Thermo Electron Corporation, GENESYS 10 UV, EUA). A la par, se realizó una curva patrón de ácido gálico (0-100 μg de ácido gálico mL^{-1}). Los resultados de los principales compuestos fenólicos se expresaron como μg equivalentes de ácido gálico (EAG) mL^{-1} de extracto.

6.4.6. Capacidad antioxidante total.

La determinación de capacidad antioxidante total se llevó a cabo por medio de la técnica descrita por Brand-Williams (1995). Se tomaron 50 μL del extracto (el cual estaba con una disolución 1:10), mezclándose con 950 μL de DPPH. Dejando reposar las muestras 15 min para posteriormente leer la absorbancia a 515 nm en el espectrofotómetro (Thermo Electron Corporation, GENESYS 10 UV, EUA). Junto

con las muestras experimentales se realizó una curva patrón de ácido gálico (0-5.88 $\mu\text{moles de ácido gálico mL}^{-1}$). Los resultados se expresaron como $\mu\text{moles EAG mL}^{-1}$ de extracto.

6.5. Diseño experimental.

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

6.6. Análisis estadístico.

Todos los datos se analizaron en el programa estadístico NCSS (GESS07, 2006), empleando el análisis de varianza (ANOVA) con una significancia de $\alpha=0.05$ y una prueba *post hoc* de Tukey-Kramer.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

7.1. Contenido de glucosinolatos.

En la Figura 7, se muestra el contenido de glucosinolatos con los solventes (agua, metanol y etanol), no mostrando una diferencia estadística significativa ($p > 0.05$) entre los extractos.

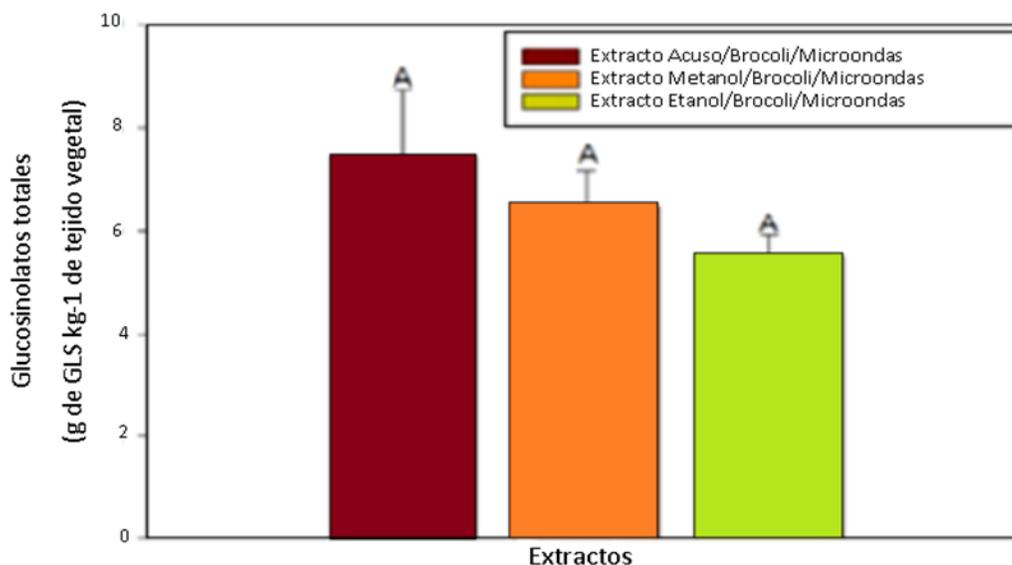


Figura 7. Contenido de glucosinolatos (g de glucosinolatos kg^{-1} de tejido vegetal) en los diferentes extractos de esquilmos de brócoli obtenidos mediante microondas y diferentes solventes (agua, metanol 70 % v/v y etanol 70 % v/v).

Paulsen *et al.* (2021) examinaron las flores de brócoli para la determinación de glucosinolatos de forma convencional, comparando el uso de bolsas con otro sin bolsas mediante microondas doméstico, sometiéndolos a una potencia de 800 W por 5 min. Para la extracción de GLS utilizaron metanol, mostrando como resultado que el uso de bolsa logra que se mantenga más el contenido de GLS ($32.3 \text{ mmol kg}^{-1}$). Por la anterior, se consideró que el uso del microondas es una fuente para preparar alimentos más rápido conservando compuestos bioactivos de los alimentos.

Omirou *et al.* (2009) estudiaron la extracción de glucosinolatos los cuales son abundantes en las brassicáceas, pero su enfoque fue para *Eruca sativa* (Rúcula) mediante el método de microondas. Este método fue comparado con el de

ultrasonido y el método certificado ISO-9167, utilizando como solvente metanol para su extracción. Los resultados de esta investigación mostraron que tanto el método ISO como el de microondas son eficaces, mostrando un total de GLS de $110 \mu\text{mol g}^{-1}$ aproximadamente, en un tiempo corto de 10 min, por lo tanto, el método eficiente para la extracción de glucosinolatos en tejidos vegetales es el de microondas.

Liu *et al.* (2018) analizaron la extracción de glucosinolatos en hojas, tallos y flores del brócoli, evaluando los subproductos con el solvente de metanol. Estos Autores demostraron que la concentración de glucosinolatos en las flores ($34.66 \mu\text{mol g}^{-1}$ de peso seco) fue más elevada en comparación de las hojas ($10.08 \mu\text{mol g}^{-1}$) y tallos ($7.45 \mu\text{mol g}^{-1}$). Sin embargo, concluyeron que, aunque las flores son ricas en glucosinolatos, las hojas son más ricas en los demás nutrientes como vitaminas, contenido fenólico y capacidad antioxidante, por lo cual los tejidos de la hoja son más funcionales para los alimentos.

Sookjitsumran *et al.* (2016) extrajeron con etanol extractos a base de hojas de repollo para determinar glucosinolatos, comparando la extracción por solvente precalentado (PSE) con extracción asistida por microondas. Estos Autores lograron demostrar que el método de microondas optimizó en un tiempo de 9 min los glucosinolatos, con esto determinaron que el microondas es más óptimo para la extracción que el PSE, además de que tiene un consumo de energía inferior.

Radosevic *et al.* (2017) mediante su investigación de contenido de glucosinolatos en col rizada y extractos de brócoli, utilizando hojas de col y flores de brócoli con el solvente metanol. Obteniendo con esto aproximadamente $297.66 \pm 1.15 \mu\text{mol } 100 \text{ g}^{-1}$ de GLS en extractos de brócoli en comparación con los de col que fueron más bajos ($195.04 \pm 4.9 \mu\text{mol } 100 \text{ g}^{-1}$), motivo por el cual contemplan mayor concentración de GLS en brócoli, así como, otros compuestos bioactivos.

7.2. Clorofila a.

En la Figura 8, se muestra el contenido de clorofila a en los extractos obtenidos con los tres solventes (agua, metanol y etanol), en donde se muestra que

el mayor contenido de clorofila *a* se obtuvo en el extracto con el solvente etanol con diferencia significativa ($p < 0.05$), seguido del obtenido con metanol y, finalmente, el de menor contenido de clorofila *a* se obtuvo con agua.

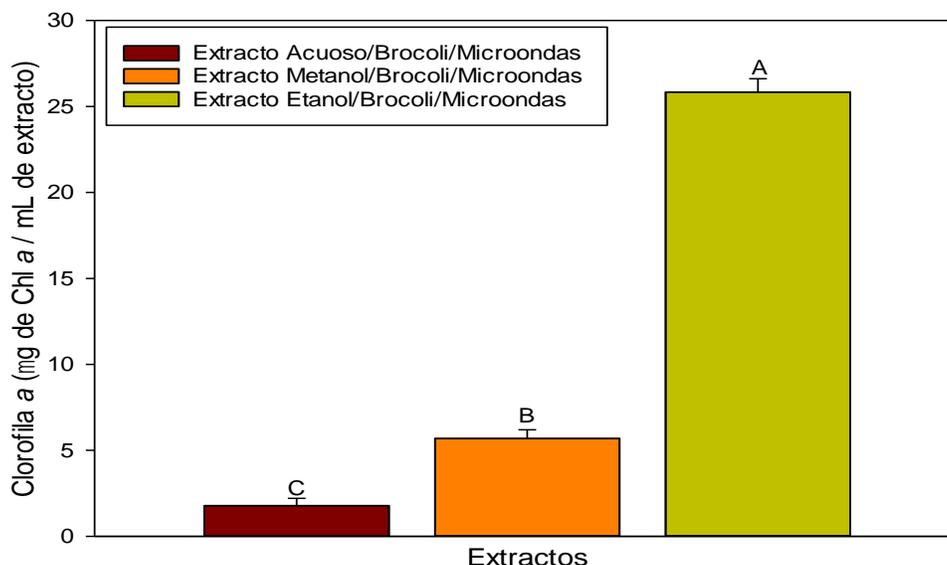


Figura 8. Contenido de clorofila *a* (μg de clorofila *a* mL^{-1}) en los diferentes extractos de esquilmos de brócoli obtenidos mediante microondas y diferentes solventes (agua, metanol 70 % v/v y etanol 70 % v/v).

Simón y Helliwell (1998) en su investigación extrajeron la clorofila *a* de algas verdes de agua dulce, comparando dos solventes; acetona y metanol. Dentro de sus resultados mostraron que el solvente que optimiza la recuperación de clorofila de las células de las algas es el metanol. En otro estudio, Deng *et al.* (2008) extrajeron la clorofila *a* del alga verde azulada la cual es comestible, examinando las capas que formaba el alga. Los Autores Deng *et al.* (2008) compararon los filamentos de las capas (interna y externa) usando metanol, con esto señalaron que en la capa interna el contenido de clorofila *a* fue 1.6 veces mayor que la capa externa.

Liu *et al.* (2018) en su estudio de clorofila *a* en flores, hojas y tallos de brócoli evaluaron los subproductos con el solvente de metanol. Estos Autores señalaron que dentro de las hojas de brócoli se encuentra una mayor concentración de clorofila *a* ($4478 \mu\text{g g}^{-1}$ de peso seco) mientras que en tallos ($144 \mu\text{g g}^{-1}$ de peso seco) y flores ($852 \mu\text{g g}^{-1}$ de peso seco) con sus resultados sugieren que el tejido de la hoja

de brócoli puede ser una excelente fuente de nutrientes esenciales para los alimentos. En otro estudio Gudiño *et al.* (2022) analizaron el brócoli (flor, hoja y tallo) usando metanol y etanol como solventes. Los Autores determinaron que el solvente con más compuestos bioactivos es el etanol, además en la hoja se concentra mayor clorofila a ($56.38 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$ peso seco) en comparación con el tallo ($10.95 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$ peso seco) y la flor ($27.93 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$ peso seco). Cao *et al.* (2020) compararon la cinética de secado de microondas y ultrasonido mediante el secado del brócoli, demostrando en los resultados que la velocidad de secado más rápida es la de microondas consiguiendo $1,635.6 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ de peso seco mejor que ultrasonido ($1087.9 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ de peso seco) en la protección de clorofila a.

7.3. Clorofila b.

En la Figura 9, se muestra el contenido de clorofila b en los extractos obtenidos con los tres solventes (agua, metanol y etanol), en donde se muestra que el mayor contenido de clorofila b se obtuvo en el extracto con el solvente etanol con diferencia significativa ($p < 0.05$) con respecto al metanol y el agua.

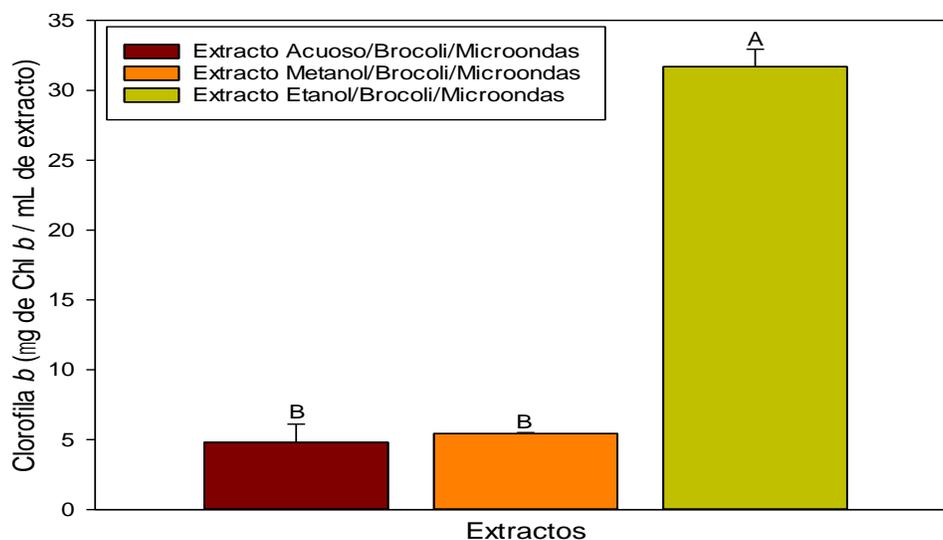


Figura 9. Contenido de clorofila b (μg de clorofila b mL^{-1}) en los diferentes extractos de esquilmos de brócoli obtenidos mediante microondas y diferentes solventes (agua, metanol 70 % v/v y etanol 70 % v/v).

Gudiño *et al.* (2022) analizaron partes del brócoli (flor, hoja y tallo) utilizando metanol y etanol como solventes, mediante estos extractos determinaron el

contenido de clorofila *b*. En su investigación, los Autores lograron identificar la parte del brócoli con mayor concentración la cual es la hoja (20.04 mg 100 g⁻¹ peso seco) en comparación con la flor (7.57 mg 100 g⁻¹ peso seco) y tallo (2.93 mg 100 g⁻¹ peso seco) con el solvente etanólico. Por medio del secado del brócoli. Cao *et al.* (2020) compararon la cinética de secado de microondas y ultrasonido, demostrando en los resultados que la velocidad de secado más rápida es la de microondas consiguiendo 415.5 µg g⁻¹ de peso seco mejor que ultrasonido (331 µg g⁻¹ de peso seco) en la protección de clorofila *b*. Tomson *et al.* (2019) investigaron el orujo de las hojas de rábano picante (*Armoracia rusticana*) el cual contiene compuestos bioactivos, entre ellos clorofila *b*, obteniendo el contenido de clorofila *b* aproximadamente fue de 0.26 ± 0.01 mg 100 g⁻¹ de peso seco. Ghellam *et al.* (2022) mediante técnicas de secado determinaron las clorofilas de Molokhia (*Corchorus olitorius*) una verdura de hoja popular, las técnicas son secado a la sombra (SHD), secado convectivo (COD) y secado por microondas (MID), mostrando en los resultados que las técnicas de secado no afectan la clorofila *b*, en donde el contenido estuvo aproximadamente mg 100 g⁻¹ de peso fresco.

7.4. Clorofilas totales.

El mayor contenido de clorofilas totales se obtuvo en el extracto con el solvente etanol con diferencia significativa ($p < 0.05$), seguido del obtenido con metanol y, finalmente, el de menor contenido de clorofilas totales fue empleando como extraente al agua (Figura 10).

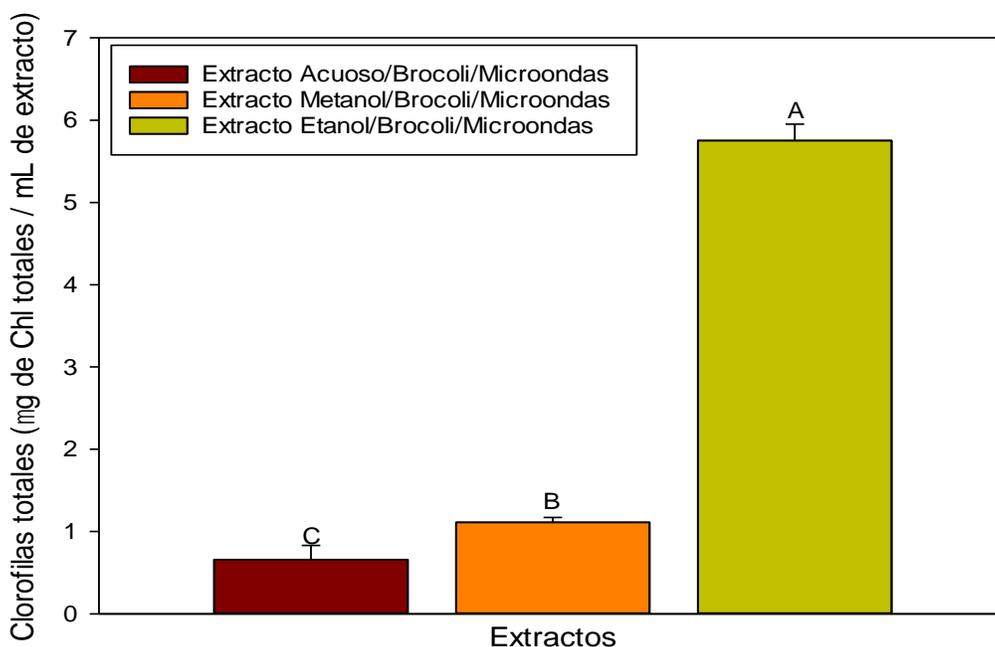


Figura 10. Contenido de clorofilas totales (μg de clorofilas mL^{-1}) en los diferentes extractos de esquilmos de brócoli obtenidos mediante microondas y diferentes solventes (agua, metanol 70 % v/v y etanol 70 % v/v).

Gudiño *et al.* (2022) analizaron el tallo, la inflorescencia y la hoja del brócoli realizando subproductos del mismo con dos solventes (etanol y metanol). Los Autores determinaron el contenido de clorofila el cual estaba aproximadamente entre 10.86 y 97.08 mg de clorofila 100 g^{-1} de peso seco. Por lo que concluyeron que el solvente más efectivo es el etanólico, dando así un valor agregado y aprovechando a los subproductos de brócoli. Borja *et al.* (2020) extrajeron clorofilas de subproductos a base de hojas y tallo de brócoli, utilizando como solvente etanol. Los Autores compararon dos métodos de extracción: convencional y de fluidos supercríticos (SFE), obteniendo como resultado de la extracción convencional $30.03 \pm 0.89 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$ mientras que del SFE se obtuvieron $32.64 \pm 1.72 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$. Por lo que el mejor método de extracción en este caso es SFE, al cual consideran como una tecnología verde por el uso de solventes verdes, además de ser una técnica eficiente y rápida.

Hernández (2019) en el estudio de hojas de lima mexicana (*Citrus aurantifolia* Swingle) analizó el contenido de compuestos bioactivos, entre ellos, el contenido de clorofila total con extracto acuoso y etanólico. Los resultados indican que el extracto

etanólico obtuvo 2.03 mg clorofila total 100 g⁻¹ de hoja. En otro estudio de clorofilas realizado en *Lemna minor* (lenteja de agua), *Potamogeton crispus* y *Egeria densa*, plantas acuáticas donde compararon solventes como acetona acuosa al 80 %, acetona acuosa al 90 % y etanol acuoso al 95 % (Su *et al.*, 2010). Mediante este estudio se dieron cuenta que el solvente acetona acuoso al 90 % obtuvo mayor contenido de clorofila (0.860-0.008 mg g⁻¹), seguida de etanol acuoso al 95 % (0.745-0.018 mg g⁻¹). Los Autores consideran al solvente acetona al 90 %, es el que acarrea mayor concentración de clorofila de plantas acuáticas, sin embargo, consideran que no hubo mucha diferencia del solvente etanol el cual también es efectivo.

7.5. Carotenos.

Los resultados del contenido de carotenos muestran que el mayor contenido se obtuvo mediante el extracto con el solvente etanol de manera significativa ($p < 0.05$), seguido del obtenido con metanol, siendo el extracto acuoso (agua) el que presentó el menor contenido de carotenos (Figura 11).

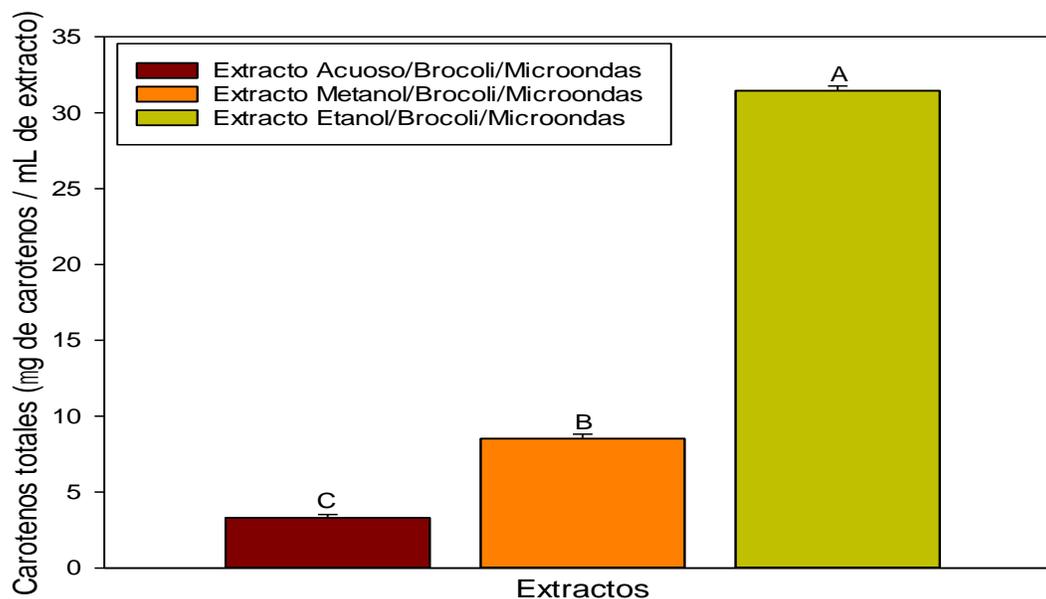


Figura 11. Contenido de carotenos (μg de carotenos mL^{-1}) en los diferentes extractos de esquilmos de brócoli obtenidos mediante microondas y diferentes solventes (agua, metanol 70 % v/v y etanol 70 % v/v).

Liu *et al.* (2018) analizaron la extracción de carotenos en hojas, tallos y flores del brócoli, evaluando los subproductos con el solvente de metanol. En este estudio los Autores demostraron que en las hojas se encontraba mayor concentración de carotenos ($1095 \mu\text{g g}^{-1}$ de peso seco) que los tallos ($15.6 \mu\text{g g}^{-1}$ de peso seco) y las flores ($181 \mu\text{g g}^{-1}$ de peso seco). Los resultados mostraron que las hojas de brócoli son más ricas en nutrientes y que pueden ser útiles los subproductos de brócoli en la dieta humana y como materia prima para la industria como compuestos bioactivos. Borja *et al.* (2020) señalaron en su estudio que la extracción de carotenos en la mezcla de tallos y hojas de brócoli con etanol como solvente, comparando el método de extracción convencional contra la extracción de fluidos supercríticos (SFE), determinando que el porcentaje del valor más elevado de carotenos se obtiene mediante extracción convencional $253.40 \pm 7.30 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$ mientras que con SFE se obtiene $148.93 \pm 8.56 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$. Sin embargo, los Autores señalan que el mejor método de extracción es el método SFE por ser una tecnología que usa solventes verdes, además, de ser eficaz para la extracción de compuestos bioactivos.

Mediante la extracción de microondas (MAE), ultrasonido (UAE) y la extracción convencional, los Autores Chuyen *et al.* (2017) examinaron la cáscara de la fruta Gac (*Momordica cochinchinensis* Spreng) utilizando acetato de etileno como solvente de extracción, analizando el tiempo de extracción. Los resultados mediante este estudio demostraron que tanto MAE como UAE reducen el tiempo de extracción en comparación con la extracción convencional, teniendo contenido de carotenos de MAE $236 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$ de peso seco durante 4 min, mientras que en EAU el valor obtenido fue de $263 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$ de peso seco después de 1 h. Por ello, estas tecnologías son nombradas como verdes, puesto que guardan más compuestos bioactivos por corto tiempo con menos gasto energético, sobre todo MAE. En otro estudio, Lasunon *et al.* (2021) determinaron compuestos bioactivos de los residuos de tomate mediante la extracción de microondas con diferentes condiciones (potencia y tiempo) utilizando etanol. En este estudio, los resultados mostraron que el mayor contenido de carotenoides (5.74 mg de licopeno 100 g^{-1} de

tomate en polvo y 4.83 mg de betacaroteno 100 g⁻¹ de tomate en polvo) se obtuvo de la extracción a una potencia de microondas de 300 W durante 90 s.

7.6. Proteína.

El contenido de proteína obtenidos a partir de los extractos con los tres solventes (agua, metanol y etanol), en la cual se presenta que el mayor contenido de proteína estuvo en el solvente con agua con una diferencia significativa ($p < 0.05$), siendo el solvente más representativo; mientras que el metanol fue el solvente que permitió la menor extracción de proteína (Figura 12).

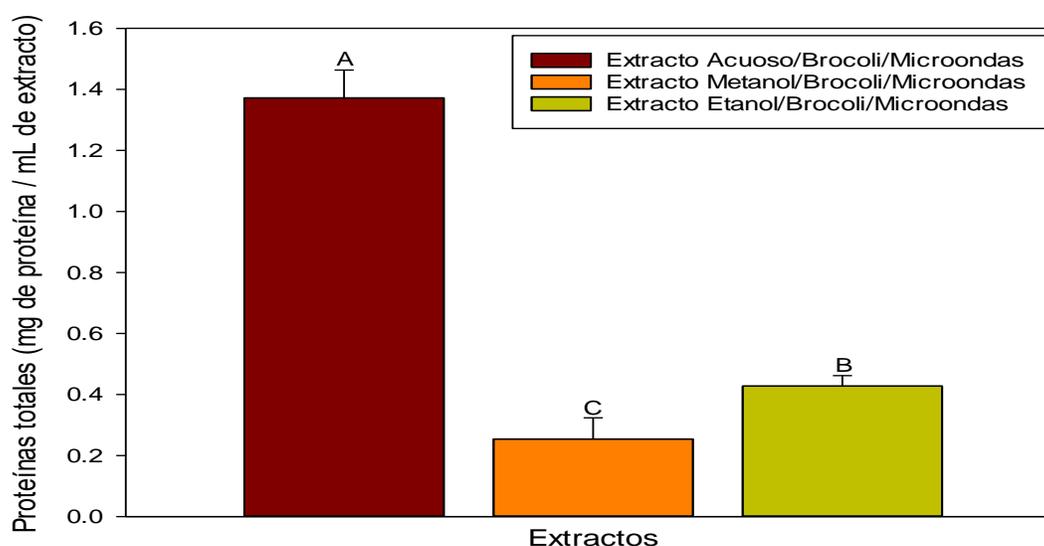


Figura 12. Contenido de proteína (mg de proteína mL⁻¹) en los diferentes extractos de esquilmos de brócoli obtenidos mediante microondas y diferentes solventes (agua, metanol 70 % v/v y etanol 70 % v/v).

Hernández *et al.* (1998) en su investigación de semillas de leguminosas (secas y remojadas) de guisantes, lentejas, garbanzos y habas, la sometieron a calentamiento por método convencional y microondas para determinar la eficiencia de la proteína. Los Autores concluyeron que el método adecuado que no afecta la calidad proteica que es el calentamiento por microondas. En otra investigación, Ochoa *et al.* (2017) compararon el método convencional, microondas y ultrasonido para la extracción de proteína de maní. Los Autores obtuvieron rendimientos de extracción y pureza, en microondas evaluaron tiempo de 8 min y 725 W produciendo

una extracción de del 55 % (100 % de pureza), esto es 77 % más de proteína en comparación con el método convencional, mientras que en ultrasonido la extracción de 136 % (86 % de pureza) en un tiempo de 15 min. Por lo que consideran que tanto MW y US favorecen la extracción de proteína de maní. En otro estudio, Khan *et al.* (2011) analizaron aislados de proteína extraído de arroz estabilizado por medio de microondas, usando agua desionizada como solvente, con esto los Autores obtuvieron un rendimiento del 71.32 % de proteína bruta. Mediante el estudio de Motlagh *et al.* (2021) donde los Autores extrajeron proteínas de *Nannochloropsis oceánica*, debido a que las algas marinas son consideradas con proteínas de alta calidad, se comparó el método de extracción asistida por microondas y el método convencional (Soxhlet). Los resultados mostraron que el método de microondas en 30 min obtuvo el 65.06 % de la proteína total extraída de la biomasa, lo que representa un total de 26.35 % del rendimiento de proteína. Por otro lado, el método Soxhlet de rendimiento obtuvo 0.63 %, con tan solo el 1.56 % de proteína total extraída de la biomasa. Con esto se demuestra que la extracción asistida por microondas es superior a los métodos convencionales.

7.7. Vitamina C.

El contenido de vitamina C muestra una mayor concentración con el solvente de etanol de manera significativa ($p < 0.05$), seguido por el solvente con metanol, mientras que con agua se obtiene una menor cantidad de vitamina C (Figura 13).

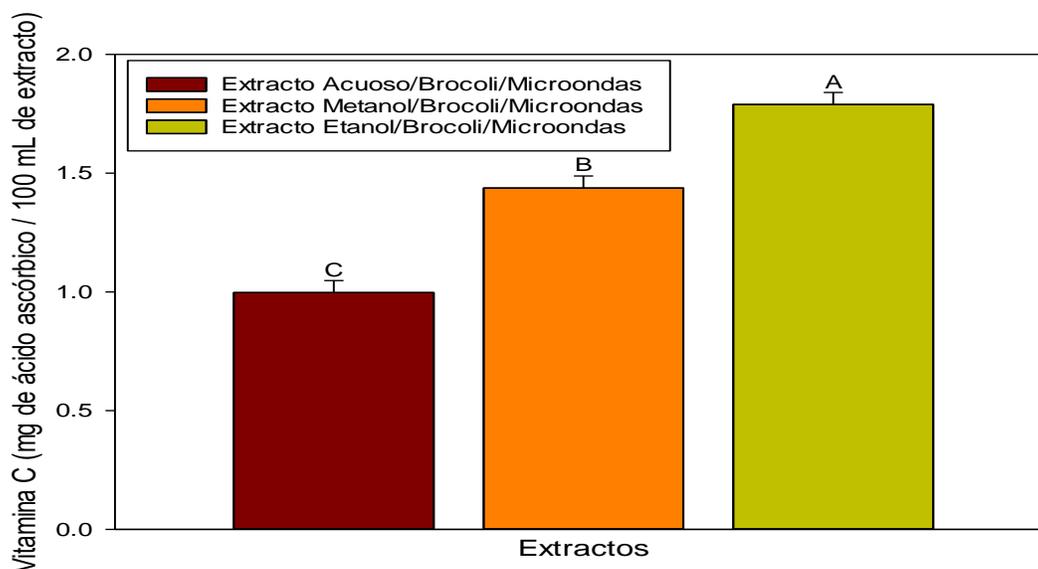


Figura 13. Contenido de vitamina C (mg de ácido ascórbico 100 mL⁻¹) en los diferentes extractos de esquilmos de brócoli obtenidos mediante microondas y diferentes solventes (agua, metanol 70 % v/v y etanol 70 % v/v).

Ram y Ho (2015) estudiaron el contenido de vitamina C en flores y hojas de brócoli y coliflor. El contenido de vitamina C en hojas (298.6 a 454.3 mg 100 g⁻¹) y flores (402.8 a 474.7 mg 100 g⁻¹) de brócoli mientras que el de coliflor en hoja (441.7 mg·100 g⁻¹) y en flores (396.7 mg 100 g⁻¹). Aunque se encontró mayor concentración de vitamina C en las flores, sobre todo en la coliflor, estos autores concluyen que la mayor concentración de fitoquímicos se encuentra en las hojas.

Joudi *et al.* (2022), en su investigación de secado conectivo de microondas analizaron el procesamiento de rodajas de calabaza mediante variables como temperatura (50, 60 y 70 °C), potencia de microondas (180, 360 y 540 W) para la determinación de vitamina C. Como resultado de este estudio sobre el secado óptimo de las muestras de calabaza se obtuvo a las condiciones de 426.94 W y 63.33 °C, siendo estas las mejores variables obteniendo como resultado de vitamina C 4.78 mg g⁻¹ de materia seca. Zahoor y Khan (2019) en calabaza amarga obtuvieron 62.60 mg 100 g⁻¹ de peso seco de vitamina C, con las condiciones de 50 °C, 540 W y 12 m s⁻¹ de temperatura, potencia y velocidad del aire, respectivamente.

Zhang y Hamauzu (2004) investigaron el contenido de vitamina C del tallo y flor del brócoli, mediante la cocción convencional y la de microondas, obteniendo en la flor 34.1 a 34.4 % y en tallos 29.1 a 29.5 %. Podsedek *et al.* (2006) en su estudio evaluaron el contenido de vitamina C de coles, donde el resultado de vitamina C osciló entre 0.009 a 1.16 mg 100 g⁻¹. En otro estudio de brócoli fresco obtuvieron 52.9 mg 100 g⁻¹ de vitamina C como máximo contenido, determinado que las crucíferas son una fuente relativamente buen en compuestos bioactivos (Singh *et al.* 2007).

7.8. Compuestos fenólicos totales.

En la Figura 14, se muestra el contenido de compuestos fenólicos totales en los extractos obtenidos mediante tres diferentes solventes (agua, metanol y etanol), en el cual no se encuentra diferencia significativa ($p > 0.05$) entre cada uno de los solventes.

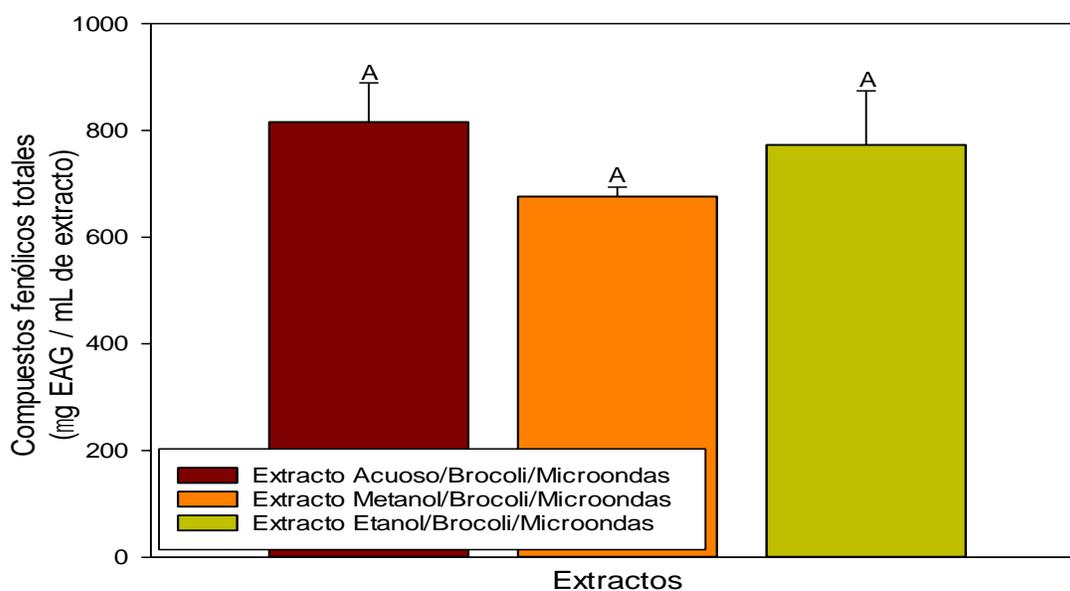


Figura 14. Contenido de compuestos fenólicos totales ($\mu\text{g EAG mL}^{-1}$) en los diferentes extractos de esquilmos de brócoli obtenidos mediante microondas y diferentes solventes (agua, metanol 70 % v/v y etanol 70 % v/v).

Rodríguez *et al.* (2014) en su trabajo examinaron cáscaras de girasoles de diferentes híbridos, mediante la extracción de fenoles totales por microondas,

detectando las condiciones óptimas las cuales son: tiempo y temperatura, utilizando como solvente agua. Las condiciones que estos Autores utilizaron fueron: 20 min a 70 °C y 10 min a 90 °C para fenoles totales, los resultados dieron como mejor condición para la extracción de fenoles totales a 10 min a 90 °C (366.56 ± 30.64 mg de ácido gálico 100 g^{-1} de cáscara de girasol), siendo superior a 20 min a 70 °C (190.44 ± 15.71 mg de ácido gálico 100 g^{-1} de cáscara de girasol). Se determinó la mejor condición y con estos se pretende que la industria alimentaria lo utilice dando a un residuo valor agregado.

Los Autores Elakremi *et al.* (2022) reportaron en su trabajo la extracción del contenido de fenoles totales mediante residuos (hojas) de *Pistacia vera* (Pistacho), por medio de la técnica de extracción asistida por microondas comparándola con la maceración trabajando con el solvente etanol. Resulta que de acuerdo a este estudio, la mejor técnica de extracción es la de microondas con un rendimiento de 35 a 36 % de extracción puesto que fueron superiores a maceración 3.10 a 3.20 %. En este análisis el método óptimo es el MAE obteniendo 196.35 mg equivalentes de ácido gálico (GAE) g^{-1} peso seco del contenido de fenoles totales, además es una técnica que conserva altos niveles de compuestos bioactivos en las hojas de pistacho). En otro estudio, Belwal *et al.* (2017) mediante la extracción asistida por microondas en condiciones óptimas (con potencia de 500 W, 1.45 g mL^{-1}) determinaron el contenido de fenoles totales en hojas de *Berberis asiática* como solvente el metanol al 60 % comparando dos diseños experimentales. Estos Autores utilizaron la extracción asistida por microondas puesto que aumenta la recuperación de fenoles en corto tiempo y con menor solvente.

Borja *et al.* (2020) extrajeron compuestos fenólicos utilizando subproductos (hojas y tallos) de brócoli, utilizando como solvente etanol. Comparando la extracción convencional con la extracción de fluidos supercríticos (SFE). Los resultados de este estudio muestran que existe una concentración más representativa, en hojas y tallos de fenoles por SFE (29.21 ± 5.04 mg GAE g^{-1}) es menor a la extracción convencional (74.31 ± 1.02 mg GAE g^{-1}); sin embargo, ellos declaran que el mejor método es SFE puesto que reduce el uso de solventes tóxicos

al ambiente, es decir, solventes verdes. Radosevic *et al.* (2017) en su trabajo analizaron el contenido de compuestos fenólicos usando metanol como solvente, en extractos de flores y hojas de brócoli y col rizada *in vitro*. En su estudio demostró que la col rizada tiene mayor cantidad de fenoles ($461.35 \pm 39.43 \text{ mg g}^{-1}$ peso fresco) que el brócoli ($256 \pm 5.79 \text{ mg g}^{-1}$ peso fresco), esto lo atribuyen durante la ebullición la mayor concentración de fenoles se filtraron en el agua durante la cocción.

7.9. Capacidad antioxidante total.

En la Figura 15, se muestra el contenido de capacidad antioxidante en los extractos obtenidos con los tres solventes (agua, metanol y etanol), en donde se muestra que la mayor capacidad antioxidante se obtuvo en los extractos con etanol y metanol ($p < 0.05$), mientras que mediante el extraente agua, la capacidad antioxidante obtenida de los esquilmos de brócoli fue menor (Figura 14).

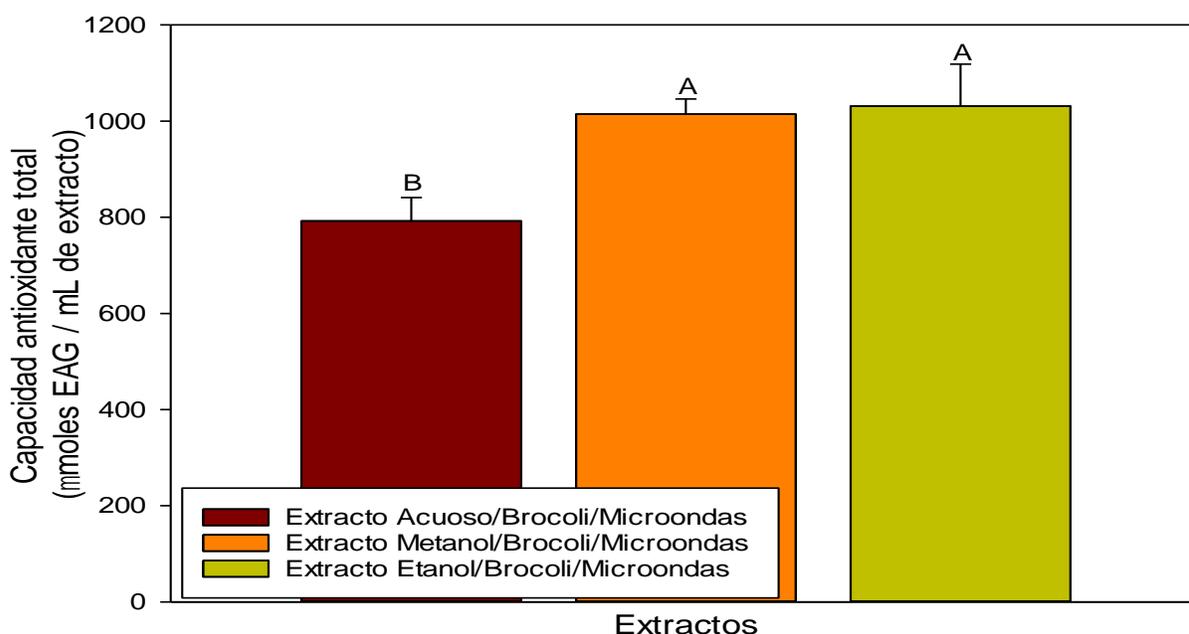


Figura 15. Capacidad antioxidante total ($\mu\text{moles EAG mL}^{-1}$) en los diferentes extractos de esquilmos de brócoli obtenidos mediante microondas y diferentes solventes (agua, metanol 70 % v/v y etanol 70 % v/v).

Mayol y Alarcónenos (2019), determinaron la capacidad antioxidante en la cáscara de aguacate por el método de extracción asistida por microondas, en donde se analizaron dos solventes, acetona y etanol. En el cual los resultados mostraron

que microondas, reduce los tiempos de extracción en un tiempo de 7 min y el solvente más efectivo es el etanol con un total de 281.4 mg GAE g⁻¹ aproximadamente, por lo que este método utilizado es efectivo y verde.

Baiano *et al.* (2014) previamente estudiaron la capacidad antioxidante de apio, coliflor y espárragos con extracto acuoso, por medio de la técnica de extracción asistida por microondas, comparándolo con el sistema convencional con base de desechos sólidos vegetales. En este estudio se determinó la capacidad antioxidante de los extractos, obteniendo como resultado que la extracción asistida por microondas tiene mayor concentración de capacidad antioxidante. Los Autores solo analizaron con agua como solvente, por virtudes como, el cuidado al ambiente misma que se le atribuye a la técnica de microondas. Rivera *et al.* (2021) examinaron la planta de brócoli, analizando hojas, floretes y tallos con etanol. Por medio del análisis de DPPH, como resultado tiene que existe mayor concentración de capacidad antioxidante en las hojas, en comparación con los tallos y hojas es un 45 % más en hojas.

Rodríguez *et al.* (2014) en su trabajo examinaron cáscaras diferentes de híbridos de girasoles, decidiendo las condiciones óptimas (tiempo, temperatura) de microondas para la determinación de capacidad antioxidante empleado como solvente agua. Las condiciones que estos Autores utilizaron fueron: 20 min a 70 °C y 10 min a 90 °C para la extracción de capacidad antioxidante, con lo que consiguieron las mejores condiciones las cuales fueron el de 10 min a 90 °C ($41.02 \pm 4.76 \mu\text{mol TE g}^{-1}$ cáscara de girasol) mientras que 20 min a 70 °C ($29.05 \pm 2.24 \mu\text{mol TE g}^{-1}$ cáscara de girasol), con lo anterior, se pretendió proporcionar información para la aplicación futura a alimentos funcionales o farmacológicos.

8. CONCLUSIÓN

Mediante el empleo de microondas se generaron los extractos con diferentes solventes (agua, etanol y metanol), donde se obtuvo diferencias en la concentración de diferentes compuestos de interés. En clorofilas, el solvente que permitió mayor acarreo fue el etanol, así como capacidad antioxidante, vitamina C, mientras que, para glucosinolatos, fenoles y proteínas el solvente fue el acuso (agua). Por lo anterior, se puede determinar el solvente etanol, como el más adecuado para una mayor obtención de compuestos de interés. Los esquilmos de brócoli son una fuente rica de compuestos que pueden reintroducirse a la cadena de valor empleando metodologías consideradas “verdes”.

9. PERSPECTIVAS.

1. Buscar la forma de poner un patente en los subproductos de brócoli, para hacer llegar estos, a las instalaciones en las que se útil.
2. Analizar la concentración de los solventes (etanol y metanol) y determinar que no tiene una alta toxicidad.
3. Seguir con la investigación de esquilmos de brócoli por la tecnología de microondas, sobre más compuestos que se puedan obtener y así enriquecer más los subproductos.
4. Analizar los compuestos de interés de los extractos después en un determinado tiempo y con ello determinar una vida de anaquel.
5. Existe una elevada cantidad de desperdicios de los alimentos, pero el enfoque en la familia de las crucíferas, por lo cual se pueden llevar a cabo investigaciones futuras.
6. Llevar a cabo investigaciones sobre en qué alimentos poscosecha, pueden ser efectivos los extractos, así como cuál es la principal inhibición de microorganismos en los que actúa.

10. REFERENCIAS.

- Ares AM, Nozal MJ, Bernal J. (2013). Extraction, chemical characterization and biological activity determination of broccoli health promoting compound. *J Chromatogr A*. 13: 78-95.
- Arts IC, Hollman PC. (2005). Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *American Journal of Clinical Nutrition*. 81: 317-325.
- Ayala-Zavala JF, González-Aguilar G, Siddiqui MW. (2018). Plant food by-products: Industrial relevance for food additives and nutraceuticals. *CRC Press*. 4: 359-363.
- Azaizeh H, Tafesh A, Najami N, Jadoun J, Halahliah F, Riepl H. (2011). Efectos antibacterianos sinérgicos de los compuestos polifenólicos de las aguas residuales de las almazaras. *Medicina Complementaria y Alternativa*. 81: 1256-1289.
- Azmir J, Zaidul SM, Rahman MM, Sharif KM, Mohamed A, Sahena F, Jahurul MH, Ghafoor K, Norulaini NA, Omar AM. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*. 117(4): 426-436.
- Baiano A, Bevilacqua L, Terracone C, Conto F, Nobile MA. (2014). Efectos únicos e interactivos de las variables del proceso en las extracciones asistidas por microondas y convencionales de antioxidantes de desechos sólidos vegetales. *J Food Ing*. 120: 135-145.
- Belova VV, Voshkin AAV, Kholkin AI, Payrtm AK. (2009). Solvent extraction of some lanthanides from chloride and nitrate solutions by binary extractants. *Hydrometallurgy*. 97: 198-203.
- Belwal T, Bhatt I.D, Rawal R.S, Pande V. (2017). Microwave-assisted extraction (MAE) conditions using polynomial design for improving antioxidant phytochemicals in *Berberis asiatica* Roxb. ex DC. leaves. *Industrial Crops and Products*. 95: 393-403.
- Bhandari S, Jo J, Lee J. (2019). Comparison of glucosinolate profiles in different tissues of nine Brassica crops. *Molecules Nutrition and Food Research*. 20(9): 15827-15841.

- Borja R, Martín A, Rincón B, Raposo F. (2020). Bioactive compounds from broccoli by-products from supercritical fluid extraction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51: 30-35.
- Bradford MM. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem*. 72: 248-254.
- Cai C, Miao H, Qian H, Yao L, Wang B, Wang Q. (2016). Effects of industrial pre-freezing processing and freezing handling on glucosinolates and antioxidant attributes in broccoli florets. *Food Chemistry*. 210: 451-456.
- Cao Y, Tao Y, Zhu X, Han Y, Li D, Liu C. (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.
- Chandrasekaran S, Ramanathan S, Basak T. (2013). Procesamiento de alimentos en microondas: una revisión. *Alimentos Res Int*. 52(1): 243-61.
- Chuyen HV, Nguyen MH, Roach PD, Golding JB, Parks SE. (2017). Microwave-assisted extraction and ultrasound-assisted extraction for recovering carotenoids from Gac peel and their effects on antioxidant capacity of the extracts. *Food Sci. Nutr*. 6(1): 189-196.
- Clarke DB. (2010). Glucosinolates, structures and analysis in food. *Analytical Methods*. 2(4): 310-325.
- Cory H, Passarelli S, Szeto J, Tamez M, Mattei J. (2018). El papel de los polifenoles en la salud humana y los sistemas alimentarios: una mini revisión. *Nutr Frontal*. 5: 87-93.
- Denev P, Kratchanova M, Cizb M. (2014). Analysis of glycosylated flavonoids extracted from sweet-cherry stems, as antibacterial agents against pathogenic *Escherichia coli* isolates. *Acta Biochimica Polonica*. 157: 37-44.
- 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.

- Devappa RK, Rakshit SK, Dekker RFH. (2015). Forest biorefinery: potential of poplar phytochemicals as value-added coproducts. *Biotechnology Advances*. 33: 681-716.
- Elakremi M, Sillero L, Ayed L, Mosbah M, Labidi J, Salem R, Moussaoui Y. (2022). *Pistacia vera* L. leaves as a renewable source of bioactive compounds via microwave assisted extraction. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*. 29: 100-815.
- Fahey JW, Zalcmann AT, Talalay P. (2001). La química diversidad y distribución de glucosinolatos e isotiocianatos entre plantas. *Fitoquímica*. 56: 5-51.
- Ferreira SS, Passos CP, Cardoso SM, Wessel DF, Coimbra MA. (2018). Microwave dehydration of broccoli by-products and simultaneous extraction of bioactive compounds. *Food Chem*. 246: 386-393.
- Filannino P, Bai Y, Di Cagno R, Gobbetti M, Gänzle M. (2015). Metabolism of phenolic compounds by *Lactobacillus* spp. during fermentation of cherry juice and broccoli puree. *Food Microbiology*. 46: 272-279.
- Forster-Carneiro T, Berni MD, Dorileo IL, Rostagno MA. (2013). Biorefinery study of availability of agriculture residues and wastes for integrated biorefineries in Brazil. *Resour Conserv Recycl*. 77: 78-88.
- Galanakis CM. (2012). Recovery of high added value components of food waste: conventional emerging technologies and commercialized applications. *Trends in Food Science and Technology*. 26: 68-87.
- Ghellam M, Fatena B, Koca I. (2022). Physical and chemical characterization of *Corchorus olitorius* leaves dried by different drying techniques. *Discover Food*. 2(1): 14-16.
- Gudiño I, Martín A, Casquete R, Prieto MH, Ayuso MC, Córdoba MD. (2022). Evaluation of broccoli (*Brassica oleracea* var. italica) crop by-products as sources of bioactive compounds. *Scientia Horticulturae*. 304: 111-284.
- Henderson AJ, Olila CA, Kumar A, Borresen CE, Raina K, Agarwal R, Ryan EP. (2012). Chemopreventive properties of diet rice bran: current status and future prospects. *Adv. Nutrition*, 3: 643-653.

- Hernández Rivas M. (2019). Extraction and characterization of phytochemical compounds from leaves of Mexican lime (*Citrus aurantifolia* Swingle). *Agronomy*. 5: 25-26.
- 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.
- Hervert-Hernández D, Garcia OP, Rosado JR, Goni I. (2011). The contribution of fruits and vegetables to dietary intake of polyphenols and antioxidant capacity in a Mexican rural diet: importance of fruit and vegetable variety. *Food Research International*. 44: 1182-1189.
- Hoffmann D. (1996). Guía familiar de plantas medicinales. Fitoterapia práctica para un bienestar integral. Madrid. *TIKAL*.5: 250-256.
- Hooper L, Cassidy AA. (2006). Review of the health care potential of bioactive compounds. *J. Sci. Food Agric*. 86: 1805-1813.
- Hopkins RJ, van Dam NM, Loon JJ. (2009). Role of glucosinolates in insect-plant relationships and multitrophic interactions. *Annu. Rev. Entomol*. 54: 57-83.
- Hwang JH, Lim SB. (2015). Antioxidant and anticancer activities of broccoli by-products from different cultivars and maturity stages at harvest. *Prev. Nutr. Food Sci*. 20: 8-15.
- Jeffery EH, Araya M. (2009). Physiological effects of broccoli consumption. *Phytochemistry Reviews*. 8(1): 283-298.
- Joudi M, Chanakya HN, Brienzo M, Zhang Bet. (2022). Microwave connective drying in gourd for ascorbic acid. *Food Chemistry*. 2: 68-75.
- Katsampa P, Valsamedou E, Grigorakis S, Makris DP. (2015). A green ultrasound-assisted extraction process for the recovery of antioxidant polyphenols and pigments from onion solid tes using Box-Behnken experimental design and kinetics. *Industrial Crops and Products*. 77: 535-543.
- 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.

- Kirkegaard JA, Sarwar M. (1998). Bioimmigration potential of *brassicacae*. I. Variation in plant glucosinolate profiles of diverse field grown *brassicacae*. *Plant and Soil*. 201: 71-89.
- Kummu M, Moel H, Porkka M, Siebert S, Varis O, Ward PJ. (2012). Lost food, wasted resources: Global food supply chain losses and their impacts on freshwater, cropland, and fertiliser use. *Science of The Total Environment*. 438: 477-489.
- Lampe JW. (2003). Spicing up a vegetarian diet: chemopreventive effects of. *Am J Clin Nutr*. 78: 579-583.
- Lasunon P, Phonkerd N, Tettawong P, Sengkhampan N. (2021). Effect of microwave-assisted extraction on bioactive compounds from industrial tomato waste and its antioxidant activity. *Food Res*. 5(2): 468-474.
- Liazid A, Guerrero R. (2012). Microwave assisted extraction of anthocyanins from grape skins. *Food Chem*. 124 (3): 1238-1243.
- Lipinski B, Hanson C, Lomax J, Kitinoja L, Waite R, Searchinger T. (2013). Reducing food loss and waste. *World Resources Institute Working Paper*. 9: 125-130.
- Liu M, Zhang L, Ser SL, Cumming JR, Ku KM. (2018). Comparative phytonutrient analysis of broccoli by-products: The potentials for broccoli by-product utilization. *Molecules*. 23(4): 900-910.
- Mayol I, Alarcónenos J. (2019). Mejora de la Extracción de polifenoles de cáscara de aguacate por ultrasonido asistido y microondas. *J. Ing. de Procesos de Alimentos*. 42: 97-131.
- Moreno DA, Carvajal M, García-Viguera C. (2007). Health benefits of broccoli. Influence of pre- and post-harvest factors on bioactive compounds. *Food*. 1(2): 297-312.
- Motlagh SR, Elgharbawy AA, Khezri R, Harun R, Omar R. (2021). Ionic liquid-based microwave-assisted extraction of protein from *nannochloropsis* Sp. biomass. In: *Biomass Conversion and Biorefinery*. 5:147-155.
- Murugan SB, Deepika R, Reshma A, Ashwini M, Sathishkumar R. (2014). Assessment of free radical scavenging activities of leaves and stem fractions of green leafy vegetables. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 8(45): 1138-1145.

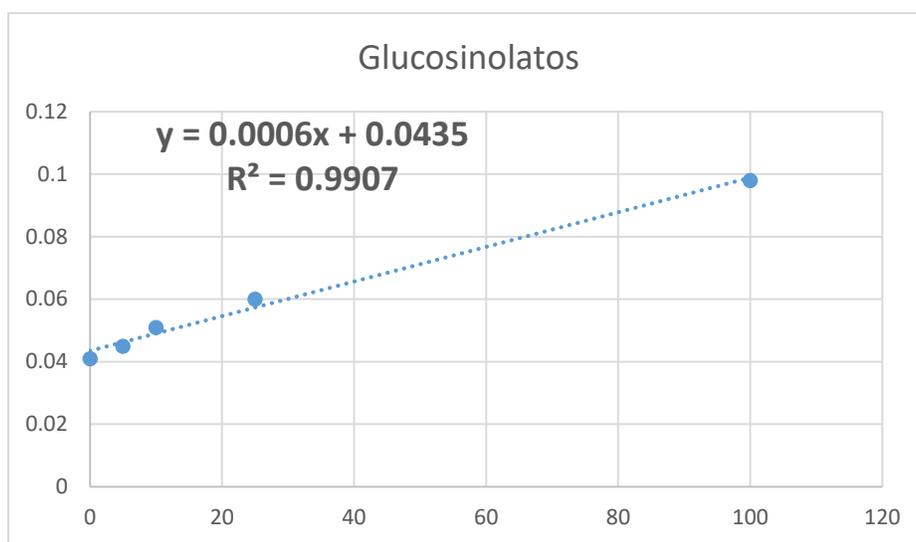
- Ochoa-Rivas A, Nava-Valdez Y, Serna-Saldívar SO, Chuck-Hernández C (2017). Microwave and ultrasound to enhance protein extraction from peanut flour under alkaline conditions: effects in yield and functional properties of protein isolates. *Food Bioprocess Technol.* 10: 543-555.
- Omirou M, Papastylianou I, Iori R, Papastephanou C, Papadopoulou KK, Ehaliotis C, Karpouzas D. (2009). Microwave-assisted extraction of glucosinolates from *Eruca sativa* seeds and soil: comparison with existing methods. *Phytochemical Analysis.* 20(3): 214-220.
- Otles S, Despoudi S, Bucatariu C, Kartal C. (2015). Chapter 1 - Food waste management, valorization, and sustainability in the food industry A2 - Galanakis, Charis M. In *Food Waste Recovery*. San Diego: Academic Press.9: 3-23.
- Paulsen E, Moreno DA, Lema P. (2021). Effect of cooking broccoli florets in microwave bags on the retention of bioactive compounds. *Proceedings of the 9th Workshop on Agri-Food Research For Young Researchers.* 5: 32-35.
- Perlatti B, Forim MR, Zuin VG. (2014). Green chemistry, sustainable agriculture and processing systems: A Brazilian overview. *Chem Biol Technol Agric.* 1: 1-9.
- Podsedeck A, Sosnowska D, Redzynia M, Anders B. (2006). Capacidad antioxidante y contenido de antioxidantes dietéticos de Brassica oleracea. *Int J Food Sci Technol.* 41(1): 49-58.
- Prashant T, Bimlesh K, Mandeep K, Gurpreet K, Harleen K. (2011). Phytochemical screening and Extraction: A Review. *Intern Pharmaceutic Science.* 1(1): 98-106.
- Quiñones M, Miguel M, Aleixandre A. (2012). Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición Hospitalaria.* 27(1): 76-89.
- 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.
- Ran X, Zhang M, Wang, 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: 450-61.

- Rivera-Martin A, Reynolds-Marzal D, Martin A, Velazquez R, Poblaciones MJ. (2021). Combined foliar zinc and nitrogen application in broccoli (*Brassica oleracea* var. italica L.): Effects on growth, nutrient bioaccumulation, and bioactive compounds. *Agronomy*. 11(3): 548-551.
- Rodriguez M, Nolasco SM, Mascheroni R, Quintero-Ramos A. (2014). Microwave extraction of antioxidant compounds in sunflower hulls (*Helianthus annuus* L). *Food Chemistry*. 2: 4-5.
- Rosas D, Ortiz H, Herrera J, Leyva O. (2016). Revalorización de algunos residuos agroindustriales y su potencial de aplicación a suelos agrícolas. *Agroproductividad*. 9(8): 18-23.
- Routray W, Orsat V. (2017). Plant by-products and waste from the food industry: a source of nutraceuticals and biopolymers. *In the food bioconversion*; Grumezescu, AM and Holban, AM, Eds.; Academic Press: Cambridge, MA, USA. 2: 279-315.
- Saval S. (2012). Aprovechamiento de residuos agroindustriales: pasado, presente y futuro. *Bio-Tecnología*. 16(2): 14-16.
- Serino A, Salazar G. (2019). Protective role of polyphenols against vascular inflammation, the aging and cardiovascular diseases. *Nutrients*. 11: 1-23.
- Simon D, Helliwell S. (1998). Extraction and quantification of chlorophyll a from freshwater green algae. *Water Research*. 32(7): 2220-2223.
- Singh J, Upadhyay AK, Kundan P, Anant B, Mathura R. (2007). Variabilidad de caroteno, vitamina C, E y fenoles en vegetales Brassica. *J Food Compos Anal* 20: 106–112.
- Singh K, Kumar T, Prince VK, Sharma S, Rani JA, (2019). Review on converting food waste and by-products into value added products *IJCS*. 7: 2068-2073.
- Sookjitsumran W, Devahastin S, Mujumdar AS, Chiewchan N. (2016). Comparative evaluation of microwave-assisted extraction and preheated solvent extraction of bioactive compounds from a plant material: a case study with cabbages. *International Journal of Food Science & Technology*. 51(11): 2440-2449.

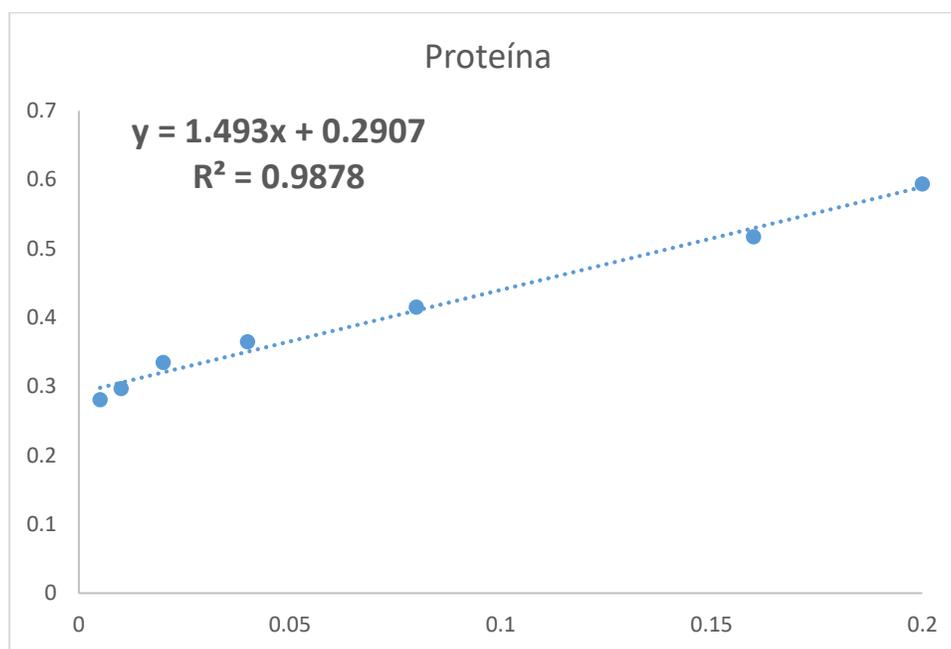
- Soquetta, MB, Terra LM, Bastos CP. (2018). Tecnología verde para la extracción de compuestos bioactivos en frutas y vegetales. *CyTA - Revista de Alimentos*.16 (1): 400-412.
- Su S, Zhou Y, Qin JG, Yao W, Ma Z. (2010). Optimization of the method for chlorophyll extraction in aquatic plants. *Journal of Freshwater Ecology*. 25(4): 531-538.
- Suárez D, Bautista N, Valdez J, Angulo A, Alatorre R, Vega J, Equihua A, Manuel V. (2006). Fluctuación poblacional de *Copitarsia decolora* (Gueéne) y su asociación con crucíferas comerciales. *Agrociencia*. 40 (4): 501-509.
- 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.
- Tomson L, Kruma Z. (2019). Análisis espectrofotométrico de pigmentos en rábano picante mediante el uso de varios solventes de extracción. En: Straumite E, Galoburda R (eds) *FOODBALT 2019 13th Baltic Conference on Food Science and Technology “FOOD NUTRICIÓN BIENESTAR”*. 8: 210–215.
- Vallejo F, Tomás-Barberán FA, García-Viguera C. (2002). Potential bioactive compounds in health promotion from broccoli cultivars grown in Spain. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 82(11): 1293-1297.
- Verkerk R, Schreiner M, Krumbein A, Ciska E, Holst B, Rowland I, Dekker M. (2009). Glucosinolates in Brassica vegetables: The influence of the food supply chain on intake, bioavailability and human health. *Molecular Nutrition and Food Research*. 53(2): 219-265.
- Wall-Medrano A, Olivas-Aguirre FJ, Ayala-Zavala JF, Dominguez-Avila JA, Gonzalez-Aguilar GA, Herrera-Cazares LA, Gaytan-Martinez M, (2020). Health benefits of mango by-products. En: *Food Waste and Byproducts: Nutraceutical and Health Potential*; Campos-Vega, R., Oomah, BD, Vergara-Castaneda, HA, Eds.; Blackwell Publishing: Hoboken, NJ, EUA. 2: 159-191.
- Wang S, Melnyk JP, Tsao R, Marccone MF. (2011). How natural dietary antioxidants in fruits, vegetables and legumes promote vascular health. *Food Research International*. 44: 14-22.

- Wathelet JP, Lori R, Leoni O, Rollin P, Quinsac A, Palmieri S, (2004). *Agroindustria*. 3: 257-266.
- Weng CJ, Yen GC. (2012). Chemopreventive effects of dietary phytochemicals against cancer invasion and metastasis, phenolic acids, monophenol, polyphenol, and their derivatives. *Cancer Treatment Reviews*. 38: 76-87.
- Xavier L, Freire MS, Vidal-Tato I, González-Álvarez J. (2015). Application of aqueous two phase systems based on polyethylene glycol and sodium citrate for the recovery of phenolic compounds from Eucalyptus wood. *Maderas. Ciencia y Tecnología*. 17(2): 345-354.
- Zahoor I, Khan MA. (2019). Microwave assisted convective drying of bitter melon: drying kinetics and effect on ascorbic acid, total phenolics and antioxidant activity. *Journal of Food Measurement and Characterization*. 13: 2481-2490.
- Zhang D, Hamauzu Y. (2004). Phenolics, ascorbic acid, carotenoids and antioxidant activity of broccoli and their changes during conventional and microwave cooking. *Food Chemistry*. 88(4): 503-509.

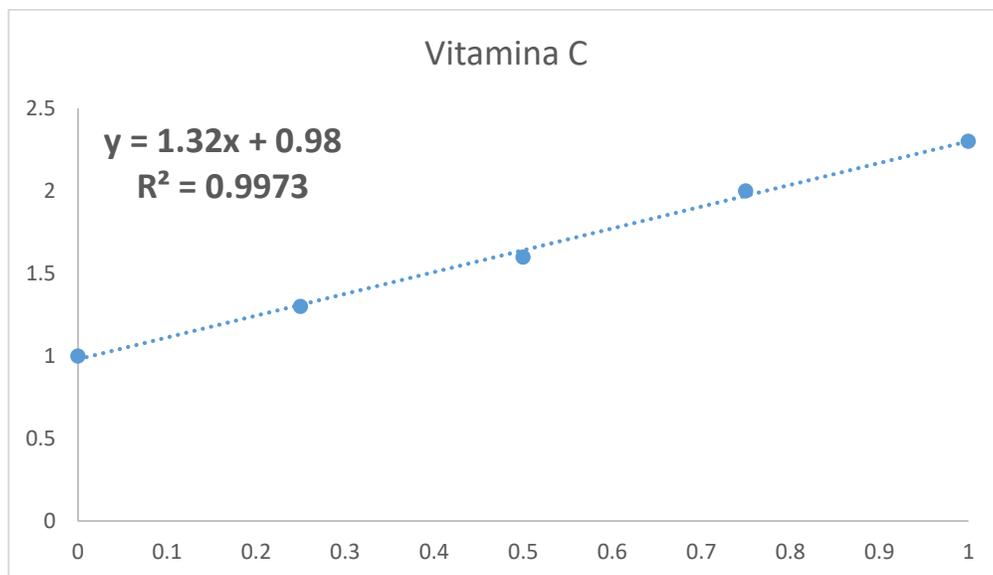
11. ANEXOS.



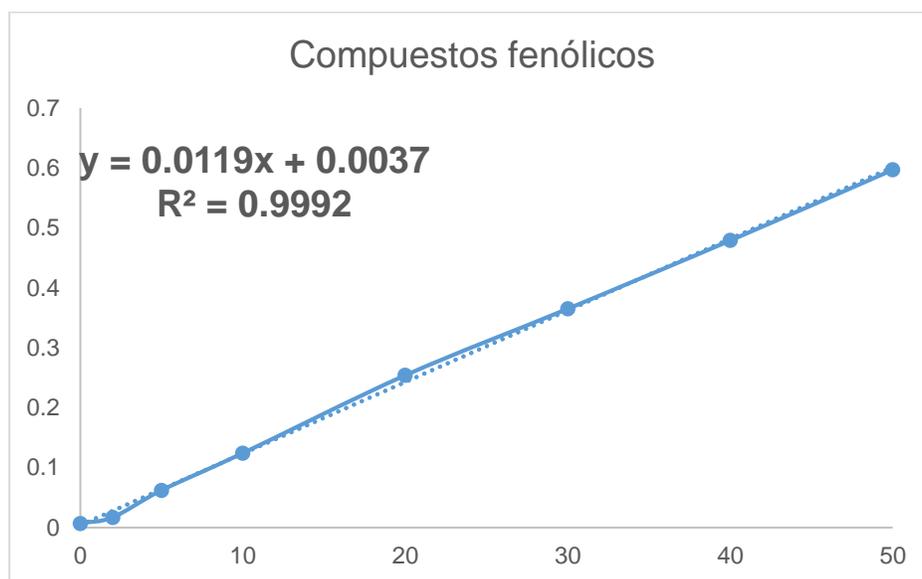
Anexo 1. Curva estándar de sinigrina para GLS.



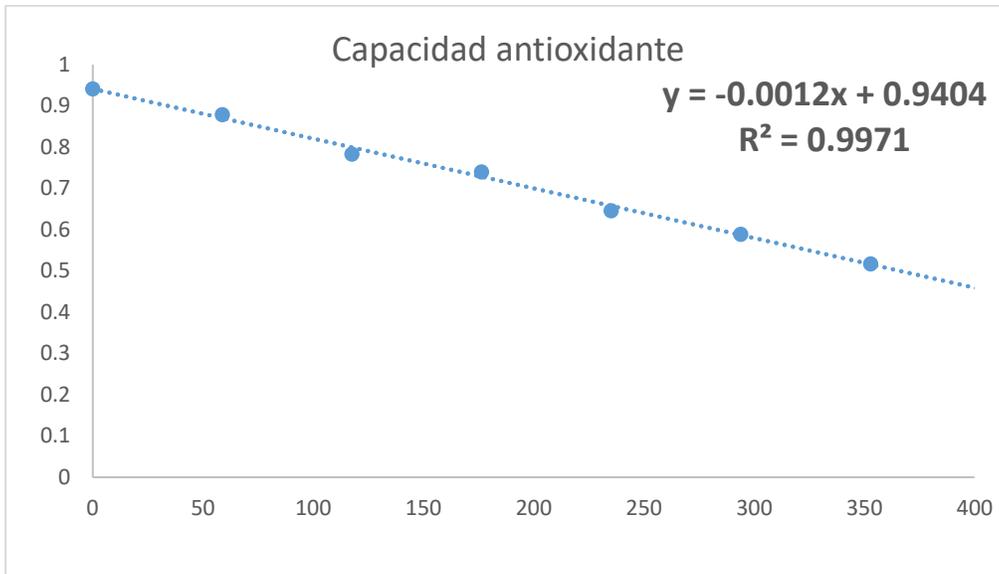
Anexo 2. Curva patrón de albúmina de suero bovino (ASB) para calcular la concentración de proteínas presentes en los diferentes extractos de esquilmos de brócoli.



Anexo 3. Curva padrão de ácido ascórbico para a determinação do conteúdo de vitamina C presente em los diferentes extractos de esquilmos de brócoli.



Anexo 4. Curva padrão de ácido gálico para calcular a concentração de los compostos fenólicos totales presentes em los extractos de esquilmos de brócoli.



Anexo 5. Curva patrón de ácido gálico para calcular la capacidad antioxidante total presente en los extractos de esquilmos de brócoli.