

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL

DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS



**EXTRACTOS DE ESQUILMOS DE BRÓCOLI MEDIANTE ULTRASONIDO
EMPLEANDO DIFERENTES SOLVENTES PARA LA OBTENCIÓN DE
SUBPRODUCTOS DE INTERÉS**

Por:

MARY CARMEN CAMPA GONZÁLEZ

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

**EXTRACTOS DE ESQUILMOS DE BRÓCOLI MEDIANTE ULTRASONIDO
EMPLEANDO DIFERENTES SOLVENTES PARA LA OBTENCIÓN DE
SUBPRODUCTOS DE INTERÉS**

Por:

MARY CARMEN CAMPA GONZÁLEZ

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
Directora Interna

Dra. Lluvia de Abrii Alexandra Soriano Melgar
Directora Externa

Saltillo, Coahuila, México

Mayo, 2023.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL

Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos

EXTRACTOS DE ESQUILMOS DE BRÓCOLI MEDIANTE ULTRASONIDO EMPLEANDO DIFERENTES SOLVENTES PARA LA OBTENCIÓN DE SUBPRODUCTOS DE INTERÉS

Por:

MARY CARMEN CAMPA GONZÁLEZ

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



Dra. María Hernández González
Vocal



Dra. Ana Lilia De Jesús Lázaro
Vocal



M.C. Sarahí del Carmen Rangel Ortega
Vocal Suplente



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



Agradecimientos

Mi más profundo agradecimiento a mi Padre Dios por permite culminar mi carrera universitaria, por estar siempre a mi lado junto con Maria Santísima y cuidarme de todo mal y peligro, por darme agudeza para entender, sabiduría para retener, método y facilidad para aprender, sutileza para interpretar día a día, sé que siempre estarás conmigo para iluminarme y bendecirme siempre, ¡una vez más gracias!

Muchas gracias mi querida ALMA, TERRA, MATER por dejarme ser parte de ti, gracias mi Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro por recibirme con esa solidaridad que te caracteriza, porque a pesar de estar a cientos de kilómetros de casa me hiciste sentir como si no lo estuviera porque podía estar allí los 7 días de la semana, y como dice el popurrí “no le hace que sea domingo allí están si señor todos los buitres” puesto que nunca cierras tus puertas, por cada una de las emociones, estrés, tristeza y como no reconocer esas alegrías en los salones, en el comedor, los laboratorios, las canchas, en fin, en cada rincón tuyo, por cada una de las personas con las que me cruzaste desde los docentes que su único objetivo es formar personas capaces de enfrentar el mundo laboral y ser personas de bien, por esos amigos que siempre llevare en el corazón porque más allá de una amistad es una hermandad, puesto que también tuve la oportunidad de conocer al menos una persona de cada estado de la república, Gracias a ti hoy puedo y tengo el privilegio de decir que soy una Ingeniero en Ciencia y Tecnología de Alimentos egresada de la famosísima Narro, siempre te llevare en el corazón mi amada universidad, que si tuviera la oportunidad de elegirte lo haría una y mil veces más, gracias, por tanto, me despido de ti con el corazón en la mano, mas, sin embargo, no es un adiós sino un hasta pronto.

BUTRE POR SIEMPRE

ORGULLO NARRO

¡Alma, Terra, Mater, ¡Alma, Terra, Mater!!

arda Troya y en combate muera Marte

arda Troya y en combate muera Marte

Buitre, Buitres al ataque.

Muchas gracias Dra. Dolores Gabriela Martínez Vázquez y a la Dra. Lluvia de Abril Alexandra Soriano Melgar por darme la oportunidad de ser pararte de sus trabajos, por cada uno de los conocimientos que me transmitieron, por la paciencia que me han tenido hasta el día de hoy y por impulsarme a ser mejor profesionalista.

Gracias a las instituciones externas por dejarme trabajar en ellas, en la realización de experimentos que forman parte de este proyecto como son el Centro de Investigación de Química Aplicada (CIQA) y la Universidad Autónoma de Coahuila.

A CONACyT por el financiamiento para este proyecto y el apoyo económico a la estudiante Mary Carmen Campa González.

Dedicatoria

A mis PADRES...

Ma. del Carmen González Hernández y J. Carmen Campa Torres, por su apoyo incondicional, confianza y estar siempre conmigo en cada momento, puesto que ustedes fueron mi motivación y fuerza para seguir adelante y echarle ganas cada día, gracias por cada sacrificio y segundo de su trabajo, porque el ser comerciante no es nada fácil, pero si me siento orgullosa de serlo, ya que gracias a ello y a ustedes estoy donde estoy y no me falta nada. Muchas gracias papás por creer en mí y apoyarme en este sueño puesto que es uno de los más importantes de vida, como no recordar aquel 30 de julio de 2018 cuando llegamos a Saltillo sin conocer nada y a nadie, el acompañarme a la parada del buitre ya que sentía un miedo inmenso, pero al mismo tiempo una gran tranquilidad porque estaban ustedes a mi lado. Gracias papás por esa bendición que siempre me dan que me cuida de todo mal y peligro. Es un orgullo y honor para mí poder ser su hija porque sin ustedes no se hubiera logrado, hoy se cumple mi sueño de ser alguien en la vida, pero sé que también es suyo porque lograron sacar a una más de sus hijas/os adelante. ¡Muchas gracias mamá y papá no tengo como pagarles todo lo que me han brindado, pero hoy este reconocimiento es suyo, los AMO con todo mi corazón una vez más muchas gracias!!

A mis HERMANOS...

Juan Manuel, Rocio y Catherine Campa González ya que ustedes fueron mi ejemplo de ser alguien, el verlos como unos ´profesionistas me llena de orgullo y una gran satisfacción, gracias hermanos por creer en mí y apoyarme hasta el final.

A la FAM. GONZALEZ HERNANDEZ

En especial a esas tías/os por estar siempre al pie del cañón en las buenas y en las malas, gracias por darme su apoyo siempre, puesto que nunca me han dejado y sin ustedes tampoco se hubiera logrado, de igual manera no tengo como pagarles todo lo que han hecho, por eso este logro también es de ustedes, así como para mi papá abue y mi mamá Goya porque dejaron su trabajo en manos de mis padres era para

que nunca les faltara nada a nadie de sus hijos y poder darles una buena educación hasta lograr una carrera universitaria, muchas gracias abuelitos hasta el cielo hoy este título es de ustedes y para ustedes también

FINANCIAMIENTO

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”.

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.



Mary Carmen Campa González

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. ANTEDECENTES.	5
5.1. Economía Circular.....	5
5.2. Residuos Agroindustriales.	6
5.3. Generalidades del Brócoli.	6
5.3.1. Descripción Botánica del Brócoli.....	7
5.3.2. Producción Nacional del Brócoli.	7
5.4. Esquilmos de Brócoli.....	8
5.5. Compuestos Funcionales del Brócoli.	8
5.5.1. Glucosinolatos.	9
5.6. Métodos de Extracción.....	9
5.6.1. Ultrasonido.....	10
5.7. Solventes.	10
6. MATERIALES Y MÉTODOS.	12
6.1. Material Vegetal.	12
6.2. Métodos de Extracción.....	12
6.3. Tratamientos a Base de Diferentes Solventes.	12
6.4. Determinaciones.	14
6.4.1. Contenido de Glucosinolatos.	14
6.4.2. Clorofilas a, b y Totales.	16
6.4.3. Vitamina C.	16
6.4.4. Compuestos Fenólicos Totales.....	17
6.4.5. Capacidad Antioxidante Total.	17
6.4.6. Proteínas.	17
6.5. Diseño Experimental.	18

6.6. Análisis Estadístico.....	18
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	19
7.1. Glucosinolatos.....	19
7.2. Clorofila <i>a</i>	21
7.3. Clorofila <i>b</i>	22
7.4. Clorofilas Totales.	23
7.5. Vitamina C.....	24
7.6. Compuestos Fenólicos Totales.....	26
7.7. Capacidad Antioxidante Total.	28
7.8. Proteínas Totales.....	29
8. CONCLUSIÓN.	32
9. PERSPECTIVAS.....	33
10. REFERENCIAS.....	34
11. ANEXOS.	43

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Contenido de glucosinolatos totales (g de GLS Kg ⁻¹ de tejido vegetal) en los extractos de brócoli con diferentes solventes (agua, metanol y etanol) mediante extracción por ultrasonido.	19
Figura 2. Contenido de clorofila <i>a</i> (µg de clorofila <i>a</i> mL ⁻¹ de extracto) en los extractos de brócoli con diferentes solventes (agua, metanol y etanol) mediante extracción por ultrasonido.	21
Figura 3. Contenido de clorofila <i>b</i> (µg de clorofila <i>b</i> mL ⁻¹ de extracto) en los extractos de brócoli con diferentes solventes (agua, metanol y etanol) mediante extracción por ultrasonido.	22
Figura 4. Contenido de clorofilas totales (µg de clorofilas mL ⁻¹ de extracto) en los extractos de brócoli con diferentes solventes (agua, metanol y etanol) mediante extracción por ultrasonido.	23
Figura 5. Contenido de vitamina C (mg de ácido ascórbico 100 mL ⁻¹ de extracto) en los extractos de brócoli con diferentes solventes (agua, metanol y etanol) mediante extracción por ultrasonido.	25
Figura 6. Contenido de compuestos fenólicos totales (µg EAG mL ⁻¹ de extracto) en los extractos de brócoli con diferentes solventes (agua, metanol y etanol) mediante extracción por ultrasonido.	27
Figura 7. Capacidad antioxidante total (µmoles EAG mL ⁻¹ de extracto) en los extractos de brócoli con diferentes solventes (agua, metanol y etanol) mediante extracción por ultrasonido.	28
Figura 8. Contenido de proteínas totales (mg mL ⁻¹ de extracto) en los extractos de brócoli con diferentes solventes (agua, metanol y etanol) mediante extracción por ultrasonido.	30

1. INTRODUCCIÓN.

La ingesta de brócoli previene enfermedades crónicas y cardiovasculares, así mismo, mejora el funcionamiento del tracto gastrointestinal por el alto contenido de fibra (Jeffery *et al.*, 2009). En los últimos años, se ha incrementado la producción de brócoli (*Brassica oleracea* var. *Itálica*) debido al gran aporte nutricional que brinda, lo que genera un exceso de producción de material vegetal considerado desperdicio, al eliminar las hojas y tallos de este cultivo, los cuales no son consumidos. Los capullos de brócoli (parte comestible de la planta) representan una parte mínima de la biomasa total (Fink *et al.*, 1999). Por lo tanto, es necesario buscar alternativas en las que se aproveche los esquilmos de brócoli (tallos y hojas) y así disminuir la contaminación ambiental que esto genera.

Algunos subproductos de la industria agroalimentaria son útiles por el aporte de nutrientes e ingredientes potencialmente funcionales, ayudando a obtener productos de valor agregado. Una de las alternativas que se están evaluando es la elaboración de extractos mediante el uso de tecnologías emergentes, como es el caso de ultrasonido; es una tecnología no térmica, la cual se basa en la inactivación enzimática. Se considera como una “tecnología verde”, debido a la gran utilidad en los procesos alimentarios (Fu *et al.*, 2020). El uso de los subproductos del brócoli está limitado a la elaboración de harina y fibra (Campas-Baypoli, 2009) y a la extracción de glucosinolatos (West *et al.*, 2004; Campas-Baypoli, 2009).

El brócoli contiene glucosinolatos e isotiocianatos, compuestos fenólicos, carotenoides, minerales (Na, S, O, Fe, Zn, etc.) y nutrientes esenciales (vitaminas A, B, C, etc.) (Agriculture, 2011; Dominguez-Perles *et al.*, 2010). Las propiedades de alimentación saludables del brócoli son gracias al contenido alto de fitoquímicos bioactivos que son compuestos de nitrógeno-azufre, compuestos fenólicos (derivados del ácido clorogénico, flavonoides y ácido sináptico) (Premier, 2002). La absorción de los nutrientes en el cuerpo humano dependerá de la cantidad consumida de brócoli (Agriculture, 2011; Dominguez-Perles *et al.*, 2010; Jeffery *et al.*, 2009).

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 y 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: clorofilas, compuestos fenólicos y 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 solvente adecuado para el acarreo de compuestos de interés a partir de la aplicación de ultrasonido en esquilmos de brócoli.

3.2. Objetivos Particulares.

- a) Obtener extractos a partir de esquilmos de brócoli mediante ultrasonido empleando diferentes solventes (agua, etanol y metanol) para su caracterización.
- b) Determinar el contenido de glucosinolatos en los extractos generados por ultrasonido, empleando diferentes solventes.
- c) Evaluar el contenido de clorofilas (*a*, *b* y totales), vitamina C, compuestos fenólicos y capacidad antioxidante total de los diferentes extractos.
- d) Determinar el contenido de proteína total presente en los diferentes extractos.
- e) Definir el solvente adecuado para una mayor obtención de compuestos de interés.

4. HIPÓTESIS.

La generación de extractos por ultrasonido, variando los solventes, acarreará diferentes compuestos y en diferentes concentraciones, lo que permitirá encontrar el procedimiento de extracción óptimo de compuestos de interés (glucosinolatos, clorofilas *a*, *b* y totales, vitamina C, fenoles, capacidad antioxidante y proteína) en residuos (esquilmos) de brócoli.

5. ANTEDECENTES.

5.1. Economía Circular.

Existe una gran variedad de agentes participantes en el campo social de la producción de brócoli, los cuales son: unidad de producción familiar (UPF), viveristas, casas comerciales de agroquímicos, intermediarios o empresas emparadoras o exportadoras; la producción de brócoli es considerada como un espacio social que se define en función de los diferentes agentes. La producción agrícola está dirigida por la posición de campo, así mismo la fuerza y disponibilidad del capital económico, social y cultural (Bourdieu *et al.*, 2001).

El precio del brócoli es de gran importancia para los diferentes productores, ya que existe una relación entre precio y costo, los costos de producción es el capital que productor invierte para producir brócoli (Bourdieu *et al.*, 2002; Fonseca, 2013). El 87.89 % de los productores muestran costos de producción bajos mientras que el 12.11 % son medios y altos (Foncesa, 2013). La variabilidad de los costos se refleja por la posesión del capital lo que genera bajas inversiones para el cultivo bien la rentabilidad del suelo, sin embargo, los precios dependen de la función de producción de brócoli, los cuales fueron: venta en nivel bajo \$10.00, nivel medio \$13.00, nivel alto \$15.00 por kilogramo. Mientras que en las tiendas de autoservicio como Wal-Mart, Chedraui y Soriana el precio oscila entre: \$11.50, \$14.50, \$17.50, \$18.00, \$18.90, \$19.90 y \$20.20 (Bourdieu *et al.*, 2002). El precio de compra, es el factor de negociación de cada participante de acuerdo a las estrategias de su negociación, con la finalidad de obtener un beneficio económico mutuo obtenido por la comercialización de brócoli (Bourdieu *et al.*, 2001). Sin embargo, la agricultura presenta desniveles de acuerdo al mercado y precio, ya que cuando no hay buena producción de hortalizas los productos se escasean y es aquí cuando el productor tiene un aumento monetario. No obstante, cuando ocurre lo contrario y hay una mayor producción de hortalizas el precio varía mucho, el cual es muy económico y una desventaja que presenta esto es el desperdicio excesivo de las hortalizas el cual impacta al medio ambiente (Gutiérrez-Robles *et al.*, 2017).

5.2. Residuos Agroindustriales.

Desde tiempo atrás la producción alimentaria genera grandes cantidades de residuos, sin embargo, hoy en día oscila entre 1.3 millones de toneladas (ton/año) en procesos primarios y secundarios de la cadena productiva (Xia *et al.*, 2016). El desaprovechamiento de los residuos agroalimentarios genera altos costos para el productor o procesador, por lo tanto, provoca daños al medio ambiente. No obstante, estos residuos tienen aspectos positivos puesto que son fuente de energía, contienen valores agregados muy altos y grandes componentes bioactivos, por consiguiente, son una valiosa fuente aprovechamiento para generar subproductos a base de ellos (Ayala *et al.*, 2018).

Estos residuos tienen un alto rendimiento por su bioactividad, entre los que destacan: compuestos fenólicos, vitaminas, proteínas, entre otros, puesto que tienen grandes beneficios para la salud y combatir algunas enfermedades crónicas (Cory *et al.*, 2018; Picolella *et al.*, 2019; Serino *et al.*, 2019). Cabe destacar la importancia de su aprovechamiento de estos residuos agroindustriales, ya que pueden ser sometidos a una diversidad de métodos y en particular algunos desechos son considerados para extracción asistida por ultrasonido o microondas empleando diferentes solventes (Bouarab *et al.*, 2019).

Los residuos hortalizas son unos de los que más producción hay, cada estado de la República Mexicana produce desperdicios de acuerdo a los cultivos que desarrolla; puesto que los estados de Guanajuato y Puebla son unos de los que producen grandes cantidades de crucíferas en especial el brócoli y esto es gracias a los diversos factores que tienen como son: suelo, agua, clima, entre otros (SAGARPA, 2017).

5.3. Generalidades del Brócoli.

El brócoli proviene de la zona del Mediterráneo Oriental, donde se dice que apareció de forma silvestre hace miles de años, de igual forma se presentó en algunos lugares conocidos actualmente como la Península de Anatolia, Siria y el Líbano. La llegada del brócoli a América fue un poco tarde, pero no fue un

impedimento para que este vegetal se adaptara fácilmente a los suelos y climas de América. En los lugares más sobresalientes del oeste de EUA se convirtió en uno de los vegetales preferidos, por lo que a principios del siglo XX y XXI aumentó el consumo de este vegetal (InfoAgro, 2021). Al paso de los días, la producción y el consumo de brócoli ha aumentado ya que se ha esparcido en varias regiones de Latinoamérica, siendo catalogado como un vegetal alimento-vegetal saludable con grandes propiedades nutritivas y medicinales (InfoAgro, 2021).

5.3.1. Descripción Botánica del Brócoli.

El brócoli es un vegetal dicotiledóneo anual que pertenece a la familia Cruciferae, el cual recibe como nombre científico *Brassica oleracea* L. var *itálica*. Este vegetal tiene una grande relación con otras variedades de la misma especie, *Brassica oleracea*, entre las que más destacan son: la col (*B. oleracea* L. var *capitata*), la coliflor (*B. oleracea* L. var *botrytis*), la col de Bruselas (*B. oleracea* L. var *gemmifera*) y el colinabo (*B. oleracea* L. var *gongylodes*), entre otras. De acuerdo a su morfología, el brócoli es herbáceo y está compuesto por distintas partes como son: raíces, hojas, tallo principal, flores, inflorescencias y fruto (Toledo, 2003).

5.3.2. Producción Nacional del Brócoli.

En México, el cultivo de brócoli está en gran auge gracias al nombramiento que le dieron como alimento funcional (Bachiega *et al.*, 2016). Hace algunos años, el suelo destinado a su producción era de 31,904 ha, el cual tuvo un rendimiento promedio de 15.9 t ha⁻¹, ya que se produjeron 507,482 t con un aprovechamiento de \$2,707 millones de pesos (SIAP, 2018). Los principales estados productores de brócoli en México son Michoacán, Puebla y Guanajuato, ya que representan un 81 % de la producción nacional (SIAP, 2018). Gran parte del brócoli cosechado en México es destinado a la exportación, aproximadamente más del 60 % (SIAP, 2018). Sin embargo, el consumo del mercado interior día a día está en aumento gracias a las propiedades nutrimentales que ofrece (SIAP, 2018).

5.4. Esquilmos de Brócoli.

Hoy en día la industria alimentaria genera una cantidad muy elevada de esquilmos de agrícolas, cuyo aumento presenta una problemática ambiental. Sin embargo, los esquilmos agrícolas pueden tener diferentes usos debido a la gran cantidad de compuestos bioactivos y fitoquímicos que tienen, por lo que son esquilmos con un alto valor agregado y económico en la industria de alimentos (Joshi *et al.*, 2008; Sagar *et al.*, 2018).

Aproximadamente, la producción mundial de crucíferas en 2019 fue de 70,150,406 ton, ya que a nivel nacional se produjo 203,986 ton de crucíferas (FAOSTAT, 2021). El brócoli (*Brassica oleracea* L. var *itálica*) es un vegetal que tiene muchas partes que no son consumidas, pero pueden ser útiles para consumo (tallos y hojas) (Moreno *et al.*, 2008). Sin embargo, el brócoli genera grandes cantidades de desechos o esquilmos, el cual representa entre el 60-75 % de la producción (Petkowicz-Williams *et al.*, 2020).

5.5. Compuestos Funcionales del Brócoli.

El consumo de brócoli ha tenido un gran crecimiento en los últimos años por la población humana y es gracias a los beneficios que aporta, como es su composición nutritiva, lo que hace que entre en la cadena de los súper alimentos. El aporte nutricional y funcional del brócoli es por el gran contenido de compuestos bioactivos, tales como: el nitrógeno y el azufre, ya que de ellos se derivan los metabolitos secundarios que son los glucosinolatos e isotiocianatos, catalogados como agentes anticancerígenos, además de que pueden ser empleados para la defensa contra plagas o enfermedades en algunas plantas (Halkier y Gershenzon *et al.*, 2006; Abdull Razis *et al.*, 2011). Los compuestos fenólicos provienen del ácido sinápico y ácido clorogénico, las vitaminas con las que cuenta son: A, C, E y K, así como, los minerales en los que destaca son: Na, K, Ca, Fe, entre otros (Premier *et al.*, 2002; Jeffery *et al.*, 2003; Moreno *et al.*, 2006).

5.5.1. Glucosinolatos.

Los metabolitos secundarios presentes en el brócoli son los glucosinolatos, tienen un alto contenido de azufre, a este grupo de metabolitos se le han hecho una serie de evaluaciones, tales como: contenido de compuestos nutraceuticos, genética bioquímica, efectos de los glucosinolatos en diferentes variedades de brócoli, así como, su inactivación enzimática (Bones *et al.*, 2006).

Los glucosinolatos derivan a isotiocianatos, presentes en el núcleo de los vegetales, que están unidos con tioglucosa y un grupo radical adicional, siendo el carbono principal el de la glucosa, el cual sufre más cambios en su estructura ya que cuentan con una clasificación extensa de cadenas laterales (alquilo, benzonatato, grupos aromáticos, contenido de azufre, glucosilaciones, entre otros); además de que las cadenas de radicales pueden tener en su estructura dobles enlaces (hidroxilo, carbonilo, metoxi y oxo); en el año de 2001 se estableció que existen alrededor de 120 tipos de glucosinolatos individuales y hasta hace unos años no se han reportado cambios o nuevos grupos de glucosinolatos (Hopkins *et al.*, 2009). La biosíntesis de los glucosinolatos está regulada por enzimas o catalizadores provenientes de proteínas, la enzima presente en el brócoli es la hidrolasa conocida como mirosinasa (Wathelet *et al.*, 2004).

5.6. Métodos de Extracción.

Existe una gran variedad de tecnologías alternativas en la industria alimentaria, cada una con diferente enfoque. Entre ellas, los métodos de extracción se basan en el uso de diferentes solventes orgánicos, tales como: el etanol y el metanol. Algunos de los métodos de extracción tienen diversas restricciones como un alto gasto de solvente y tiempos extensos para su extracción, por lo que es necesario buscar soluciones para perfeccionar la metodología con la finalidad de obtener una mejor calidad y rendimiento de éstos (Rodríguez-Bernaldo *et al.*, 2010). Dentro de los métodos más destacados se encuentran el uso de fluidos supercríticos, microondas (Setyaningsih *et al.*, 2015) y ultrasonido (Hussam *et al.*, 2013).

La extracción por ultrasonido contribuye a encontrar compuestos de interés (Hussam *et al.*, 2013). La extracción de los componentes bioactivos del brócoli dependerá del solvente utilizado, ya que darán composiciones diferentes de acuerdo al componente en el extracto, ya que la solubilidad es diferente con cada solvente, por tal motivo la bioactividad de un extracto de acuerdo al solvente va a cambiar (Lou *et al.*, 2014).

5.6.1. Ultrasonido.

Las ondas de sonido que presentan altas frecuencias y que son percibidas por el oído humano reciben el nombre de ultrasonido (US). El ultrasonido tiene ondas con frecuencias entre los 16 KHz y 20 MHz, ya que si se aplican pueden alcanzar frecuencias hasta de 5 MHz en gases o hasta 500 MHz en sólidos y líquidos (Bermúdez-Aguirre *et al.*, 2008). El ultrasonido al ser una tecnología no térmica tiene la ventaja de que los productos procesados por ello disminuyen las pérdidas de nutrientes esenciales, características organolépticas y contribuye en las búsquedas de compuestos bioactivos durante la extracción, además reduce los tiempos de proceso, el consumo de disolvente orgánico, reduce el uso de disolventes tóxicos, costos y energía (Mason *et al.*, 1996).

El ultrasonido es considerado una tecnología emergente, ya que cuenta con un sinfín de beneficios entre los cuales destacan, la inactivación microbiana y enzimática, esta tecnología ha sido objeto de una amplia evaluación en la industria alimentaria, destacándose en el control de calidad de algunos alimentos. El ultrasonido tiene la capacidad de romper paredes y membranas celulares, está catalogada como una tecnología capaz de destruir microorganismos a temperaturas de procesamiento inferiores a la temperatura de esterilización, además de hacer extracciones de tejidos vegetales, entre otras (Demirdoven *et al.*, 2009).

5.7. Solventes.

La extracción de los compuestos de interés dependerá del rendimiento cuantitativo y cualitativo, así mismo, de la polaridad del disolvente utilizado. Se ha estudiado el empleo de metanol, etanol, cetona, de igual forma mezclados con agua

en diversas proporciones para usarse como solventes de extracción, ya que no existe un solvente o método fijo, por ello presentaran una variabilidad en la composición química de los compuestos a extraer, así mismo, en la cantidad, en los factores de concentración del solvente, tamaño de partícula, tiempo de contacto, temperatura, entre otros (Amyrgialakiu *et al.*, 2014; Aspe-Fernandez *et al.*, 2011; Gironi *et al.*, 2011; Capriotti *et al.*, 2014).

El empleo de los solventes orgánicos para la extracción es muy eficaz y fácil, pero al mismo tiempo es algo caro ya que se requieren de cantidades muy grandes de solvente, de igual forma pueden presentar algunas controversias en el uso humanos debido a que pueden quedar residuos del solvente orgánico en el extracto. Por tanto, en la medicina tradicional, se dice que las plantas deben ser maceradas en mezclas hidroetanólicas con etanol al 30 % (Hoffmann *et al.*, 1997) o al 70 % (Sosa *et al.*, 1997) ya que tienen una baja toxicidad para el consumo del ser humano, sin embargo, se puede decir que es una metodología de extracción segura y eficaz (Xavier *et al.*, 2015). La determinación de glucosinolatos de productos vegetales es mejor con solventes proticos, por lo que el uso de agua-metanol ha aumentado Es recomendable realizar una dilución 1:10 de etanol-agua y/o 7:30 en el caso del metanol-agua para las extracciones basadas en materia vegetal (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 son originarios de Puebla, México. Los esquilmos (hojas) fueron almacenados en una cámara de refrigeración a 4 °C, para después lavarlas y someterlas a secado por convección a 45 °C durante un periodo de 24 h. Antes de ingresar a la estufa, las hojas fueron cortadas en trozos pequeños para que existiera un secado parejo homogéneo, las cuales fueron colocadas en charolas de aluminio. Una vez transcurrido el tiempo de secado, se trituraron las hojas en un molino de uso doméstico (licuadora) por un tiempo de 2 min. La muestra molida fue envuelta en papel aluminio, ya que se debe evitar el contacto con la luz y humedad, almacenándose en un desecador con su previa etiqueta (fecha, peso). Posteriormente, la muestra molida se colocó en un tamiz con una malla de #100 (tamaño de partícula $\leq 150 \mu\text{m}$). La muestra tamizada se almacenó en papel aluminio para cubrirla de la luz y protegerla de la humedad.

6.2. Métodos de Extracción.

Para la extracción se empleó un ultrasonido (Ultrasonic Microwave Comperative Workstation, Atpio, XO-SM400, Nanjing, China). Las condiciones del equipo de ultrasonido fueron:

- Power ratio: 20
- One relay: 10
- Off relay: 3
- Amp. Transformer: 25
- Set time: 20 min

6.3. Tratamientos a Base de Diferentes Solventes.

El método de extracción fue por ultrasonido y los solventes fueron agua, metanol y etanol; iniciando con la inactivación de la enzima mirosinasa. Se pesaron 44.4 g de muestra tamizada en una charola pequeña de aluminio, la charola con la

muestra se colocó en una parrilla eléctrica para comenzar con la inactivación de la mirosinasa durante 20 min, mantenido una temperatura de 80 °C. Este procedimiento se llevó a cabo para cada solvente:

1) Agua (extracto acuoso): se midieron 1000 mL de agua destilada para después calentarla 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 el matraz en la parrilla cumpliendo con el tiempo y temperatura ya mencionadas. Se dejó pasar un tiempo de tal forma que la muestra se enfriara para después vaciarla en el reactor del ultrasonido con su debido acomodo y aplicando las condiciones mencionas 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. El extracto filtrado se guardó en un recipiente de plástico envuelto en papel aluminio con la etiqueta correspondiente para después guardarlo en un refrigerador a 4 °C para su futuro uso.

2) Etanol al 70 %: se midieron 700 mL de etanol absoluto y 300 mL de agua destilada para después calentar por 20 min, manteniendo una temperatura de 80 °C en una parrilla eléctrica. Una vez transcurrido el tiempo se le añade la muestra haciendo una homogenización completa. Después se coloca el matraz homogenizado en la parrilla cumpliendo con el tiempo y temperatura ya mencionadas. Se dejó pasar un tiempo de tal forma que la muestra se enfriara para después vaciarla en el reactor del ultrasonido con su debido acomodo y aplicando las condiciones mencionas 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. El extracto filtrado se guardó en un recipiente de plástico envuelto en papel aluminio con la etiqueta correspondiente para después guardarlo en un refrigerador a 4 °C para su futuro uso.

3) Metanol al 70 %: se midieron 700 mL de metanol y 300 mL de agua destilada para después calentar por 20 min, manteniendo una temperatura de 80 °C en una parrilla eléctrica. Una vez transcurrido el tiempo se agregó la muestra haciendo una homogenización completa. Después se colocó el matraz

homogenizado en la parrilla cumpliendo con el tiempo y temperatura ya mencionadas. Se dejó pasar un tiempo de tal forma que la muestra se enfriara para después vaciarla en el reactor del ultrasonido con su debido acomodo y 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. El extracto filtrado se guardó en un recipiente de plástico envuelto en papel aluminio con la etiqueta correspondiente para después guardarlo en un refrigerador a 4 °C para su futuro uso.

6.4. Determinaciones.

Se llevó a cabo la determinación de glucosinolatos, clorofilas *a*, *b* y totales, vitamina C, fenoles, capacidad antioxidante y proteína, donde cada una de las determinaciones de los extractos se realizó por triplicado.

6.4.1. Contenido de Glucosinolatos.

La extracción de glucosinolatos de los diferentes extractos se llevó a cabo con la siguiente metodología: primero se tomó 15 mL de cada uno de los extractos, para después centrifugarlos por 3 min a 4000 rpm (Centrifuga Valedprime, EUA). Una vez centrifugados los extractos, se les realizó una purificación por medio de un cartucho LC-SAX (Supelco, Anytical Products, EUA), al cartucho se le acondicionó una aguja, la cual traspasó un corcho de madera el cual embona en un matraz kitasato para después conectarlo a una bomba de vacío (Rocker 300, AC 100V-120V, Taiwan) por medio de una manguera y así continuar con la filtración del extracto purificado. La purificación consta del siguiente procedimiento:

i. Acondicionamiento: se le agregan 3 mL de metanol al 100 % al cartucho, después 3 mL de agua para eliminar el metanol anterior, posteriormente se adiciona 2.5 mL de acetato de sodio 0.5 M, por último, se agregan otros 2.5 mL de agua para filtrar el acetato de sodio.

ii. Adsorción: al cartucho acondicionado se le adiciona 3 mL de cada uno de los extractos (etanol, metano y acuoso).

iii. Lavado: se agregan 2.5 mL de agua al cartucho para hacer un previo enjuague y eliminar los residuos que no son requeridos.

iv. Elusión: por último, se añaden 3 mL de cloruro de sodio al 0.5 M para después almacenar los compuestos de interés en un tubo de ensaye. El extracto purificado se almacenó en frío cubriéndolo de la luz.

Después, cada uno de los extractos purificados se liofilizaron (Labconco, FreZone 2.5 plus, EUA) por 36 h. De los tres extractos liofilizados, se tomaron 40 mg en microtubo para añadirle 700 μ L de acetato al 0.2 M con un pH de 4.2, el microtubo se agitó por 15 min en un vórtex, enseguida se le agregó 100 μ L de acetato de plomo y bario al 0.5 M para después se agitó de nuevo en un vórtex (Genie 1, Touch Mixer, EUA) por 2 min, al mismo microtubo se le añadió 50 mg de polivinilpolipirrolidona (PVPP) incubándolo por 10 minutos a temperatura ambiente, después del tiempo esperado se colocaron 100 μ L de sulfato de sodio al 2 M. Cada microtubo con los extractos correspondientes se centrifugó a 13,000 rpm por 5 min. De los extractos centrifugados, se tomaron 200 μ L y se colocaron en otro microtubo para después mezclarse con 200 μ L de hidróxido de sodio al 2 M para después incubarlos por 30 min a temperatura ambiente, una vez pasado el tiempo esperado se le añadió 30 μ L de ácido clorhídrico para centrifugarlos a 4000 rpm por 10 min. De la mezcla anterior se tomaron 20 μ L para colarlos en una microplaca, adicionando 100 μ L de ferrocianuro al 0.2 M con pH de 7.0 para después introducirlo al espectrofotómetro (EPOCH 2, Biotek) con una absorbancia de 420 nm lo nos permitirá medir la cantidad de glucosinolatos presentes en cada uno de los extractos, el blanco usado fue fosfato al 0.2 M, pH 7.0. El contenido de glucosinolatos se caculó por medio de una curva de calibración de sinigrina usando las dos ecuaciones (1 y 2), el resultado se reportó en g Kg^{-1} .

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

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

6.4.2. Clorofilas *a*, *b* y Totales.

Para la determinación de clorofilas *a*, *b* y totales se llevó a cabo el siguiente procedimiento (Sumantana *et al.*, 2014): Se tomaron 500 µL del extracto de brócoli (acuoso, etanólico y metanólico), homogenizándolo con 10 mL de metanol al 80 %. La muestra homogenizada se colocó en una centrifuga a 10,000 rpm durante 15 min a 4 °C. Al retirar de la centrifuga cada uno de los extractos se realizó una dilución 1:10. De cada extracto con su dilución correspondiente se tomó 1 mL que se colocó en las celdas correspondientes del espectrofotómetro para medir su absorbancia a 652, 665 y 470 nm. Una vez obtenidas cada una de las absorbancias, se determinó el contenido de clorofilas mediante las siguientes ecuaciones:

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

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

Las clorofilas totales es la suma de las clorofilas *a* y *b*.

$$\text{Chl total} = \text{Chl}_a + \text{Chl}_b \quad (\text{ecuación 5}).$$

6.4.3. Vitamina C.

La técnica para la determinación de vitamina C se realizó por el método volumétrico del 2,6-diclorofenolindofenol (Método 697,21 de la AOAC, 2002), el cual se basa en el poder reductor del ácido ascórbico, donde se reduce el 2,6-diclorofenol por acción del ácido ascórbico de forma incolora en medio ácido. Se midieron 1 mL de cada uno de los extractos (acuoso, etanólico y metanólico), después se agregó 1 mL de solución meta fosfórico/acético más 8 mL de agua destilada. Los resultados se reportaron mediante una curva patrón de ácido ascórbico, utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Vitamina C} \frac{\text{mg}}{100\text{g}} = \frac{\text{mL gastados de reactivo de Thielman} * \text{FT} * \text{FD} * 100}{V A * P} \quad (\text{ecuación 6}).$$

Donde:

FT = mg de ácido ascórbico equivalentes a 1 mL de reactivo de Thielmann.

FD = Factor de dilución.

VA = Volumen total en mL del jugo.

P = Peso de muestra en g.

6.4.4. Compuestos Fenólicos Totales.

La determinación de compuestos fenólicos totales se realizó por el método de Folin-Ciocalteu, la cual se basa en la capacidad de los fenoles al entrar en contacto con los agentes oxidantes. Se mezclaron 100 μL del extracto (acuoso, metanólico y etanólico, con las diluciones correspondientes) con 500 μL del reactivo Folin Ciocalteu (1:10 en agua, v/v) y se incubó por 1 min. Posteriormente, se le agregaron 400 μL de carbonato de sodio al 7.5 % y se agitó. La mezcla de reacción se incubó durante 30 min a temperatura ambiente (Singleton *et al.*, 1965). Se midió la absorbancia a 765 nm, calibrando el equipo con agua. A la par se realizó una curva patrón de ácido gálico (0-200 μg de ácido gálico mL^{-1}). Los resultados fueron reportados como μg equivalentes de ácido gálico (EAG) mL^{-1} de extracto.

6.4.5. Capacidad Antioxidante Total.

El procedimiento para la determinación de la capacidad antioxidante se elaboró por la técnica de DPPH descrita por Brand-Williams (1995), la cual consiste en desactivar los radicales libres, ya que el radical libre es el DPPH (2, 2, difenilpicril hidracilo). Cada uno de los extractos correspondientes (acuoso, etanólico y metanólico) se diluyeron a 1:10. Se mezclaron 950 μL de DPPH con 50 μL de la dilución de cada uno de los extractos. Posteriormente, se dejó pasar un lapso de 15 min para después leer la absorbancia en un espectrofotómetro (Thermo Electron Corporation, GENESYS 10 UV, EUA) a 515 nm. Se realizó una curva patrón de ácido gálico (0-294 μmoles de ácido gálico mL^{-1}). Los resultados se reportaron como μmoles EAG mL^{-1} de extracto.

6.4.6. Proteínas.

La determinación de proteínas se realizó mediante la técnica del colorante azul de Coomasie, la cual se basa en que reacciona cuando entra en contacto con los aminoácidos básicos, en especial, con la arginina. La preparación de los tres

extractos (acuoso, etanólico y metanólico) fue la siguiente: Se midieron 500 µL de cada extracto, después se homogenizó con 5 mL de una solución de fosfatos de potasio y se agregó 25 mg de PVPP. A continuación, se centrifugó a 3000 rpm durante 15 min. De las muestras anteriores se midieron 100 µL y se le adicionó 200 µL de colorante de Bradford (Bradford, 1976) con 700 µL de agua destilada en unas celdillas para espectrofotómetro, así mismo, se leyeron las absorbancias a 620 nm en un espectrofotómetro (Thermo Electron Corporation, GENESYS 10 UV, EUA). Los resultados se reportaron mediante una curva patrón de albumina usando la ecuación:

$$y = mx + b \quad (\text{ecuación 7}).$$

6.5. Diseño Experimental.

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

6.6. Análisis Estadístico.

Todos los datos se procesaron utilizando el software estadístico NCSS (GESS07, 2006). Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) con un valor de $p < 0.05$ y una prueba *post hoc* de Tukey.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

7.1. Glucosinolatos.

En la Figura 1, se muestran los resultados del contenido de glucosinolatos empleando ultrasonido y diferentes solventes (acuoso, metanol y etanol). Los extractos no presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$) respecto al tipo de solvente.

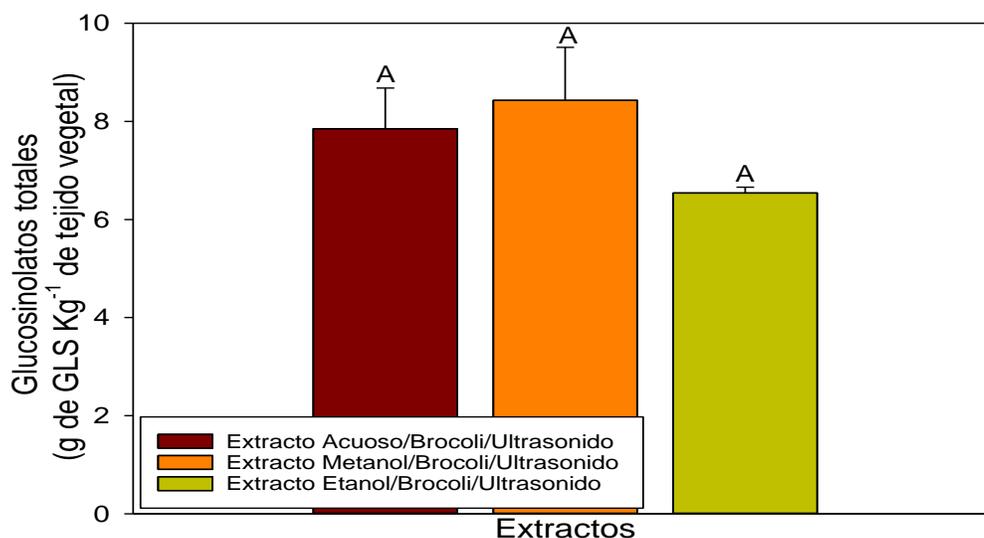


Figura 1. Contenido de glucosinolatos totales (g de GLS Kg⁻¹ de tejido vegetal) en los extractos de brócoli con diferentes solventes (agua, metanol y etanol) mediante extracción por ultrasonido.

Alvarez-Jubete *et al.* (2014) mencionan que el brócoli tiene una gran cantidad de compuestos fitoquímicos, entre los cuales destacan los glucosinolatos y sus productos de degradación como lo son los isotiocianatos. Especialmente el brócoli presenta abundancia en glucorafanina, por lo tanto, activa al sulforafano. El isotiocianato sulforafano ha aportado unos beneficios para la salud respecto al cáncer (Bueno-Solano *et al.*, 2009). Los glucosinolatos son compuestos secundarios, sin embargo, existe una variabilidad en su contenido el cual es influenciado por algunos factores que son: desarrollo del cultivo, cosecha, condiciones ambientales, manejo de postcosecha, luz, agua, disponibilidades nutrientes, genotipo del cultivo (Vallejo *et al.*, 2002; Bhandari *et al.*, 2019).

Para que los glucosinolatos puedan activarse, se deben hidrolizar por la enzima mirosinasa (Aires *et al.*, 2012). Cuando existe un rompimiento en el tejido vegetal provocado por un daño mecánico o si en la microflora del intestino se encuentra la mirosinasa, se tiene contacto con los glucosinolatos, lo que presenta la liberación de glucosa, bisulfato y aglicona (Aires *et al.*, 2012; Fahey *et al.*, 2015).

Chuanphongpanich *et al.* (2006) realizaron un experimento en cual cuantificaron los glucosinolatos presentes en las coles de Bruselas, las hojas de las coles fueron secadas para después sumergirlas en agua, metanol y etanol al 75 %, para ser calentadas a temperatura de ebullición. En la Figura 1, se muestran resultados similares a los de los autores Chuanphongpanich *et al.* (2006), siendo el extracto de brócoli con metanol el que tiene más concentración de glucosinolatos (8.5 g de GLS Kg⁻¹ de tejido vegetal) y en segundo lugar el extracto con solvente agua (7.8 g de GLS Kg⁻¹ de tejido vegetal).

El uso de ultrasonido para la inactivación enzimática es más eficiente que un método térmico, puesto que reduce la temperatura y el tiempo de procesamiento para que se pueda cumplir la desnaturalización necesaria (Marqués *et al.*, 2017). Briones *et al.* (1999) demostraron un aumento de 5 veces en recuperación de sulforafano en semillas de papaya usando metanol como solvente. Siendo el metanol un buen acarreador de compuestos secundarios. Se encontraron resultados similares a estos autores, ya que el extracto de brócoli con solvente de metanol fue el que obtuvo mayor cantidad de glucosinolatos (8.5 g de GLS Kg⁻¹ de tejido vegetal). Ponmalai *et al.* (1999) indicaron que la extracción por ultrasonido con metanol aumenta de 1-8 veces más el contenido de glucosinolatos en hojas de col y brócoli al vapor que en hojas frescas. Por lo que el uso de metanol en variedades de crucíferas es eficiente para la extracción de metabolitos secundarios. La tecnología de ultrasonido en la acción de glucosinolatos e isotiocianatos en la flor y hojas del brócoli demostró un aumento de 8 veces en la concentración de glucorafanina, siendo el ultrasonido una buena técnica de extracción (Eagle *et al.*, 2019).

7.2. Clorofila a.

En la Figura 2, se muestran los resultados del contenido de clorofila *a* empleando ultrasonido y diferentes solventes (acuoso, metanol y etanol al 70 %). El extracto con el solvente etanol fue el que presenta mayor contenido de clorofila *a* significativamente con una $p < 0.05$, seguido por el extracto metanólico y agua.

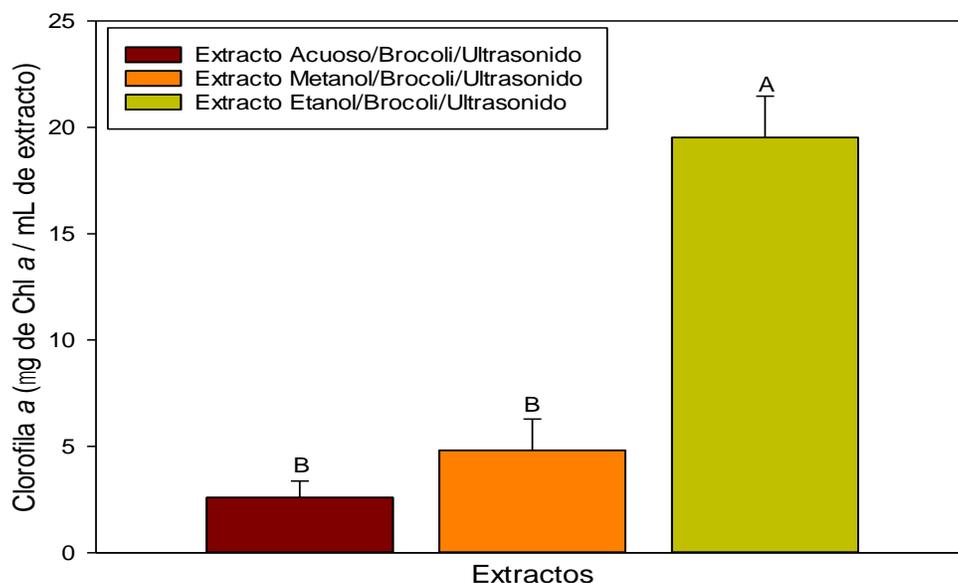


Figura 2. Contenido de clorofila *a* (μg de clorofila *a* mL^{-1} de extracto) en los extractos de brócoli con diferentes solventes (agua, metanol y etanol) mediante extracción por ultrasonido.

Mathews *et al.* (2013) mencionan que la clorofila es un pigmento de color verde presente en las plantas, algunas algas y bacterias, las cuales permiten realizar la fotosíntesis (transformación de energía luminosa a energía química). Existen varios tipos de clorofilas, la clorofila *a* es la que se presenta en todos los vegetales, la cual absorbe la luz durante el proceso de la fotosíntesis; la clorofila *b* se encuentra en los cloroplastos, por lo tanto, ésta capta la energía de la luz en otra longitud para transmitir esa energía a la clorofila *a* (Fernandez *et al.*, 2010).

Mepba *et al.* (2007) reportaron el contenido de clorofila *a* en crucíferas por maceración en solvente acuoso, los cuales fueron: brócoli (0.230 mg g^{-1} PF), col ($0.0.80 \text{ mg g}^{-1}$ PF) y col rizada (0.200 mg g^{-1} PF); siendo el brócoli la crucífera con mayor cantidad de clorofila *a*. Al ser el agua un compuesto polar y no considerado

como un compuesto orgánico por no tener carbono es su estructura, se justifica que el extracto acuoso no puede presentar un alto contenido de clorofila (Streit *et al.*, 2005). En los resultados de la Figura 2, se muestra que el extracto acuoso de brócoli mediante el uso de ultrasonido contiene $2.59 \mu\text{g}$ de Chl *a* mL^{-1} de extracto, por lo que el empleo de ultrasonido preserva más el contenido de clorofila en comparación con el método de maceración reportado por Mepba *et al.* (2007).

7.3. Clorofila *b*.

En la Figura 3, se observa los resultados de clorofila *b* en los extractos de brócoli (acuoso, metanólico y etanólico). El extracto con mayor contenido de clorofila *b* fue el extracto obtenido mediante el solvente de etanol, seguido del extracto con el solvente metanólico y acuoso. Sin embargo, no hubo diferencia significativa entre estos dos últimos tratamientos ($p > 0.05$).

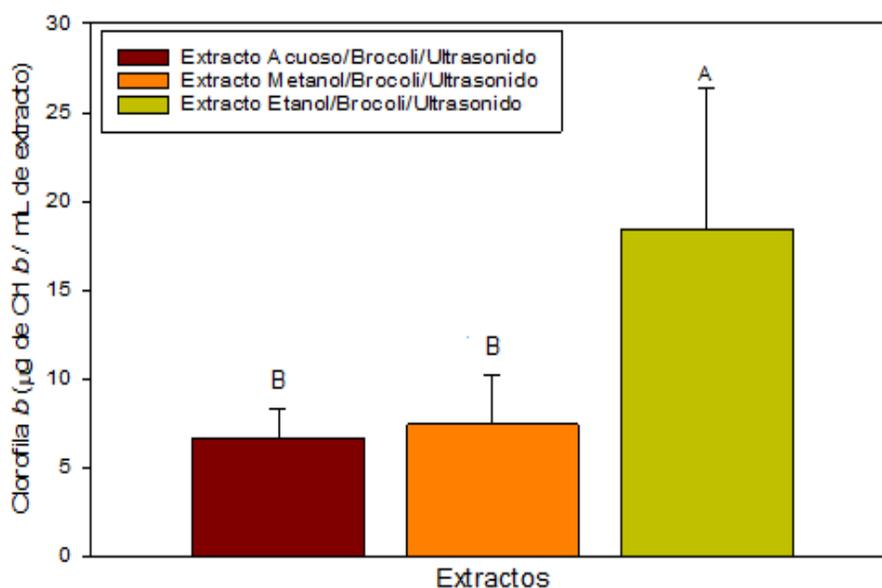


Figura 3. Contenido de clorofila *b* (μg de clorofila *b* mL^{-1} de extracto) en los extractos de brócoli con diferentes solventes (agua, metanol y etanol) mediante extracción por ultrasonido.

Las plantas y/o vegetales superiores son los que contienen dos tipos de clorofilas (clorofila *a* y *b*), la clorofila *a* presenta un color verde intenso y la clorofila *b* un color verde-amarillo, por ello, la materia vegetal de color verde (espigas,

acelgas, lechugas, col rizada, col de Bruselas, brócoli entre otros) es la que poseerá más cantidad de clorofila (Hixcos *et al.*, 1979).

Martín *et al.* (2016) comentan que la clorofila *b* proviene de la clorofila *a* por la oxidación del grupo metilo en el anillo B de un grupo formilos. Davies *et al.* (1976) concluyeron que los solventes orgánicos no tienen la misma capacidad de extraer las clorofilas *a* y *b*, ya que los que presentan mayor efectividad son los más polares, puesto que para la extracción de pigmentos en tejidos vegetales se puede emplear indistintamente el etanol y metanol. En los resultados de este trabajo, los extractos con mayor clorofila *b* fueron los obtenidos mediante el uso de metanol al 70 % (7.43 μg de Chl *b* mL^{-1} de extracto) y etanol al 70 % (18.42 μg de Chl *b* mL^{-1} de extracto).

7.4. Clorofilas Totales.

Los resultados de las clorofilas totales presentes en los extractos de brócoli muestran que el extracto con solvente a base de etanol es el que presenta mayor contenido de clorofilas totales con una significancia de $p < 0.05$, seguido por los extractos a partir de los solventes metanólico y acuoso (Figura 4).

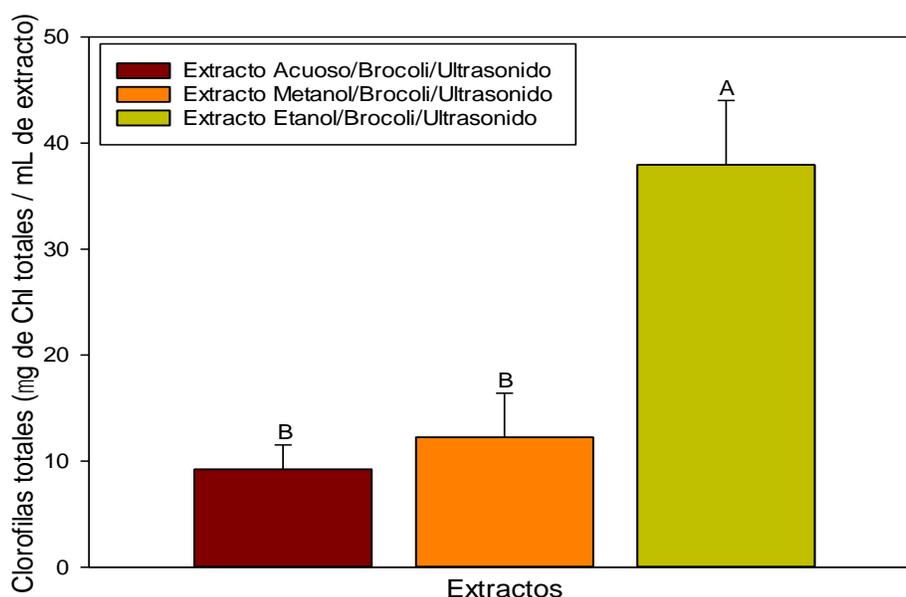


Figura 4. Contenido de clorofilas totales (μg de clorofilas mL^{-1} de extracto) en los extractos de brócoli con diferentes solventes (agua, metanol y etanol) mediante extracción por ultrasonido.

Costa *et al.* (2006), Zhan *et al.* (2012) y Ma *et al.* (2014) comentan que la senescencia de los vegetales es provocada por el corte. La senescencia del brócoli durante postcosecha presenta varios cambios bioquímicos los cuales afectan la calidad nutricional, la calidad del producto y la pérdida de color, esto es ocasionado por la degradación de las clorofilas, disminución de proteínas, vitamina C, glucosinolatos, capacidad antioxidante, entre otros. Sin embargo, los autores analizaron las clorofilas presentes en hojas de brócoli y coliflor, siendo el brócoli el que mayor cantidad obtuvo, puesto que las hojas del brócoli estaban completas y las de la coliflor estaban partidas por la mitad, demostrando que la mala cosecha es un factor que provoca la pérdida de los compuestos fisicoquímicos.

La cuantificación de las clorofilas se puede llevar a cabo por diferentes solventes (acetona, metanol y etanol) y métodos de extracción (congelamiento, calentamiento, maceración, ultrasonido y sonicación), junto con la aplicación de ecuaciones, las cuales emplean las diferentes longitudes de onda (Banderas *et al.*, 1991; Pérez *et al.*, 2002).

7.5. Vitamina C.

Los resultados del contenido de vitamina C indican que el extracto con el mayor contenido es a partir de la extracción con solvente etanol con una significancia de $p < 0.05$, el segundo extracto es con solvente metanólico y, finalmente, el que tiene menor contenido de vitamina C es el extracto con solvente acuoso (Figura 5).

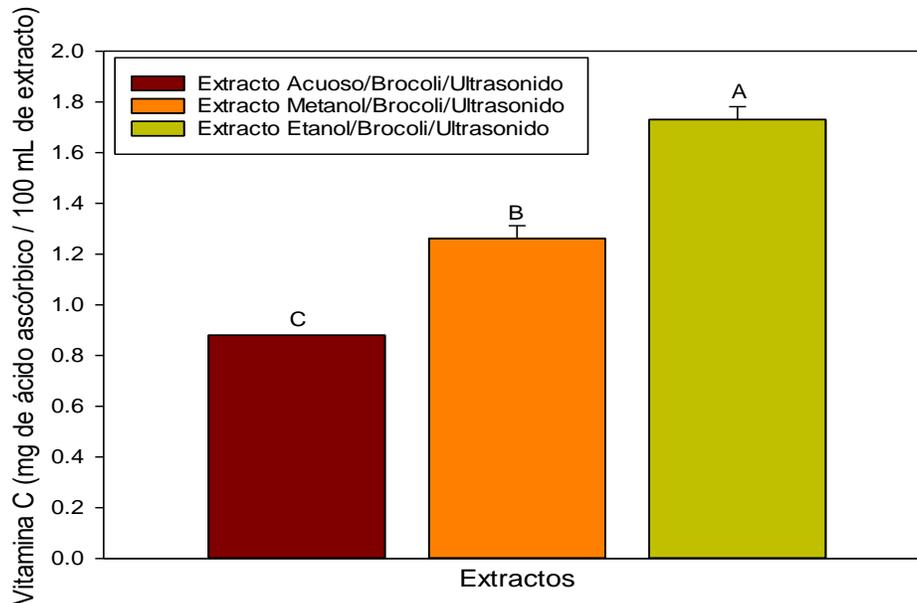


Figura 5. Contenido de vitamina C (mg de ácido ascórbico 100 mL⁻¹ de extracto) en los extractos de brócoli con diferentes solventes (agua, metanol y etanol) mediante extracción por ultrasonido.

Gamboa *et al.* (2014) evaluaron que la disminución de vitamina C en proceso de ultrasonido se debe a la creación de microcanales mediante la cavitación, los cuales facilitan el paso de constituyentes de los alimentos, en particular los nutrientes solubles y la introducción del oxígeno, ya que es considerado uno de los factores principales de la disminución de la vitamina C. Por ello, recomiendan trabajar con condiciones de ultrasonido no tan elevadas para que no exista gran pérdida de ácido ascórbico.

Gantiva *et al.* (2010) mencionan que los solventes más compatibles para la cuantificación de la vitamina C son: n-propanol, etanol, metanol, butanol, ácido acético. Otro solvente es el agua, ya que ésta puede solubilizar a la vitamina C. Por tal razón, en los resultados de la Figura 5 se muestra la diferencia del contenido de vitamina C y la compatibilidad de los solventes en los extractos de brócoli, siendo que el extracto con etanol al 70 % fue el que presentó mayor cantidad de vitamina C (1.73 mg de ácido ascórbico mL⁻¹ de extracto), seguido por el solvente con metanol (1.26 mg de ácido ascórbico mL⁻¹ de extracto) y el que presentó menor cantidad de vitamina C fue el extracto acuoso (0.88 mg de ácido ascórbico mL⁻¹ de extracto).

Kim-Ishi *et al.* (2007) observaron que la disponibilidad de la vitamina C varía por diferentes factores como lo son: intensidad de luz, temperatura de almacenamiento y exposición a diferentes contaminantes. Por lo tanto, estos factores pueden alterar su contenido en productos almacenados o en su vida de postcosecha, puesto que es un constituyente de alta vulnerabilidad al conservarse o procesarse (Davey *et al.*, 2000). Sin embargo, es necesario buscar métodos de los cuales no alteren los compuestos bioactivos de la materia, ya que el ultrasonido es una de ellas y cabe resaltar que es una tecnología limpia y con un gran potencial de aplicación en: descongelado, secado, congelado, atracción, entre otros. Siendo el ultrasonido un método que no afecta las propiedades fisicoquímicas de los productos procesados. (Robles-Ozuna *et al.*, 2012).

7.6. Compuestos Fenólicos Totales.

Los extractos con mayor concentración de compuestos fenólicos totales fueron los que se obtuvieron a partir de los solventes de metanol y etanol ($p < 0.05$) con respecto al extracto acuoso, ya que este último fue el que presentó el menor contenido de compuestos fenólicos (Figura 6).

Brand *et al.* (1995) reportaron que las muestras que son expuestas a tratamientos acuosos y con aumentos de temperatura, generan una gran pérdida de fenoles totales debido a la característica hidrosoluble de los compuestos fenólicos. Los autores determinaron que el empleo de agua como solvente no es de gran utilidad para cuantificar los compuestos fenólicos. En relación con los autores y los resultados obtenidos en este trabajo, se muestra que el solvente con menor eficacia para la obtención de compuestos fenólicos es el acuoso, cuyos resultados en extractos de brócoli es de $490.35 \mu\text{g EAG mL}^{-1}$ de extracto.

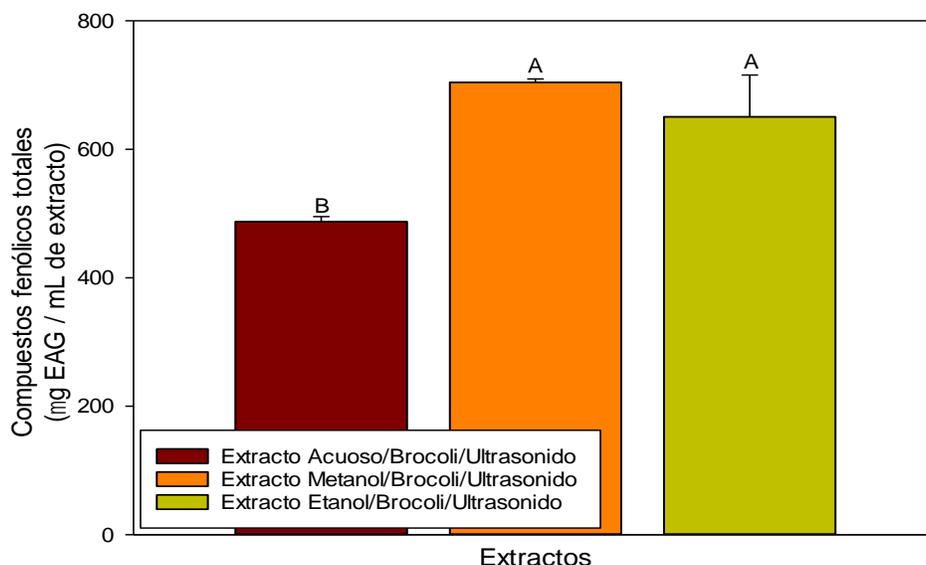


Figura 6. Contenido de compuestos fenólicos totales ($\mu\text{g EAG mL}^{-1}$ de extracto) en los extractos de brócoli con diferentes solventes (agua, metanol y etanol) mediante extracción por ultrasonido.

Cartea *et al.* (2011) evaluaron el contenido de compuestos fenólicos presentes en brócoli, el cual dependerá del tipo de método de extracción, como es el caso de algunos métodos convencionales (escaldado) y el empleo de tecnologías emergentes (ultrasonido y microondas); ya que estos últimos presentan una mayor actividad para la extracción de los fenoles totales. Por lo tanto, el empleo de ultrasonido es una buena técnica para la extracción de los compuestos fenólicos como se demuestra en los resultados anteriores, los cuales fueron sometidos a ultrasonido (20 W de potencia, 25 KHz de frecuencia, durante 20 min).

Balasudram *et al.* (2006) indican que los compuestos fenólicos extraídos presentes en extractos de vegetales tienen una excelente correlación con la actividad antioxidante y, al interactuar entre ellos, pueden ser agentes que previenen la oxidación celular. La extracción con disolventes polares, soluciones acuosas de metanol, etanol, acetona y acetato de etilo es de gran utilidad para recuperar los fenoles totales dentro de una matriz vegetal (Sultana *et al.*, 2009) y en comparación con los resultados obtenidos (Figura 6), se muestra que el extracto de esquilmos de brócoli con metanol al 70 % fue el que presentó mayor cantidad de compuestos fenólicos ($704.45 \mu\text{g EAG mL}^{-1}$ de extracto), mientras que el extracto

con etanol al 70 % fue el segundo que obtuvo buena concentración de fenoles totales ($650.53 \mu\text{g EAG mL}^{-1}$ de extracto). Por lo tanto, se puede decir que el uso de estos solventes es positivo para la medición de los compuestos fenólicos en materia vegetal.

7.7. Capacidad Antioxidante Total.

En la siguiente grafica (Figura 7) se muestran los resultados de la capacidad antioxidante. El extracto con mayor capacidad antioxidante es con el solvente de agua con una diferencia significativa de $p < 0.05$, seguido el extracto con solvente etanólico y el de menor contenido es el extracto metanólico.

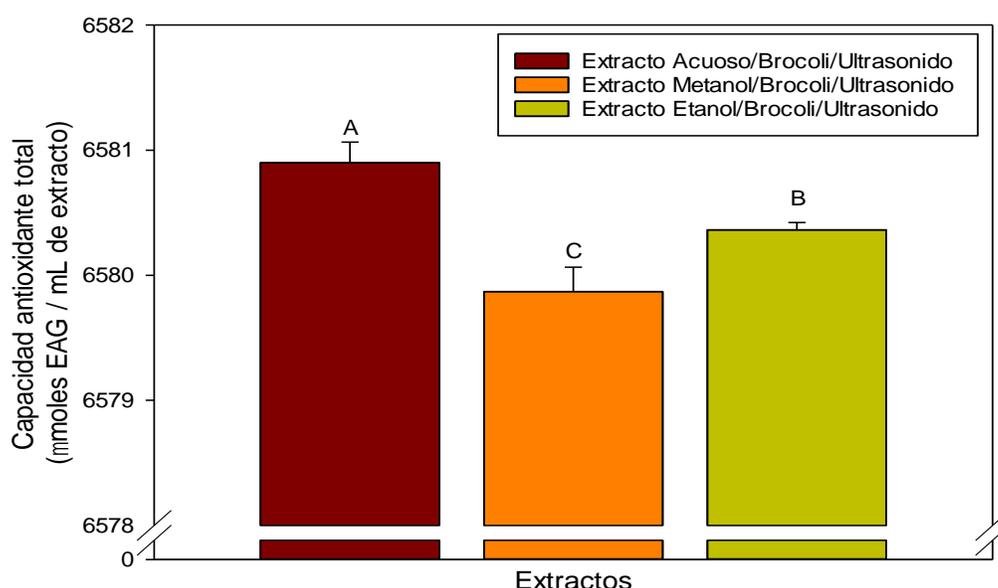


Figura 7. Capacidad antioxidante total ($\mu\text{moles EAG mL}^{-1}$ de extracto) en los extractos de brócoli con diferentes solventes (agua, metanol y etanol) mediante extracción por ultrasonido.

Oliveira *et al.* (2013) analizaron la capacidad antioxidante de un extracto de brócoli en fresco utilizando el radical libre de DPPH donde obtuvo un índice de 2.35 mg mL^{-1} de capacidad antioxidante con un solvente acuoso mientras que el extracto acuoso de brócoli asistido por ultrasonido fue el que presentó mayor cantidad de capacidad antioxidante ($6580.9 \mu\text{moles EAG mL}^{-1}$ de extracto), por tanto, se puede decir que los extractos de brócoli presentan una buena capacidad antioxidante frente al DPPH.

López *et al.* (2017) demostraron que la capacidad antioxidante de 25 μL extracto acuoso de brócoli expuesto por 10 minutos a temperatura de ebullición fue de 2.07 mg mL^{-1} y obtuvieron como resultado que el agua es un buen acarreador de capacidad antioxidante. En comparación con los resultados obtenidos de la Figura 7, el extracto acuoso de brócoli mediante ultrasonido presentó $6580.9 \mu\text{moles EAG mL}^{-1}$ de extracto, por lo tanto, el uso de agua como solvente es eficaz para la extracción de antioxidantes. Rivera *et al.* (2021) evaluaron la flor, los tallos y las hojas del brócoli empleando etanol, sin embargo, usaron la técnica de DPPH para medir la capacidad antioxidante y obtuvieron como resultado que las hojas tienen mayor capacidad de antioxidantes que la flor y el tallo.

En un trabajo reportado por Cid-Ortega *et al.* (2016) determinaron la capacidad antioxidante en extractos etanólicos (etanol al 50 %) de flor de jamaica (variedad *Roselle*). Los resultados encontrados de capacidad antioxidante fueron de 8.20 mg g^{-1} de peso seco. Los autores concluyeron que el etanol es un buen solvente para la extracción de antioxidantes.

7.8. Proteínas Totales.

En la Figura 8, se presentan los resultados de proteínas totales. El extracto con alto contenido de proteína es el extracto con solvente etanólico con una significancia de $p < 0.05$, seguido del extracto con solvente acuoso y de menor contenido es el extracto con solvente metanólico.

Kozłowska *et al.* (1977) mencionaron que las proteínas presentan baja solubilidad en mezclas de agua con alcohol ya que, si el alcohol representa más del 40 %, la solubilidad aun es más baja. Ante esto, el extracto con solvente metanol al 70 % es el que presentó menor cantidad de proteínas ($0.063 \text{ mg de proteína mL}^{-1}$ de extracto) en los extractos de brócoli.

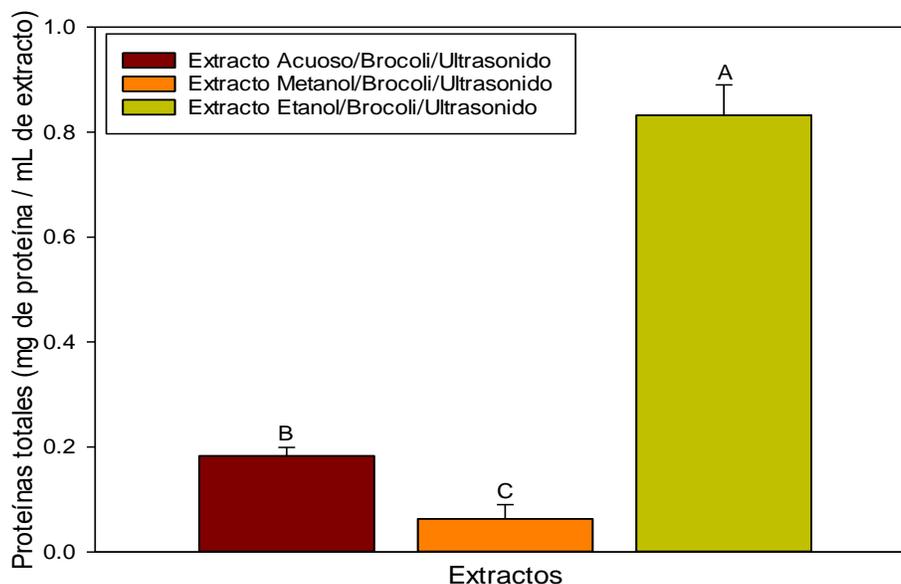


Figura 8. Contenido de proteínas totales (mg mL^{-1} de extracto) en los extractos de brócoli con diferentes solventes (agua, metanol y etanol) mediante extracción por ultrasonido.

Vega *et al.* (2017) comentaron que las proteínas que se encuentran en los vegetales son intracelulares, por lo tanto, se requieren métodos para romper las paredes celulares y así obtener una buena cantidad de las partículas de interés, los cuales pueden ser métodos mecánicos y no mecánicos. Los métodos mecánicos se basan en la fricción y las fuerzas de corte, la cual tiene la finalidad de deformar la célula hasta lograr su ruptura, los métodos mecánicos pueden ser: molinos y equipos de ultrasonido, sin embargo, los métodos no mecánicos son los que se basan en tratamientos para separar los componentes e hidrolisis de la pared celular por medio de métodos químicos o enzimáticos y son de gran utilidad para la extracción de proteínas. Como se muestra en la Figura 8, el empleo de ultrasonido es un método mecánico el cuál se empleó para la elaboración de extractos de brócoli y nos permitió evaluar el contenido de proteína mediante tres solventes (acuoso, etanólico y metanólico), siendo el extracto con metanol el de mayor contenido de proteínas.

Cujic *et al.* (2016) mencionan que la extracción de biomoléculas (carbohidratos, lípidos, vitaminas y proteínas) de material vegetal debe ser con etanol, puesto que es un solvente con alta polaridad, el cual ayuda a extraer una

gran parte de compuestos o biomoléculas del material vegetal, por lo que los resultados de la Figura 8, muestran que el extracto con mayor cantidad de proteínas es el que contiene etanol al 70 % (0.83 mg de proteína mL⁻¹ de extracto).

8. CONCLUSIÓN.

El uso de ultrasonido es de gran eficiencia, ya que, a diferencia de los métodos convencionales, este reduce los tiempos de proceso y no altera la composición bioquímica del extracto.

El solvente que tuvo mayor efectividad en la mayoría de los compuestos de interés (clorofilas *a*, *b* y totales, vitamina C y proteínas totales) fue el etanol al 70 %. En la cuantificación de la capacidad antioxidante el solvente que obtuvo mayor cantidad fue el agua y para los compuestos fenólicos totales fue el metanol. El contenido de glucosinolatos no presentó diferencia significativa respecto al tipo de solvente.

El aprovechamiento de los esquilmos vegetales es de gran importancia ya que además de disminuir la contaminación ambiental, permite obtener subproductos de alto valor agregado gracias al aporte de nutrientes e ingredientes potencialmente funcionales que tienen.

9. PERSPECTIVAS.

Evaluar los extractos a otras condiciones (potencia, frecuencia y tiempo) del equipo de ultrasonido para comparar y determinar qué condiciones son las óptimas.

Emplear nuevos procedimientos para cuantificar ciertos glucosinolatos en específico.

Aplicar técnicas o métodos diferentes para el análisis de los compuestos de interés, por ejemplo: TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity), FRAP (capacidad antioxidante para reducir el ion férrico), método yodométrico para vitamina C, ensayo de Lowry para proteínas, ensayo de Millon para los compuestos fenólicos, entre otros.

Lograr que los extractos salgan a la venta, ya que por la composición fitoquímica pueden tener aplicaciones en la agroindustria, industria alimentaria, farmacéutica, entre otras.

10. REFERENCIAS.

- Abdull Razis AF, Lori R, Loannides C. (2011). The natural chemopreventive drug, chemical R-sulforan is a much more potent inducer of carcinogen-detoxifying enzyme systems in the liver and lungs: S-isomer. *Journal of Cancer*. 128(7), 2775-2782.
- Agriculture, U. S. D. A. (2011). Cruciferous family: *Brassica oleracea* L. ssp. Italica. *Agriculture*. 2(5):14-22.
- Aires A, Carvalho R, Rosa E. (2012). Glucosinolate composition of brassica is affected by postharvest, food processing and myrosinase activity. *Food Processing and Preservation*. 36(3):214-224.
- Alvarez J, Valverde L, Kehoe J, Reilly J, Rai K. (2014). Development of a novel functional soup rich in bioactive sulforaphane using broccoli (*Brassica oleracea* L. ssp. Italica) florets and byproducts. *Food Bioprocess Technology*. 7(5):1310-1321.
- Amyrgialaki E, Makris D, Mauromoustakos A. (2014). Optimization of the extraction of pomegranate (*Punica granatum*) husk phenolics using water/ethanol solvent systems and response surface methodology. *Industrial Crops and Products*. 59:216-222.
- Aspe E, Fernandez K. (2011). Comparison of phenolic extracts obtained of *Pinus radiata* bark from pulp and paper industry and sawmill industry. *Science and Technology*. 13(3):243-253.
- Ayala-Zavala JF, González-Aguilar G, Siddiqui M. (2018). Plant food by-products: industrial relevance for food additives and nutraceuticals. California, CA: Technology and Academic Press. 8(2):363.
- Bachiega P, Salgado J, Carvalho J, Ruiz A, Schwarz K, Tezotto T, Morzelle M. (2016). Antioxidant and antiproliferative activities in different maturation stages of broccoli (*Brassica oleracea* var Italica.) biofortified with selenium. *Food Chemistry* 190:771-776.
- Bhandari S, Kwak J, Jo J, Lee J. (2019). Changes in phytochemical content and antioxidant activity during inflorescence development in broccoli. *Agriculture Research*. 79(1):36-47.

- Balasudram N, Sundram K, Samman S. (2006). Phenolic compounds in plants and agroindustrial by-products: antioxidant activity, occurrence and potential uses. *Food Chemical*. 99(3):191-203.
- Bones M, Rossiter J. (2006). The enzymic and chemically induced decomposition of glucosinolates. *Phytochemistry*. 67(4):1053-1067.
- Bouarab L, Chibane L, Degraeve P, Ferhout H, Bouajila J, Oulahal N. (2009). Plant antimicrobial polyphenols as potential natural food preservatives. *Food and Agriculture*. 99(2):1457-1474.
- Bourdieu P. (2001). Power, right and social classes. *Power and Right*. 5(1):15-32.
- Bourdieu P. (2002). Production strategies and ways of naming. *Agriculture of Mexico*. 7(2):37-38.
- Brand W, Cuvelier M, Berset C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science and Technology*. 1(28):25-30.
- Briones H, Labarca V, Plaza P, Morales M, Giovagnoli Vicuña C, Jamett F. (1999). High hydrostatic pressure and ultrasonic extractions of antioxidant compounds, sulforaphane, and fatty acids from Chilean papaya (*Vasconcellea pubescente*), seeds: effects of extraction conditions and methods. *Food Science*. 3(60):525-532.
- Bueno-Solano C, Martínez D, Camacho-Gil F, Villa-Lerma A, Rodríguez J, López-Cervantes J, SánchezMachado D. (2009). Sulforaphane (1-isothiocyanato-4-(methylsulphfinyl)-butane) content in cruciferous vegetables. *Latin American Nutrition Archives*. 59(1):45-63.
- Campas-Baypoli PB, Sánchez-Machado DI, Bueno-Solano C, Núñez-Gastélum JA, Reyes-Moreno C, López-Cervantes J. (2009). Biochemical composition and physicochemical properties of broccoli flours. *Food Science Nutricional*. 2(60):163-173.
- Capriotti AL, Cavalieri C, Crescenzi C, Foglia P, Nescatelli R, Samperi R, Lagana A. (2014). Comparison of extractions methods for the identification and quantification of polyphenols in virgin olive oil by ultrasonic HPLC-QtoF mass spectrometry. *Wood Chemistry*. 158(10):392-400.

- Cartea M, Francisco M, Soengas P, Velasco P. (2011). Phenolic compounds in Brassica vegetables. *Molecules*. 16(2):251-280.
- Chuanphongpanich S, Phanichphant S, Bhuddasukh D, Suttajit M, Sirithunyalug B. (2006). Bioactive glucosinolates and antioxidant properties of broccoli seeds cultivated in Tailand. *Science and Technology*. 28(1):55-61.
- Cid-Ortega S, Guerrero-Beltran J. (2016). Antioxidant and physicochemical properties of *Hibiscus sabdarriifa* extracts from two particle sizes. *Food Research*. 5(2):34-40.
- Cory H, Passarelli S, Szeto J, Tamez M, Mattei J. (2018). The role of polyphenols in human health and food systems. *Frontiers in Nutrition*. 5(3):87.
- Costa ML, Vicente AR, Civello PM, Chaves AR, Martínez GA. (2006). UV-C treatment delays postharvest senescence in broccoli florets. *Postharvest Biology and Technology*. 3(39):204-210.
- Cujic N, Šavikin K, Jankovic T, Pljevljakušić D, Zdunic G, Ibric S. (2016). Optimization of polyphenols extraction from dried chokeberry using maceration as traditional technique. *Food Chemical*. 194(3):135-142.
- Davey-Ozuna LE, Ochoa-Martínez LA. (2000). Ultrasound and its applications in food processing. *Ibero-American Magazine of Postharvest Technology*. 13(2):109-122.
- Davies BH. (1976). Carotenoids and chlorophyll. *Chemistry and biochemistry of plant pigments*. 30(59):38-165.
- Demirdoven T, Baysal A. (2009). The use of ultrasound and combined technologies in food preservation. *Food Reviews International*. 25(5):1-11.
- Domínguez-Perles R, Martínez-Ballesta MC, Carvajal M, García-Viguera C, Moreno D. (2010). Broccoli-derived by-products - a promising source of bioactive ingredients. *Food Science*. 75(4):C383-C392.
- Eagle-Dormitorio M, Welty-Chanes J, Jacobo-Velázquez P. (2019). Combined effect of ultrasound treatment and exogenous phytohormones on the accumulation of bioactive compounds in broccoli florets. *Ultrasound. Industry and Technologies*. 50(3):289–305.

- Fahey JW, Holtzclaw WD, Wehage SL, Wade KL, Stephenson K, Talalay P. (2015). Sulforaphane bioavailability from glucoraphanin-rich broccoli: control by active endogenous myrosinase. *Food Science*. 4(12):53-60.
- FAOSTAT (2021). Food and agriculture organization of the United Nations: Broccoli production. *Agriculture*. 3(1):12-18.
- Fernández T. (2010). Properties and benefits of chlorophyll. *Vegetable Chlorophylls*. 5(1):20-25.
- Fink M, Feller C, Scharpf H, Weier U, Maync A, Ziegler J, Paschold P, Strohmeyer K. (1999). Nitrogen, phosphorus, potassium and magnesium content of field vegetables: recent data for fertilizer recommendations and nutrient balance. *Plants Nutrition Soil Science*. 162(10):71-73.
- Fonseca A. (2013). Broccoli cultivation and cost analysis. *Bissines and Administration*. 8(3):5-18.
- Fu X, Belwal T, Cravotto G, Luo Z. (2020). Sono-physical and sono-chemical effects of ultrasound: primary applications in extraction and freezing operations and influence on food components. *Ultrasonics Sonochemistry*. 60(5):104726.
- Gamboa J, Montilla A, Cortijo A, Carcel García J, Villamiel M. (2014). Impact of power ultrasound on chemical and physicochemical quality indicators of strawberries dried by convection. *Food Chemistry*, 161(3):40-46.
- Gantiva M, Martínez F. (2010). Hildebrand's extended method for the prediction of ketoprofen solubility in ethanol plus water cosolvent mixtures. *Science Chemistry*. 33(3):370-376.
- Gironi F, Piemonte V. (2011). Temperature and solvent effects on polyphenol extraction process from chestnut tree wood. *Chemical Engineering Research and Design*. 89(5):857-862.
- Gutierrez-Robles ME, Franco-Ramirez AC, Ceron-Garcia A, Abraham-Juarez MR, Ozuna C. (2017). Extraction of bioactive compounds of broccoli from vegetable waste from the agri-food sector. *Food Chemistry*. 2(1):1334-1339.
- Halkier BA, Gershenzon J. Biology and biochemistry of glucosinolates. *Biological Plantas*. 57(4):303-333.

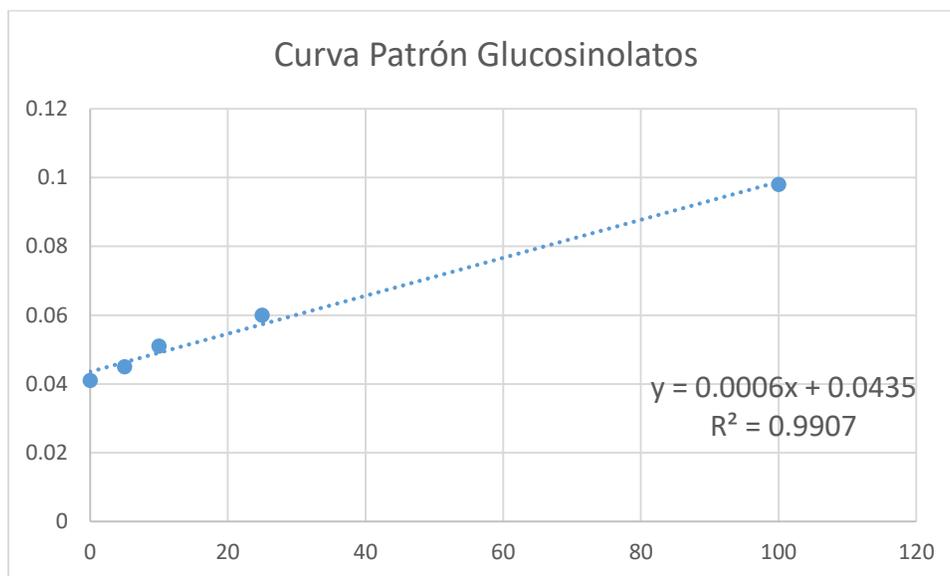
- Hiscox J, Israelstam G. (1979). A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. *Canadian Journal of Botany* 57(8):1332-1334.
- Hoffman D. (1997). Family guide to medicinal plants. Practical phytotherapy for an integral well-being. *Botany* 2(3):256.
- Hopkins R, Dam N, Loon J. (2009). Role of glucosinolates in insect-plant relationships and multitrophic interactions. *Entomology*. 54(3):57-83.
- Hussam J, Ahmad-Qasem M, Cánovas J, Barraji3n-Catal3n V, Micol J, C3rcel E, Garc3a-P3rez J. (2013). Kinetic and compositional study of phenolic extraction from olive leaves by using power ultrasound; *innov. Food Science*. 17(2):120-129.
- InfoAgro (2021). Aspects of broccoli cultivation. *Agriculture*. 1:5-9.
- Jeffery EH, Araya M. (2009). Physiological effects of broccoli consumption. *Phytochemistry Reviews*. 8(1):283-298.
- Jeffery E, Araya M. (2003). Physiological effects of broccoli consumption. *Phytochemistry*. 8(1):283-298.
- Joshi S, Bharucha C, Desai A. (2008). Production of biosurfactant and antifungal compound by fermented food isolate *Bacillus subtilis* 20B. *Bioresource Technology*. 99(10):4603-4608.
- Kim S, Ishi G. (2007). Effect of storage temperature and duration on glucosinolate, total vitamin C and nitrate contents in rocket salad (*Eruca sativa* Mill). *Food Science and Agriculture*. 87(7):966-973.
- Kozłowska H, Rutkowski A, Borowski J, Elkowicz K. (1977). Effects of leaching and extraction conditions on activity of trypsin inhibitor in protein concentrates and isolates obtained from soybean. *Food Chemistry*. 3(10):427-432.
- L3pez A. (2017). Effect of different cooking methods on the content of phenolic compounds and antioxidant activity in broccoli (*Brassica oleracea* var. italica) and cauliflower (*Brassica oleracea* var. botrytis). *Food Science and Agriculture*. 3(9):12-24.
- Lou S, Hsu Y, Ho C. (2014). Flavonoid compositions and antioxidant activity of calamondin extracts prepared using different solvents. *Food and Drug Analysis*. 22(3):290-295.

- Ma G, Zhang L, Setiawan CK, Yamawaki K, Asai T, Nishikawa F, Maezawa S, Sato H, Kanemitsu N, Kato M. (2014). Effect of red and blue LED light irradiation on ascorbate content and expression of genes related to ascorbate metabolism in postharvest broccoli. *Food Bioprocess Technology*. 94(15):97-103.
- Marqués P, Silva F, Sulaiman A. (2017). Advances in thermosonication for the inactivation of endogenous enzymes in food. *It's ultrasound: advances in food processing and preservation*. *Food Chemistry*. 40(12):101–130.
- Martín J, Castañeda J. (2016). Analysis of *Spinacia oleracea* chlorophyll and quantification of spaghetti albumin using spectrophotometry. *Food Chemistry*. 22(2):99-109.
- Mason T, Paniwnyk J, Lorime J. (1996). The uses of ultrasound in off technology. *ultrasonics sonochemistry*. *Food Chemistry*. 3(3):253-260.
- Mathews K, Van E, Holde K, Appling D, Spencer J. (2013). Biochemistry. *Food Chemistry*. 20(8):678-679.
- Mepba H, Eboh L, Banigo D. (2007). Effects of processing treatments on the nutritive composition and consumer acceptance of some Nigerian edible leafy vegetables. *Food Agriculture Nutrition and Development*. 7(1):1-18.
- Moreno D, Carvajal M, López-Berenguer C, García-Viguera C. (2006). Chemical and biological characterization of broccoli nutraceutical compounds. *Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 41(5): 1508-1522.
- Moreno DA, López-Berenguer C, Martínez-Ballesta MC, Carvajal M, García-Viguera C. (2008). Bases for the new challenges of the development of broccoli cultivation in hydroponics. *Science Food Agriculture*. 88(7):1472-1481.
- Oliveira G, Troncoso L, Guija E, Núñez M, Flores J. (2013). Effect of heat treatment on the total antioxidant capacity and polyphenol content of broccoli, pepper and tomato. *Journal of Investigation UNMSM*. 1(2):73-89.
- Perez G, Queimaliños C, Modenitti B. (2002). Plankton chlorophyll maxima in north Patagonian andean lakes. *J Plankton Research*. 24(6):591-599.
- Petkowicz C, Williams PA. (2020). Pectins from food waste: characterization and functional properties of a pectin extracted from broccoli stalk. *Food Hydrocol*. 107(10):105-142.

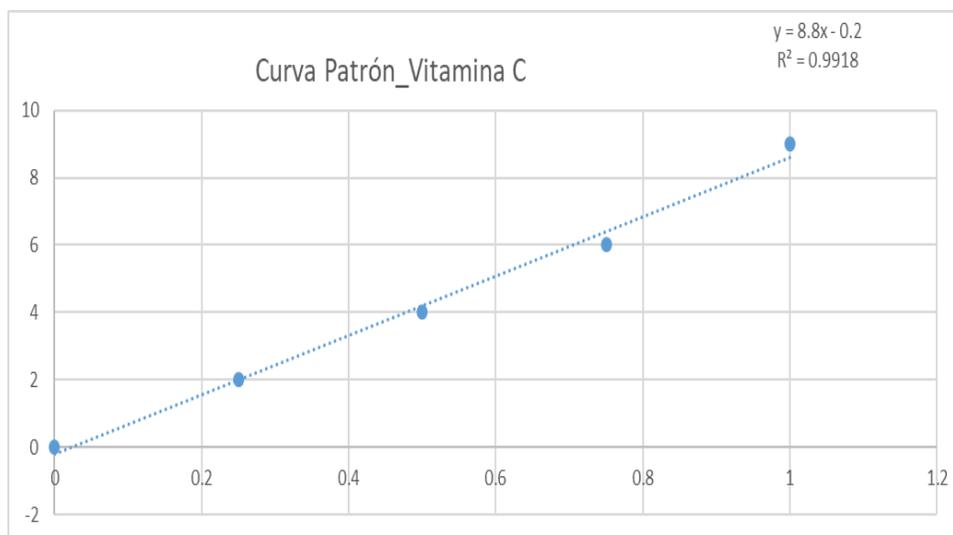
- Piccolella S, Crescente G, Candela L, Pacifico S. (2019). Nutraceutical polyphenols: new challenges and analytical opportunities. *Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 19(175):112-130.
- Ponmalai P, Devahastin S, Chiewchan N, Soponronnarit S. (1999). Improvement of cabbage glucoraphanin recovery by controllin Improvement of cabbage glucoraphanin recovery by controlling sulforaphane content and myrosinase activity during extraction by different methods: purification g sulforaphane content and myrosinase activity during extraction by different methods: purification. *Science of Food and Agriculture*.10(174):338-344.
- Premier R. (2002). Phytochemical composition: a paradigm shift for considerations. *Clinical of Nutritition*. 11(2):197-201.
- Rivera A, Reynold-Marzal D, Martin A, Velazquez R. (2021). Combined foliar, zinc and nitrogen application in broccoli (*Brassica oleracea* var italica L.). Effects on growth, nutrient, bioaccumulation, and bioactive compounds. *Agriculture*. 9(2):545-551.
- Robles-Ozuna LE, Ochoa-Martinez LA. (2012) Ultrasound and its applications in food processing. *Technology and Postharvest*. 13(2):109-122.
- Rodríguez-Bernaldo A, Lage-Yusty MA, López-Hernández J. (2010). Determination of phenolic compounds in macroalgae for human consumption. *Food Chemistry*. 121(59): 634-638.
- Sagar N, Pareek S, Sharma S, Yahia E, Lobo M. (2018). Fruit and vegetables waste: bioactive compounds, their extraction. *Science of Food and Agriculture*. 17(3): 512-531.
- SAGARPA (2017). Manual de Agricultura. Brócoli, un súper alimento cultivado por los Poblanos.
- Setyaningsih W, Saputro M, Palma C, Barroso G. (2015). Optimization and validation of the microwave-assisted extraction of phenolic compounds from rice grains. *Food Chemistry*. (7)15:141-149.
- Serino A, Salazar G. (2019). Protective role of polyphenols against vascular inflammation, aging and cardiovascular disease. *Food Chemistry*. 11(2):1-23.
- SIAP (2018). Análisis estadístico de production agricola. 5(1):5-12.

- Sosa R. (1997). The medicinal power of plants. *Technology and Agriculture*. 5(3):24.
- Streit N, Canterle L, Weber M, Hychrecki L. (2005). Chlorophylls. *Technology and Science*. 8(5):748-755.
- Sultana B, Anwar F, Ashraf M. (2009). Effect of extraction solvent/technique on the antioxidant activity of selected medicinal plant extracts. *Journal the Molecules*. 14(15):2167-2180.
- Toledo H. (2003). Broccoli cultivation. *Food and Agriculture*. 3(9):20-25.
- Vallejo F, Tomás-Barberán F, García-Viguera C. (2002). Potential bioactive compounds in health promotion from broccoli cultivars grown in Spain. *Science of Agriculture*. 82(5):1293-1298.
- Vega K. (2017). Extraction of bromelain obtained from pineapple processing residues: proteins. *Food Chemistry*. 10(5):230-245.
- Wathelet J, Lori R, Leoni O, Rollin P, Quinsac A, Palmieri S. (2004). Guidelines for glucosinolate analysis in green tissues used for biofumigation. *Agroindustry*. 3(1): 257-266.
- West L, Meyer K, Balch B, Rossi F, Schultz M, Haas G. (2004). Glucoraphanin and 4-hydroxyglucobrassicin content in seeds of 59 cultivars of broccoli, raab, kohlrabi, radish, cauliflower, brussels sprouts, kale, and cabbage. *Agricultural Food Chemistry*. 52(5):916-926.
- Xavier L, Freire M, Vidal-Tato I, Gonzalez-Alvarez J. (2015). Application of aqueous two phases systems based on polyethylene glycol and sodium citrate for the recovery of phenolic from eucalyptus wood. *Maderas, Science and Technology* 17(2):345-354.
- Xia H, Houghton J, Clark J, Matharu A. (2016). Potential utilization of unavoidable food supply chain wastes—valorization of pea vine wastes. *Engineering and Sustainable Chemistry*. 4(1):60-90.
- Zhan L, Hu J, Li Y, Pang L. (2012). Combination of light exposure and low temperature in preserving quality and extending shelf-life of fresh-cut broccoli (*Brassica oleracea* L.). *Postharvest Biology and Technology*. 72(9):76-81.

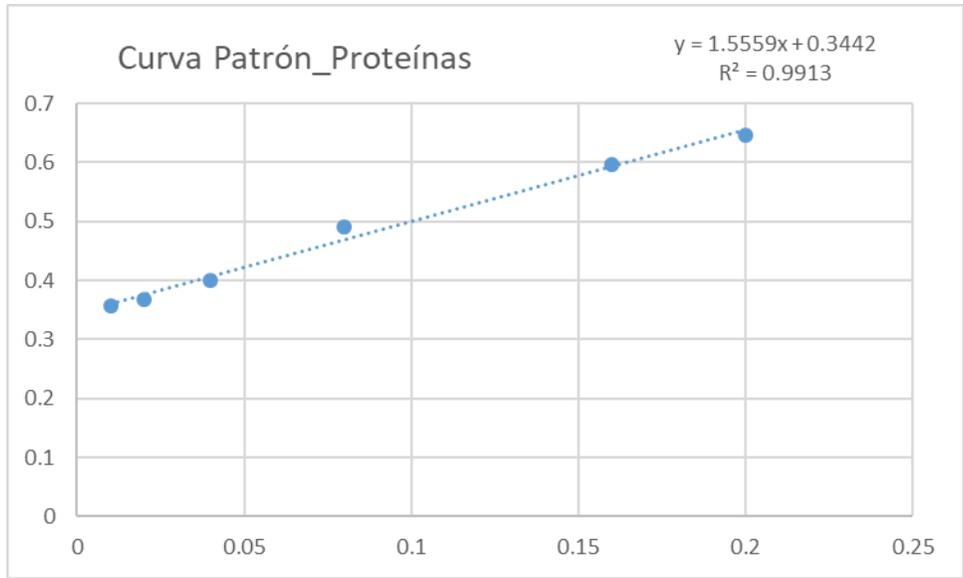
11. ANEXOS.



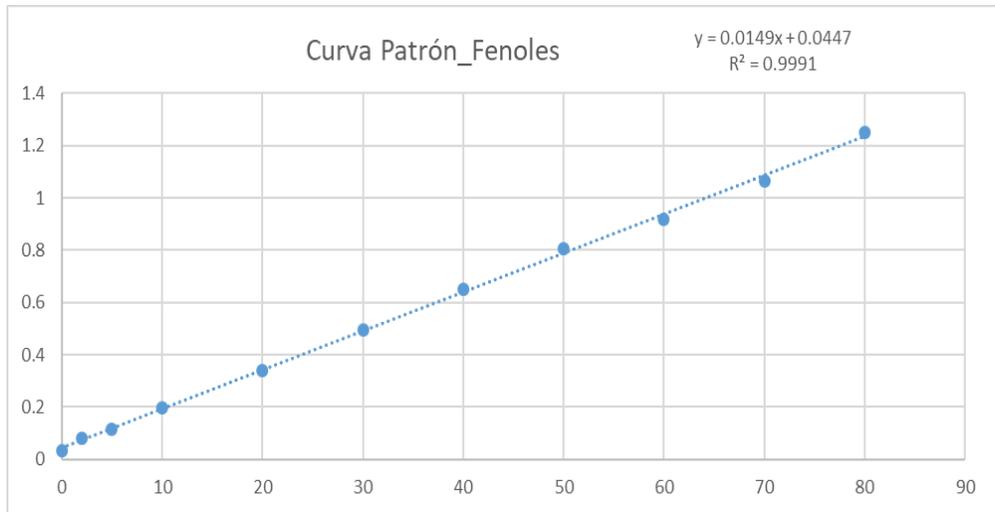
Anexo 01. Curva Patrón de Glucosinolatos



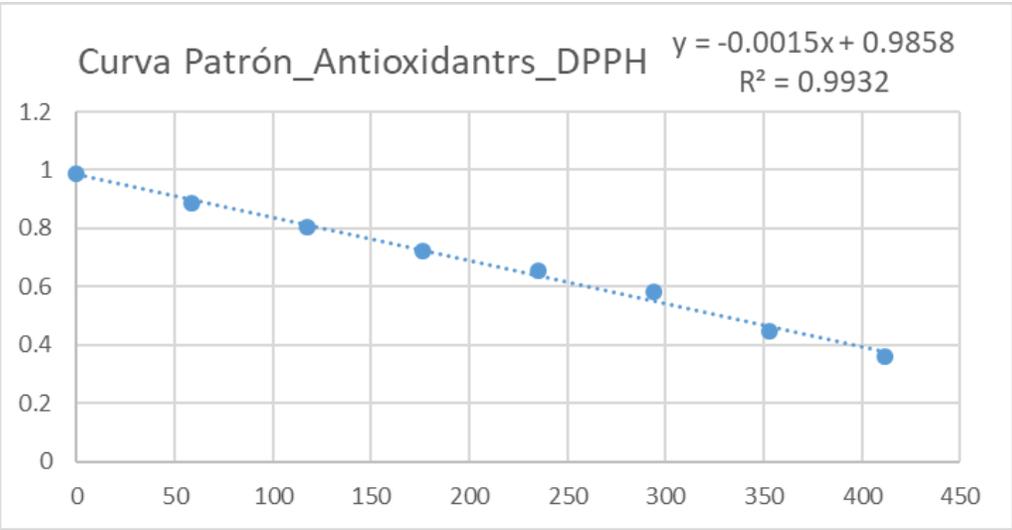
Anexo 02. Curva Patrón de Vitamina C



Anexo 03. Curva Patrón de Proteínas Totales



Anexo 04. Curva Patrón de Fenoles Totales



Anexo 05. Curva Patrón de Capacidad Antioxidante