

**Desarrollo de una metodología para la obtención de ingredientes
funcionales a partir de excedentes de cosecha del brócoli**

**Trabajo de grado para optar al título de Magister en Innovación Alimentaria
y Nutrición**

Héctor Miller Puerta Martínez

Asesor

Julián Alberto Londoño Londoño

Doctor en Ciencias Químicas

Corporación Universitaria Lasallista

Facultad de Ingeniería

Ingeniería de Alimentos

Caldas – Antioquia

2018

Agradecimientos

A Dios y la Virgen María.

Por darme la oportunidad de vivir y por ser quienes me guían y acompañan en todo momento, por brindarme la tranquilidad que necesito para ser feliz.

A mi Familia.

A mi madre Ángela María Martínez Camacho, por ser una mujer noble y modelo a seguir, luchadora, emprendedora, respetuosa y amorosa, la mujer que día a día da lo mejor de sí por cada uno de sus hijos. Mis hermanos por ser el motor de mis luchas, mis compañeros más fieles de batalla, los que siempre están de manera incondicional y mi padre Héctor Eliecer Puerta Z, por ser un hombre de sabios consejos y noble corazón.

Al “Combo VIP”

Carolina, Jeanine, Gloria, Tatiana por compartir algo más que una clase, ser amigas y brindar un apoyo incondicional durante todo este proceso. Al Vicerrector Luis Fernando por su apoyo y buena disposición para este grupo de estudiantes.

A mi equipo de trabajo

Especialmente a Andrea Gil, Lizeth Giraldo Muñoz, Carlos Andrés Ramírez, Ana María Muñoz, Sandra Llano, Carolina Bedoya Vergara, María Victoria Álvarez y Sonia Medina. Ya que cada uno contribuyó de forma directa para el desarrollo de esta investigación y su colaboración fue vital para llegar a feliz término. También, quiero agradecer a Julián Londoño Londoño y Claudio Jiménez Cartagena por la confianza depositada en mí para realizar esta investigación, su confianza ahora me brinda la oportunidad de subir un escalón más en mi formación profesional. Finalmente, al Sistema General de Regalías, la Gobernación de Antioquia y la Corporación Universitaria Lasallista por permitir el libre desarrollo de la investigación.

Contenido

Agradecimientos	2
Contenido.....	3
Lista de tablas	5
Lista de ecuaciones.....	7
Lista de figuras	8
Abreviaturas	10
Resumen.....	11
Introducción.....	12
Justificación.....	13
Objetivos	16
Objetivo general:.....	16
Objetivos específicos:	16
Marco conceptual.....	17
Brócoli.....	17
Glucosinolatos	20
Compuestos fenólicos.....	30
Extracción asistida por Ultrasonido.....	32
Secado por aspersión.....	38
Agentes encapsulantes.....	42
Metodología	45
Reactivos:	45
Identificación de zonas de producción de excedentes y recolección de la materia prima:.....	45
Lavado y desinfección del material vegetal:.....	45
Proceso de secado	46
Caracterización microbiológica	47
Caracterización bromatológica.....	47
Porcentaje de humedad.....	48
Determinación de la capacidad antioxidante (ORAC).....	48

Contenido total de compuestos fenólicos:	49
Contenido de glucorafanina:	50
Cromatografía líquida de alta resolución (UPLC).....	51
Selección del solvente de extracción:	51
Proceso de extracción:	52
Microencapsulación de los extractos:	54
Caracterización	57
Rendimiento del proceso de secado.....	57
Eficiencia de encapsulación.....	57
Actividad acuosa (aw).....	58
Humedad	58
Tamaño de partícula	59
Potencial z	59
Solubilidad.	59
Humectabilidad.	60
Contenido de compuestos bioactivos en el tiempo.....	60
Resultados	62
Caracterización microbiológica	62
Caracterización bromatológica.....	67
Selección del solvente	68
Condiciones de extracción con ultrasonido	71
Obtención de un extracto con alta capacidad antioxidante ORAC.....	72
Obtención de un extracto rico en compuestos fenólicos.....	79
Obtención de un extracto rico en glucorafanina.....	82
Secado de los extractos:.....	87
Caracterización.	90
Solubilidad y humectabilidad.....	95
Estabilidad en el tiempo de cada una de las formulaciones.	96
Conclusiones.....	99
Perspectivas.....	101
Referencias	102

Lista de tablas

Tabla 1. Glucosinolatos presentes en el brócoli (<i>Brassica oleracea var. Itálica</i>).....	22
Tabla 2. Clasificación de los glucosinolatos más representativos en brócoli según su estructura y sus productos de hidrolisis.....	23
Tabla 3. Principales glucosinolatos presentes en el brócoli.....	26
Tabla 4. Aplicaciones del ultrasonido para el procesamiento de alimentos.....	36
Tabla 5. Solución desinfectante, tomada de la ficha técnica del desinfectante.....	46
Tabla 6. Métodos empleados para la caracterización microbiológica del brócoli.....	47
Tabla 7. Métodos AOAC empleados para la caracterización bromatológica del brócoli...	48
Tabla 8. Proporciones de etanol – agua empleados para la extracción de Glucorafanina brindadas por el software Desing – Expert Version 6.0.1.....	52
Tabla 9. Plan experimental para la optimización del proceso de extracción mediante un tanque sonicador.....	53
Tabla 10. Diseño de mezclas para la selección de una emulsión óptima.....	55
Tabla 11. Resultado de análisis bromatológicos.....	62
Tabla 12. Concentración de Glucorafanina, empleando agua a diferentes pH para la extracción a partir de hojas de brócoli.....	64

Tabla 13. Análisis de varianza (ANOVA) para la concentración de GRA en extractos obtenidos empleando agua des ionizada a pH 3, 7 y 9 a partir de hojas de brócoli.....	65
Tabla 14. Concentración de Glucorafanina, empleando agua a diferentes pH para la extracción a partir de hojas de brócoli.....	67
Tabla 15. Análisis de varianza para la concentración de glucorafanina obtenida a partir de hojas de brócoli y empleando diferentes proporciones de etanol y agua como solvente.....	68
Tabla 16. Plan experimental y resultados para las extracciones con ultrasonido.....	69
Tabla 17. Análisis de varianza para el efecto de cada una de las variables de extracción sobre la capacidad antioxidante ORAC de un extracto por medio de ultrasonido.....	70
Tabla 18. Análisis de varianza para la variabilidad en la concentración de polifenoles totales.....	71
Tabla 19. Análisis de varianza para la variabilidad en la concentración de GRA.....	74
Tabla 20. Resultados experimentales diseño de mezclas para la selección de una emulsión óptima.....	77
Tabla 21. Análisis de varianza para la variable viscosidad.....	79
Tabla 22. Proporciones optimas de gelatina, goma arábica y maltodextrina.....	83
Tabla 23. Formulación de la emulsión empleada para la obtención de prototipos intermediarios enriquecidos aplicables a matrices alimentarias.....	87
Tabla 24. Tamaño de partícula y potencial Z para cada una de las formulaciones.....	88

Tabla 25. Humectabilidad (g/seg) para cada una de las formulaciones F1: extracto ORAC, F2: extracto compuestos fenolicos, F3: extracto GRA.....	89
Tabla 26. Formulación de la emulsión empleada para la obtención de prototipos intermediarios enriquecidos aplicables a matrices alimentarias.....	89
Tabla 27 Tamaño de partícula y potencial Z para cada una de las formulaciones.....	94
Tabla 28 Humectabilidad (g/seg) para cada una de las formulaciones F1: extracto ORAC, F2: extracto compuestos fenolicos, F3: extracto GRA.....	95

Lista de ecuaciones.

Ecuación 1. Rendimiento del proceso de secado por aspersion.....	57
Ecuación 2. Porcentaje de solubilidad.....	60
Ecuación 3. Ecuación de regresión que se ha ajustado a los datos para la optimización de las condiciones de obtención de un extracto con un valor alto para ORAC a partir de hojas de brócoli.....	73
Ecuación 4. Ecuación de regresión ajustada a los datos para concentración de polifenoles totales presente en extractos a partir de residuos de cosecha de brócoli.....	82
Ecuación 5. Ecuación de regresión ajustada a los datos para la optimización de las condiciones de obtención de un extracto rico en GRA a partir de excedentes de cosecha del brócoli.....	83

Lista de figuras

Figura 1. Número de publicaciones obtenidas mediante la base de datos SciFinder que contienen el termino glucosinolatos.....	18
Figura 2. Número de publicaciones obtenidas mediante la base de datos SciFinder que contienen el termino glucosinolatos de brócoli.....	19
Figura 3. Hidrolisis de glucosinolatos por la enzima mirosinasa y sus diferentes productos de hidrolisis.....	21
Figura 4. Estructura quimica de glucosinolatos presentes en el brócoli.....	25
Figura 5. Contenido de compuestos fenolicos presentes en brotes de brócoli.....	31
Figura 6. Estructura quimica de la quercetina y el kaempferol.....	32
Figura 7. Mecanismo del fenómeno de cavitación de burbujas.....	34
Figura 8. Diagrama esquemático de un proceso de encapsulación mediante secado por aspersión e imagen de un Mini Spray Dryer B-290 (BÜCHI).....	40
Figura 9. Morfología de diferentes tipos de micro capsulas.....	41
Figura 10. Resultados presencia de coliformes totales y fecales en muestras de brócoli fresco sin desinfectar.....	63
Figura 11. Resultados caldo LMX para hojas e inflorescencias de brócoli desinfectado..	64
Figura 12. Resultados de Chromocult para hojas e inflorescencias de brócoli desinfectado.....	65

Figura 13. Resultados para plate count en inflorescencias y hojas de brócoli desinfectado.....	66
Figura 14. Gráfica de superficie de respuesta para el diseño aplicado a la obtención de un extracto con alta capacidad antioxidante ORAC a partir de hojas de brócoli.....	78
Figura 15. Gráfica de superficie de respuesta para el diseño aplicado a la obtención de un extracto con alto contenido de polifenoles a partir de hojas de brócoli.....	81
Figura 16. Gráfica de superficie de respuesta para el diseño aplicado a la obtención de un extracto rico en GRA a partir de hojas de brócoli.....	85
Figura 17. cromatogramas obtenidos por UPLC para (a) (b) estándar de GRA y (c) (d) muestras obtenidas a partir de diferentes condiciones de sonicación programadas por el plan experimental relacionado en el apartado proceso de extracción.....	86
Figura 18. (a) Porcentajes de rendimiento y eficiencia de encapsulación en el proceso de microencapsulación para cada una de las formulaciones (b) Porcentaje de humedad para cada una de las formulaciones (c) actividad acuosa (a_w) para cada una de las formulaciones.....	91
Figura 19. Porcentaje de solubilidad de cada una de las formulaciones F1: extracto ORAC, F2: extracto compuestos fenolicos, F3: extracto GRA.....	95
Figura 20. Estabilidad en el tiempo para cada una de las formulaciones y control (extracto sin encapsular) (a) Formulación 1 (Extracto ORAC), (b) Formulación 2 (Extracto compuestos fenolicos), (c) Formulación 3 (Extracto GRA).....	97

Abreviaturas

GLS: Glucosinolatos

GRA: Glucorafanina

GomA: Goma arábica

Maldx: maltodextrina

Gel: Gelatina

BBD: diseño experimental Box – Behnken

MeOH: Metanol

NMP: Número más probable

RAM: Recuento de aerobios mesófilos en alimentos

Resumen

El brócoli *Brassica olearacea L. var itálica*, es un alimento rico en vitaminas C, K, y A, fibras solubles y múltiples nutrientes que lo convierten en un alimento de gran interés para la industria de alimentos como lo son compuestos fenólicos y los glucosinolatos; la glucorafanina es el glucosinolato de mayor concentración en el brócoli, este constituye más del 80% de los glucosinolatos presentes en el vegetal; cuando este se hidroliza por la acción de la enzima mirosinasa da paso a la formación de sulforafano un isotiocianato altamente valorado debido a su potencial como anticancerígeno.

Por lo anterior, el presente trabajo de investigación tuvo como objetivo el desarrollo de una metodología para la obtención de ingredientes funcionales a partir de excedentes de cosecha del brócoli, para ello se llevó a cabo una selección en campo de hojas de brócoli desde las cuales y mediante el uso del ultrasonido se obtuvieron tres extractos diferentes que posteriormente fueron encapsulados usando maltodextrina, goma arábica y gelatina como agentes encapsulantes para el proceso de secado por aspersión, finalmente se determinó la eficiencia de encapsulación para cada uno de los compuestos de interés y se caracterizaron cada uno de los polvos obtenidos en cuanto aw, humedad, humectabilidad y solubilidad en agua.

Palabras clave: Brócoli. Extracción, glucosinolatos, glucorafanina, compuestos fenólicos, ultrasonido, encapsulación.

Introducción

Las crucíferas, son un importante grupo de las especies hortícolas, tanto por el área sembrada como por el valor de su producción. Jaramillo y colaboradores resaltan brócoli, coliflor, repollo, col china y col de Bruselas como las crucíferas de mayor importancia en el mundo (Jaramillo & Díaz, 2006^a, 9).

El brócoli *Brassica oleracea L. var. Italica* es un producto de gran interés en la industria alimentaria debido a su riqueza en sustancias bioactivas tales como compuestos fenólicos, glucosinolatos, ácido ascórbico y flavonoides (Lv et al., 2017, 2), sin embargo, posterior a diversos procesos poscosecha como la congelación, la cantidad de estos compuestos tiende a disminuir como es el caso de los glucosinolatos y la vitamina C (Cai et al., 2016, 455). Es por esto que el sector hortícola encuentra en este producto la oportunidad de generar nuevas alternativas diferentes a la comercialización en fresco que permitan la comercialización de un producto con alto valor agregado.

En esta investigación se realizó una caracterización en cuanto al contenido de glucorafanina a partir de hojas e inflorescencias de brócoli, esto permitió la selección de las hojas de brócoli como materia prima para la obtención de ingredientes funcionales, para ello se llevó a cabo una extracción asistida con ultrasonido y agua como solvente que permitió la obtención de tres extractos diferentes ricos en glucorafanina, polifenoles totales y alta capacidad antioxidante, posteriormente cada uno de estos extractos fue secado permitiendo la obtención de prototipos intermediarios enriquecidos aplicables a matrices alimentarias.

Justificación

Según el plan Nacional de Horticultura, Antioquia es un departamento que posee cerca de 7.037 hectáreas cosechadas, área que equivale a un 7% del territorio cosechado en el ámbito nacional y que genera un volumen de 134.561 toneladas equivalente al 10% de la producción nacional (Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, 2010).

En la actualidad, Antioquia es una región calificada por la alta producción de hortalizas tales como el brócoli, coliflor, repollo, lechuga, tomate entre otros, anualmente se cosechan cerca de 134.561 toneladas de estos productos (Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, 2010) cifra que tiende a aumentar debido a la gran demanda de los consumidores que cada vez buscan una alimentación más saludable, rica en vegetales y que tiende a lo natural, esto genera un aumento no solo en el volumen de producción, sino también la cantidad en masa de residuos que se producen como efecto de cosecha en cada una de estas hortalizas.

Los residuos o excedentes de cosecha en la mayoría de los casos no se encuentran en mal estado y son rechazados en la cadena productiva por factores como el peso que supera los límites establecidos por el cliente como parámetro de aceptación y por esta razón, se cortan de la planta y se dejan en el campo para alimentación animal o simplemente para que se lleve a cabo el proceso de descomposición como material orgánico generando grandes pérdidas económicas para el horticultor quien no puede dar otro uso a su cosecha sin buscar otra alternativa para su posible comercialización.

La materia prima utilizada en este trabajo fue colectada en campo de un productor

ubicado en el municipio de San Pedro de los Milagros, Antioquia y se empleó la técnica de ultrasonido para optimizar la extracción de compuestos fenólicos y glucosinolatos, sustancias de gran interés y poder biológico debido a sus funciones en la prevención de enfermedades crónicas como el cáncer (Appendino & Bardelli, 2010, 1).

La extracción por procedimientos tradicionales emplea solventes que pueden generar un impacto negativo, dejando trazas no deseadas en el extracto obtenido que pueden ocasionar problemas a la hora de emplear estos extractos como ingredientes al interior de formulaciones de nuevos productos, adicionalmente, requieren de largos periodos de tiempo para culminar, la extracción asistida por ultrasonido permite una reducción en este periodo de tiempo adicionalmente es una herramienta eficaz para la química basada en plantas (Chemat, Rombaut, Sicaire, Meullemiestre, & Abert-vian, 2016, 3).

El uso de agua como solvente proporciona un extracto libre de solventes y que fácilmente puede ser empleado en la industria de alimentos, sin embargo, estos compuestos pueden ser susceptibles a experimentar reacciones de degradación durante el almacenamiento, por tal motivo en el presente trabajo también se plantea el desarrollo de una formulación que permita la encapsulación del extracto y ofrezca estabilidad de los compuestos en el tiempo

Esta investigación deriva de un proyecto macro que lleva por nombre “Aprovechamiento de los excedentes de cosecha en la cadena de hortalizas de Antioquia para la obtención de productos con alto valor agregado” el cual fue financiado por el sistema general de regalías y cuya finalidad es aprovechar los excedentes de cosecha en la cadena de hortalizas de Antioquia para la obtención de productos con alto valor

agregado y así promover la comercialización diferenciada en el mercado nacional e internacional gracias al desarrollo de productos de propiedades funcionales de alto potencial comercial.

De este modo, el impacto más grande que se puede generar con la ejecución de este proyecto y el uso de los resultados esperados será el aumento de la competitividad de la cadena productiva de hortalizas de Antioquia generando oportunidades de investigación, desarrollo social y económico para las regiones.

Objetivos

Objetivo general:

Desarrollar una metodología para la obtención de ingredientes funcionales a partir de excedentes de cosecha del brócoli.

Objetivos específicos:

Caracterizar los excedentes de cosecha del brócoli con respecto a su contenido de compuestos bioactivos (fenoles y glucosinolatos).

Diseñar un proceso escalable para el aprovechamiento de excedentes de cosecha de brócoli mediante la extracción de sustancias bioactivas (fenoles y glucosinolatos).

Obtener prototipos de productos intermediarios enriquecidos en sustancias bioactivas (fenoles y glucosinolatos) aplicables a matrices alimentarias.

Marco conceptual

Brócoli

(*Brassica olearacea L. var Itálica*), es originario de las costas del mediterráneo y Asia Occidental, donde actualmente se encuentran Grecia, Turquía y Siria, de allí fue llevada a Inglaterra, Dinamarca, Holanda, Francia y España. Su nombre proviene del italiano “broco” que hace referencia a brote, parte comestible de la planta (Jaramillo & Díaz, 2006b, 12), actualmente es cultivado en regiones con una temperatura media de 18 a 23 °C. Según FAOSTATS a 2011 el principal productor de esta hortaliza era China con más de ocho millones de toneladas por año seguido de India con seis millones aproximadamente y España que se acerca al millón de toneladas por año, en América Latina el principal productor es México, país que se encuentra en el cuarto lugar de producción mundial.

Este alimento es altamente valorado por grandes grupos de la población, no solo por su sabor, sino también por los efectos benéficos que tiene para la salud como anticancerígeno, bactericida, antimicrobiano y por sus propiedades antioxidantes (Ares, Nozal, & Bernal, 2013, 79). Diversos autores reportan varios beneficios sobre la salud derivados del consumo de brócoli, entre estos una alta capacidad antioxidante que es otorgada gracias a la presencia de provitamina A, beta – caroteno, niacina, vitamina E, ácido fólico, vitamina C y luteína. Adicionalmente, debido a la gran cantidad de fibra dietaria presente en el brócoli, este es recomendado en dietas para mejorar la actividad digestiva y prevenir el estreñimiento. A nivel intestinal esta fibra confiere protección y

facilita la eliminación de lípidos frente al consumo de una dieta rica en grasa. (Mandimika et al., 2012, 1273)

El brócoli también es fuente de glucosinolatos, compuestos de gran interés, gracias a su potencial como anticancerígenos. Adicionalmente, también es fuente de vitamina K (filoquinona) la cual es liposoluble y funciona como coenzima por lo cual está implicada en la coagulación de la sangre y el metabolismo óseo. Dicha vitamina está presente en concentraciones mayores a 100 mg filoquinona/ 100 g de verdura (Moreno, Carvajal, López-Berenguer, & García-Viguera, 2006, 1510). Autores como Jaramillo & Díaz, (2006^a, 1) reportan que el brócoli ayuda a regular la insulina y el azúcar en sangre, reduciendo el riesgo de diabetes, en consecuencia, durante los últimos años se ha generado mayor interés en la extracción, aislamiento, caracterización y determinación de la actividad biológica de cada uno de estos compuestos y esto se evidencia en la cantidad de investigaciones publicadas en el tema (fig 1 y 2).

Figura 1. Número de publicaciones obtenidas mediante la base de datos SciFinder que contienen el termino glucosinolatos. (Fecha de la consulta 23 – 02 – 16)

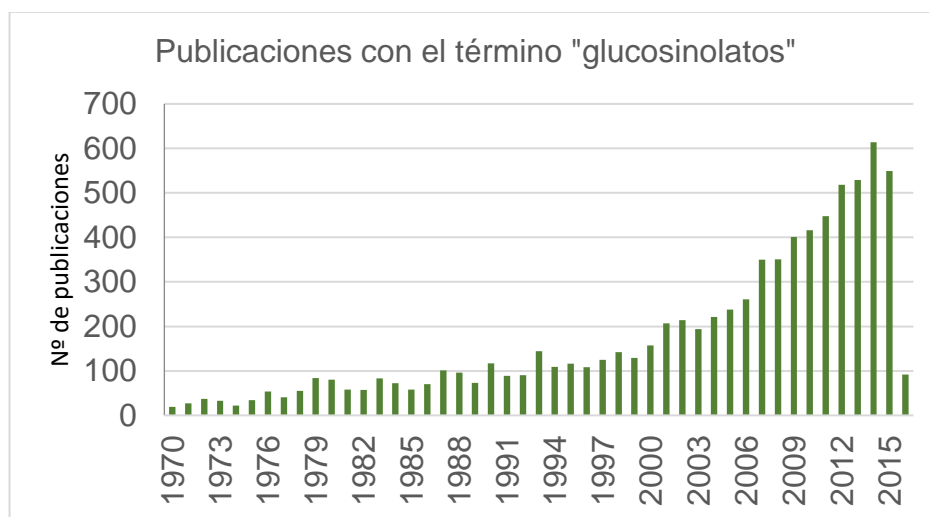
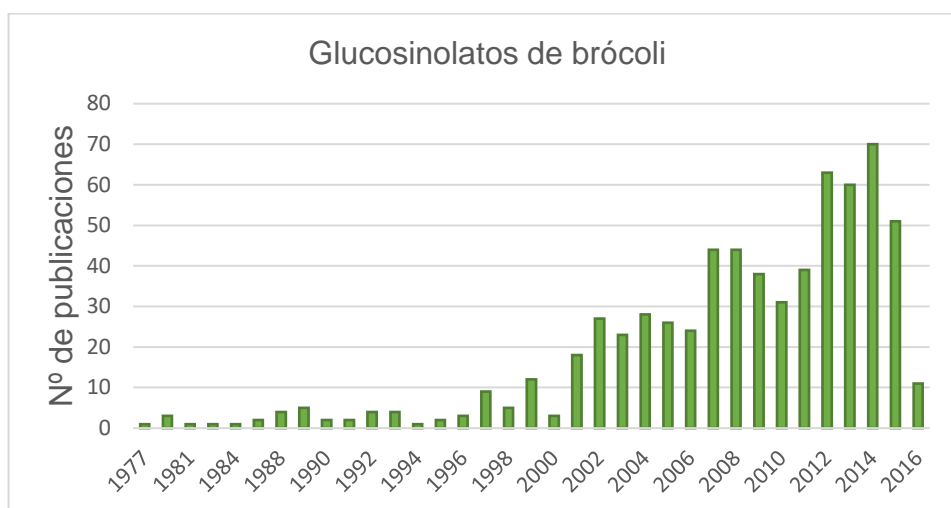


Figura 2. Número de publicaciones obtenidas mediante la base de datos SciFinder que contienen el termino glucosinolatos de brócoli. (Fecha de la consulta 23 – 02 – 16)



En Colombia el cultivo de brócoli se ha popularizado tanto, que según el Anuario estadístico de frutas y hortalizas 2012 del Ministerio de agricultura y desarrollo rural (Ministerio De Agricultura y desarrollo Rural, 2012), el departamento de Antioquia posee una participación del 43% de la producción nacional, siendo el municipio de Marinilla el primer productor en el Departamento con el 96.4%. En el resto del país los departamentos de Cundinamarca, Nariño, Risaralda y Boyacá siguen al departamento antioqueño con un porcentaje de participación del 29, 10.6, 8.8 y 6.8 respectivamente.

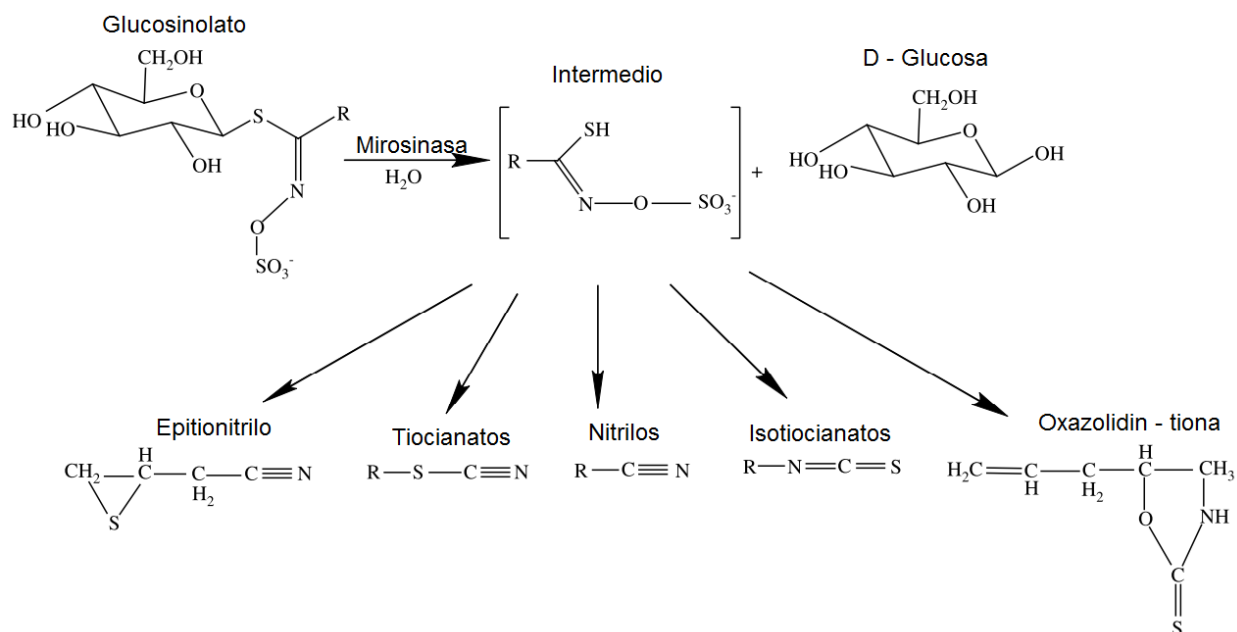
En el departamento de Antioquia la producción hortícola se desarrolla esencialmente gracias a pequeños productores los cuales constituyen el 95% del total de la cosecha. Además poseen áreas entre 0.1 y 1.0 hectáreas, emplean una mano de obra familiar y carecen de recursos económicos que permitan tecnificar su labor lo cual genera altos costos económicos. No se tienen cifras exactas acerca de la cantidad de

pérdidas poscosecha, sin embargo, se estima que desde la recolección hasta el consumidor final se pierden entre un 12% y 25% del volumen final.

Glucosinolatos

Son compuestos nitro sulfurados que se encuentran en la familia *Brassicaceae* y son el resultado de la unión de un azúcar reductor y el azufre de una molécula que no tiene hidrato de carbono (aglicona) (Schonhof, Krumbein, & Brückner, 2004, 3), los glucosinolatos contribuyen al sabor y aroma de las brassicas, poseen bajo poder biológico, pero este incrementa luego de ser hidrolizados (Lampe, 2003, 850s). Normalmente estos compuestos son estables al interior de las células vegetales, sin embargo, cuando los tejidos vegetales y las células son dañadas, estos son hidrolizados (GU, GUO, & GU, 2012, 1804); la hidrólisis de los glucosinolatos esta mediada por la enzima mirosinasa y su contenido puede cambiar entre variedades de una misma especie (J W Fahey, Zalcmann, & Talalay, 2001^a, 5). Como producto de hidrólisis podemos encontrar isotiocianatos, nitrilos, tiocianatos, epithionitrilos y oxazolidinas (Verkerk et al., 2009, 2).

Figura 3. Hidrolisis de glucosinolatos por la enzima mirosinasa y sus diferentes productos de hidrolisis. Adaptado de (Vig, Rampal, Thind, & Arora, 2009, 1563)



En la naturaleza existen más de 120 glucosinolatos en el reino vegetal, diferenciándose en los aminoácidos de su cadena lateral (J W Fahey et al., 2001^a, 5) clasificándose en:

- Alifáticos
- Aromáticos
- Benzoicos
- Glucosinolatos con azufre en su cadena lateral
- Glucosinolatos glicosilados múltiples
- Heterocíclicos o indólicos (Rodríguez Hernandez, 2013, 3).

Diversas investigaciones han reportado la extracción de hasta 20 tipos de glucosinolatos diferentes: glucoiberin, GIB; glucoraphanin, GRA; glucoerucin GER;

gluconapin, GNA; glucotropaeolin, GTL; glucobrassicin, GBC; gluconasturtiin, GST; glucoalyssin, ALY; 4-hydroxyglucobrassicin, 4-OH; 4-metoxylucobrassicin, 4ME; neoglucobrassicin, NEO; sinigrin, SIN (Bernal, Ares, Nozal, & Bernal, 2014, 1). En la tabla 1 se presentan los glucosinolatos más representativos del brócoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) y el rango de concentración según datos reportados por Latté, Appel, & Lampen (2011, 3288). Igualmente en la figura 4 se presenta la estructura química de los glucosinolatos más representativos del brócoli.

Tabla 1. Glucosinolatos presentes en el brócoli (*Brassica oleracea* var. *italica*), datos de varios autores reportados por Latté et al. (2011, 3288)

Glucosinolatos	Rango de concentración ($\mu\text{mol/g}$ de material seco)
<i>Glucoiberin</i>	0 – 7.8
<i>Glucorafanina</i>	0.3 – 38.4
<i>Glucoalyssin</i>	0 – 5.9
<i>Glucoerucin</i>	Trazas
<i>Glucoibervirin</i>	Trazas
<i>Gluconapin</i>	0 – 1
<i>Progoitrin</i>	0.1 – 16.1
<i>Sinigrin</i>	0 – 0.1
<i>Napoleiferin</i>	0.3 – 0.7
<i>Glucobrassicinapin</i>	0 – 0.6
<i>Epiprogoitrin</i>	Trazas
<i>Gluconasturtiin</i>	0 – 0.4
<i>Glucobrassicin</i>	1.1 – 33.4
<i>Neoglucobrassicin</i>	0.2 – 19.9
<i>4 Hydroxyglucobrassicin</i>	0 – 0.6
<i>4 Methoxyglucobrassicin</i>	0.2 – 2

Contenido total de glucosinolatos

12.8 – 20.9

Como se evidencia en la tabla 1, la Glucorafanina (1-S-[(1E)-5-(methylsulfinyl)-N-(sulfonatooxy)pentanimidoyl]-1-thio- β -D-glucopyranose) es el glucosinonato de mayor concentración en el brócoli, este constituye más del 80% de los glucosinolatos presentes en el vegetal (Van Eylen et al., 2009, 2), este glucosinolato es de gran interés para la industria de alimentos y farmacéutica debido al potencial que posee el producto de su hidrólisis, el sulforafano, un isotiocianato de interés particular debido a su alto poder anticancerígeno, el sulfurafano es inductor de las enzimas de fase II en humanos lo que brinda protección frente a sustancias cancerígenas e inflamatorias (J W Fahey, Zalcmann, & Talalay, 2001b, 2); este isotiocianato puede disminuir el riesgo de desarrollar diferentes tipos de cáncer como lo son cáncer de mama (Rose, Huang, Ong, & Whiteman, 2005, 1), piel (Talalay et al., 2007, 1) y cancer gastrico (Jed W Fahey et al., 2002, 1). En la tabla 2 se presentan algunos de los glucosinolatos presentes en el brócoli y sus diferentes productos de hidrólisis.

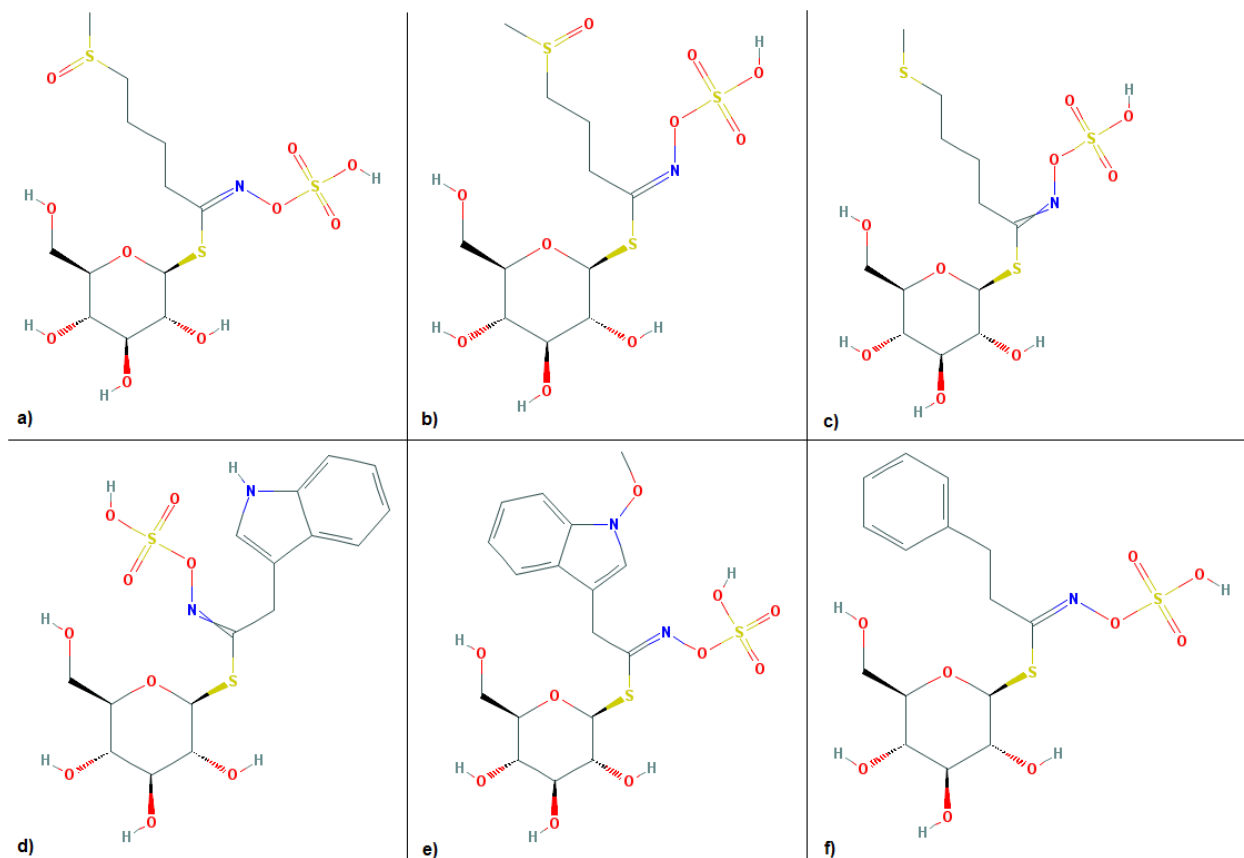
Tabla 2. Clasificación de los glucosinolatos más representativos en brócoli según su estructura y sus productos de hidrólisis (Rodríguez Hernandez, 2013, 3)

Estructura	Nombre trivial	Isotiocianato asociado
Alifáticos	Gluciberina (GI)	Iberina (IB)
	Glucorafanina (GR)	Sulforafano (SFN)
Aromáticos	Glucoerucina (GE)	Erucina (ER)
	Glucónasturtina (GN)	Fenetil – iso – tiocianato (PEITC)
Indólicos	Glucobrasicina (GB)	Indol – 3 – carbinol (I3C)
	Neoglucobrasicina (NGB)	

Sin embargo, algunos estudios reportan que la mirosinasa endógena en el brócoli es ineficiente para realizar el proceso de hidrólisis. Jeffery y Stewart reportaron que la enzima puede convertir cerca del 25% o menos de la glucorafanina existente en el vegetal, pese a esto, en el organismo de los seres humanos esta hidrólisis se puede dar por mirosinasa y/o glucosidasas derivadas de la microbiota intestinal, (Latté et al., 2011, 1) no obstante, desde la cosecha inicia una lucha por la estabilidad de estos compuestos que se ven afectados por la temperatura, la luz y el tiempo de almacenamiento del producto en fresco.

Estudios de estabilidad reportan que el almacenamiento de 0 a 4 °C durante cuatro o siete días no representa cambios significativos en el contenido total de glucosinolatos, alifáticos totales, indólicos totales o individuales en inflorescencias de brócoli (Rybarczyk-Plonska et al., 2016, 20) la glucorafanina se encuentra estable en inflorescencias de brócoli almacenadas a 4°C durante 7 días (Rangkadilok et al., 2002, 7388).

Figura 4. Estructura química de glucosinolatos presentes en el brócoli.



a. Glucorafanina, b. glucoiberin, c. glucoerucina, d. glucobrassicina, e. neoglucobrassicina f. gluconasturtina

Tabla 3. Principales glucosinolatos presentes en el brócoli. Información recuperada de National Center for Biotechnology Information (NCBI) (2017). PubChem Search Beta. Recuperado de <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>

Glucorafanina			Glucoiberin		
$C_{12}H_{23}NO_{10}S_3$			$C_{11}H_{21}NO_{10}S_3$		
CAS	21414-41-5	Alifático	CAS	554-88-1	Alifático
Peso molecular	438	g/mol	Peso molecular	423,48014	g/mol
Masa exacta (M-H)-	437 436	g/mol	Masa exacta (M-H)-	423,032759 422	g/mol
Soluble en	agua, etanol, metanol		Soluble en	agua	
Producto de hidrolisis	Sulforafano		Producto de hidrolisis	Iberin	
Progoitrin			Sinigrina		
$C_{11}H_{18}NO_{10}S_2^-$			$C_{10}H_{16}KNO_9S_2$		
CAS	585-95-5	Alifático	CAS	3952-98-5	Alifático
Peso molecular	388,39132	g/mol	Peso molecular	397,463640	g/mol
Masa exacta (M-H)-	388,037213 388	g/mol	Masa exacta (M-H)-	396,990355 358	g/mol

soluble en	agua, metanol	soluble en	agua, metanol
Producto de hidrolisis	Goitrina	Producto de hidrolisis	Isotiocianato de alilo
Glucoalyssin		Sinalbina	
CAS	$C_{13}H_{25}NO_{10}S_3$ Alifático	CAS	$C_{14}H_{19}NO_{10}S_2$ Alifático
Peso molecular	451,53330 g/mol	Peso molecular	425,43136 g/mol
Masa exacta (M-H)-	451,064059 g/mol 450	Masa exacta (M-H)-	425,045038 g/mol 424
soluble en	agua, metanol	soluble en	metanol, agua
		Producto de hidrolisis	4 - hidroxibencil isotiocianato
Gluconapin		Glucoiberverin	
CAS	$C_{11}H_{18}NO_9S_2$ 19041-09-9 Alifático	CAS	$C_{11}H_{20}NO_9S_3$ 26888-03-9 Alifático
Peso molecular	372,39192 g/mol	Peso molecular	407,467 g/mol

Masa exacta (M-H)-	372,042298 372	g/mol	Masa exacta (M-H)-	407,467000 406	g/mol
Soluble en	agua, metanol		soluble en	metanol, agua	
Glucoerucin			Glucobrasicina		
CAS	$C_{12}H_{23}NO_9S_3$ 21973-56-8	Alifático	CAS	$C_{16}H_{20}N_2O_9S_2$ 4356-52-9	Indolico
Peso molecular	421,50732	g/mol	Peso molecular	448,46800	g/mol
Masa exacta (M-H)-	421,053494 420	g/mol	Masa exacta (M-H)-	448,061022 447	g/mol
soluble en	agua, metanol		soluble en	metanol, agua	
			Producto de hidrolisis	indol - 3- carbonil y ion tiocianato	
Glucoberteroin			Gluconasturtin		
CAS	$C_{13}H_{24}NO_9S_3^-$ 29611-01-6	Alifático	CAS	$C_{15}H_{21}NO_9S_2$ 18425-76-8	Aromático
Peso molecular	434,52596	g/mol	Peso molecular	423,45854	g/mol

Masa exacta (M-H)-	434,061319 434	g/mol	Masa exacta (M-H)-	423,065773 422	g/mol
Soluble en	agua, metanol		Soluble en	agua, metanol	

Compuestos fenólicos

El brócoli es considerado como un alimento buena fuente de compuestos que promueven la salud, autores como Ares et al. (2013, 78) reportan que cerca del 28% de los compuestos estudiados del brócoli que reportan beneficios a la salud de los seres humanos son compuestos fenolicos. En la actualidad, estos compuestos son de gran interés debido a su potencial como compuestos antioxidantes que sirven para prevenir ciertos tipos de cancer y enfermedades del corazón (Cartea, Francisco, Soengas, & Velasco, 2011, 251)

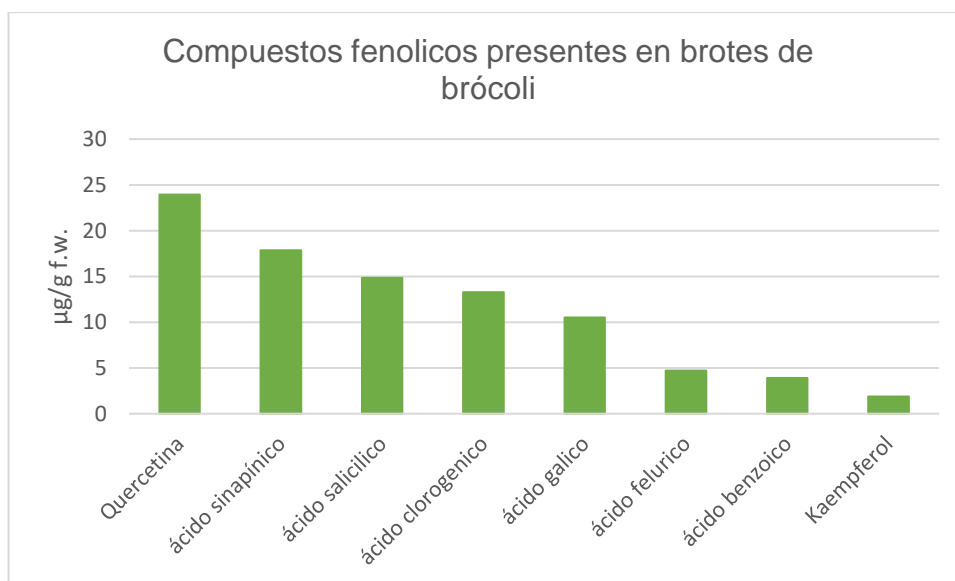
Se han reportado mas de 4000 compuestos divididos en 12 subclases que pertenecen a esta clase de compuestos naturales (Ares et al., 2013, 82). En las plantas, estos compuestos tienen actividad antioxidante en el sistema de defensa y adicionalmente sirven de apoyo al sistema de desintoxicacion dependiente de ascorbato (Sakihama, Cohen, Grace, & Yamasaki, 2002, 68). Diversas investigaciones han demostrado que muchos constituyentes polifenólicos dietéticos derivados de plantas son los antioxidantes más eficaces in vitro que las vitaminas E o C, y por lo tanto pueden contribuir significativamente a efectos protectores in vivo (Rice-Evans, Miller, & Paganga, 1997, 152). Estos compuestos pueden ser simples, de bajo peso molecular, aromáticos o anillos individuales de taninos grandes complejos (Ares et al., 2013, 82). Dependiendo de su estructura se pueden clasificar en fenoles simples, ácidos fenólicos, derivados del ácido hidroxicinámico y flavonoides. (Fратиanni & Cardinale, 2014, 1).

Los brotes de brocoli son reconocidos como una fuente rica de compuestos biologicamente activos, entre estos podemos encontrar flavonoides y acidos fenolicos tales como galico, ferúlico clorogénico, benzoico, sinapínico, ácidos salicílico, quercetina

y Kaempferol (Gawlik-Dziki et al., 2012, 469). Gracias a la actividad de los compuestos fenolicos es que algunos autores relacionan el brócoli con un efecto anticancerigeno en la prevención del cancer de prostata. (Appendino & Bardelli, 2010, 1).

Investigaciones previas han evaluado el contenido de los compuestos fenolicos presentes en el brócoli (cuantificado como equivalentes de ácido gálico) alcanzando un valor de 4,23 mg / g de peso fresco para brotes de brócoli (Gawlik-Dziki et al., 2012, 471). En la figura 5 se muestra el contenido de compuestos fenolicos presentes en brotes de brócoli reportado por Gawlik-Dziki et al. (2012, 471). La concentracion de estos compuestos depende de diversos factores ambientales y los tratamientos poscosecha que se empleen en el brócoli (Shiva & Jung-Ho, 2014, 1).

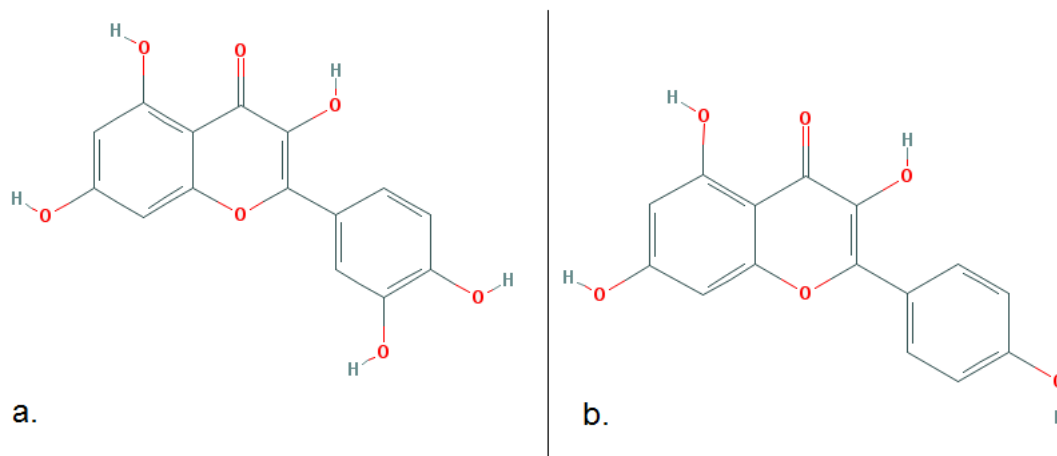
Figura 5. Contenido de compuestos fenolicos presentes en brotes de brócoli reportado por Gawlik-Dziki et al. (2012, 1) posterior a la extraccion con metanol.



Por otro lado, los flavonoides son una familia que forma parte de los compuestos fenolicos. En el brócoli estos también están presentes, la quercetina y Kaempferol son

los mas predominantes (Ares et al., 2013, 82). La estructura química de estos compuestos se presenta en la figura 6.

Figura 6. Estructura química de la quercetina y el kaempferol. Adaptado de (Cartea et al., 2011, 254)



a. Quercetina b. Kaempferol

Extracción asistida por Ultrasonido

El ultrasonido es una técnica que se emplea de manera comercial desde 1917; desde entonces, el tema se ha desarrollado y expandido a un gran número de aplicaciones (Azuola & Vargas, 2007, 31). Esta tecnología es ampliamente utilizada en la industria alimentaria ya que puede ser empleada en procesos de limpieza, desinfección, mezclado, emulsificación, impregnación, filtración, congelación, cristalización, precipitación, deshidratación y extracción. Como técnica de extracción es una herramienta eficaz para la química basada en plantas (Chemat et al., 2016, 1), sin

embargo, cuando se emplea ultrasonido para un proceso de extracción, esta no es selectiva puesto que la polaridad del solvente empleado es determinante para obtener en el medio las sustancias que son accesibles a él, a modo de ejemplo cuando se emplea agua como solvente para un proceso de extracción asistida por ultrasonido, en el extracto final se van a encontrar todas las sustancias de naturaleza polar, sustancias que tienen afinidad con el agua y son solubles en ella.

Las ondas de ultrasonido son aquellas que superan el límite de percepción del oído humano, o sea aquellas que están sobre los 20 kHz. (Kadam, Tiwari, Alvarez, & Donnell, 2015, 60) No obstante, el ultrasonido puede caracterizarse según la potencia y frecuencia, es decir, baja frecuencia / alta potencia (<16-100 kHz y potencia de 10 a 1000 W cm⁻²) y alta frecuencia / baja potencia (100 kHz a 10 MHz y potencia < 1 W cm⁻²) (Soria & Villamiel, 2010, 324).

El ultrasonido de baja potencia se utiliza principalmente en diagnósticos médicos, mientras que el ultrasonido de alta potencia se utiliza para inducir cambios físicos y químicos en las matrices biológicas debido a efectos mecánicos, cavitarios y térmicos, implosión de burbujas cavitacionales, formación de micro-chorros, micro-turbulencia, colisiones inter-partículas de alta velocidad y perturbación en partículas microporosas (Kadam et al., 2015, 63).

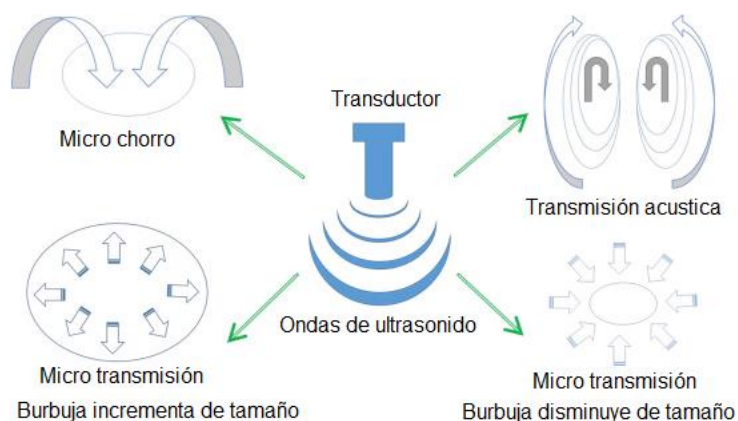
Sin embargo, el tratamiento con ultrasonido de alta potencia durante largos periodos de tiempo puede generar condiciones de alta presión y temperatura (Kadam et al., 2015, 63) que podrían afectar la estabilidad de los compuestos de interés, Pongmalai, Devahastin, Chiewchan, & Soponronnarit. (2016, 1) reportaron que el contenido de

vitamina c en un extracto obtenido mediante extracción asistida por ultrasonido disminuye luego de 15 minutos de sonicación y esta disminución es mayor cuando el tanque sonicador alcanza una temperatura cercana a los 63°C.

No obstante, la extracción mediada por ultrasonido es considerada como una tecnología nueva, robusta, verde y adecuada cuando se desea realizar un escalado para el proceso de extracción (Kadam et al., 2015, 60). Adicionalmente, se ha demostrado que es una tecnología de un costo inferior a otras empleadas para diversos procesos de extracción como la extracción por fluidos supercríticos.

El ultrasonido ha recibido mucha atención debido a su capacidad de modificar la estructura de la planta a través de la cavitación acústica (Pongmalai et al., 2016, 4) logrando así la ruptura de la membrana celular y liberación de los compuestos a extraer, los mecanismos que emplea el ultrasonido para la generación de la cavitación de burbujas se presentan en la figura 7, esta cavitación es responsable del colapso de la burbuja (Donnell, Tiwari, Bourke, & Cullen, 2010, 359).

Figura 7. Mecanismo del fenómeno de cavitación de burbujas, tomada de (Kadam et al., 2015, 61)



La clasificación de la extracción asistida por ultrasonido como una tecnología verde ha desencadenado un nivel alto de interés por parte de la industria de alimentos para diversos usos como se evidencian en la tabla 4. Las aplicaciones del ultrasonido están basadas en tres métodos diferentes aplicación directa en al producto, acoplamiento con el dispositivo e inmersión en un baño ultrasónico (Chemat & Khan, 2011, 814)

Tabla 4. Aplicaciones del ultrasonido para el procesamiento de alimentos, tomada de (Chemat & Khan, 2011, 814)

Aplicaciones	Métodos convencionales	Principio del ultrasonido	Ventajas	Productos
Cocina	Estufa Fría Baño de agua	Transferencia uniforme de calor	Menos tiempo Mejorando la transferencia de calor y la calidad organoléptica	Verduras de Carne
Congelación / cristalización	Congelador Congelación por inmersión, por contacto	Transferencia uniforme de calor	Menos tiempo Pequeños cristales Mejora de la difusión Disminución rápida de la temperatura	Carne Verduras Frutas Productos lácteos
El secado	Atomización Caudal de gas caliente Congelación Pulverización	Transferencia uniforme de calor	Menos tiempo Mejora de la calidad organoléptica Mejora de la transferencia de calor	Productos deshidratados (frutas, verduras)
Decapado / marinado	Salmuera	Aumento de la transferencia de masa	Menos tiempo Mejora de la calidad organoléptica Estabilidad del producto	Hortalizas Carne Queso de Pescado
Desgasificación	Tratamiento mecánico	Fenómeno de compresión-rarefacción	Menos tiempo Mejorando la higiene	Chocolate Productos fermentados (Cerveza...)
Filtración	Filtros (membranas semipermeables)	Vibraciones	Menos tiempo Mejorando la filtración	Líquidos (jugos, ...)
Desmoldeo		Vibraciones		

	Moldes de lubricación de teflón Moldes de silicona		Menos tiempo Reducción de pérdidas de productos	Productos cocinados (pastel, ...)
Antiespumante	Tratamiento térmico Tratamiento químico Tratamiento eléctrico Tratamiento mecánico	Fenómeno de cavitación	Menos tiempo Mejorando la higiene	Bebidas carbonatadas Productos fermentados (Cerveza, ...)
Emulsificación	Tratamiento mecánico	Fenómeno de cavitación	Menos tiempo Estabilidad de la emulsión	Emulsiones (ketchup, mayonesa, ...)
Oxidación	Contacto con el aire	Fenómeno de cavitación	Menos tiempo	Alcoholes (vino, whisky, ...)
Corte	Cuchillos	Fenómeno de cavitación	Menos tiempo Reducción de pérdidas de productos Corte preciso y repetitivo	Productos frágiles (pastel, queso, ...)

Secado por aspersión.

Actualmente el secado por aspersión es una de las técnicas con mayor aplicación en la industria de alimentos para la obtención de alimentos deshidratados y lograr aumentar la vida útil de los mismos.

El proceso de secado por aspersión implica principalmente los siguientes pasos:

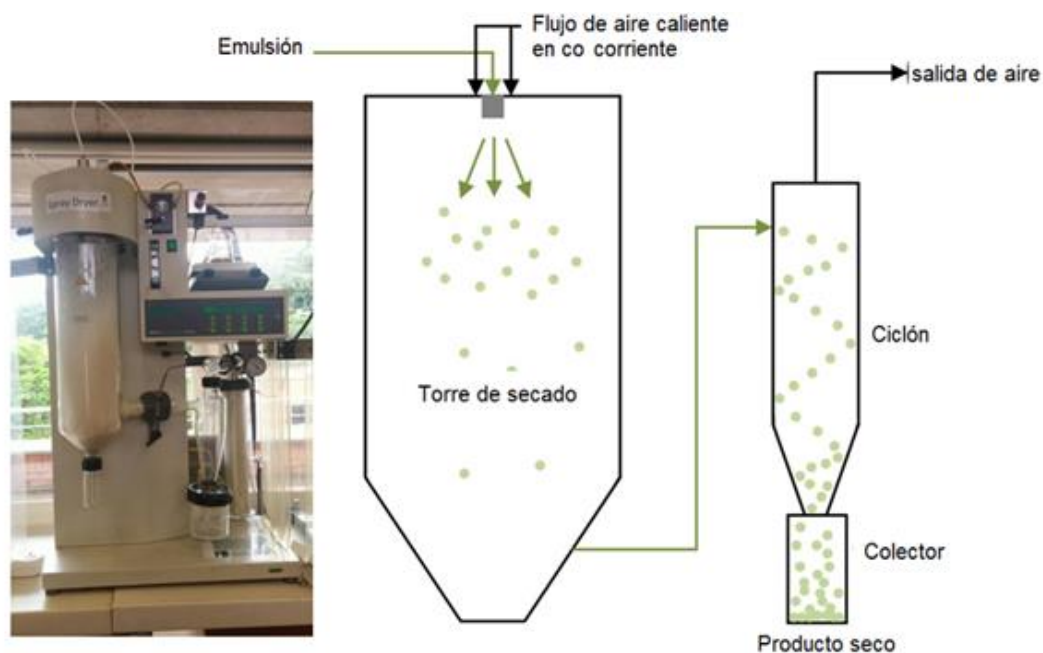
1. Preparación de alimentación (generalmente concentración de un jugo y adición de los materiales vehículo a emplear)
2. Generación de las condiciones óptimas para la evaporación del agua presente en la emulsión y alimentación de la misma.
3. Contacto de la emulsión en gotas con el aire caliente
4. Secado de las gotas atomizadas, la evaporación del agua tiene lugar en dos etapas. En la primera se produce la evaporación a velocidad constante en la superficie de la gota y en segunda instancia como no se tiene suficiente humedad en la superficie de la gota la evaporación del agua restante dependerá de la difusión de la humedad a través de la cascara formada que cada vez va aumentando en espesor.
5. Finalmente se produce la separación de las partículas obtenidas y el aire caliente por medio de un ciclón y filtros que permiten la precipitación de las partículas en un recipiente colector. (Verma & Singh, 2015, 4)

En la actualidad, existen diversos procesos químicos que permiten la encapsulación de compuestos para la industria de alimentos entre estos encontramos coacervación, co – cristalización, gelificación interna, gelificación iónica, atrapamiento en liposomas e inclusión molecular. También existen procesos mecánicos como el secado por aspersión, aspersión por enfriamiento o congelamiento, y extrusión (Adolfo & Huertas, 2011, 1)

El secado por aspersión o pulverización (figura 8) es una técnica que durante décadas se ha empleado para encapsular ingredientes alimentarios como aromas, lípidos y carotenoides; (Gharsallaoui, Roudaut, Chambin, Voilley, & Saurel, 2007, 1), es gracias a esto que en la actualidad la industria de alimentos posee ingredientes que hace algunos años se consideraban inviables debido a la inestabilidad que poseen a condiciones medio ambientales como lo son la humedad, la temperatura, la luz y la humedad.

Figura 8. Diagrama esquemático de un proceso de encapsulación mediante secado por aspersión e imagen de un Mini Spray Dryer B-290 (BÜCHI). Imagen adaptada de Chávarri, Maria. Villarán, María Carmen. Marañon, Izaskun. (2017). Encapsulation Technology to Protect Probiotic Bacteria. Recuperado de url

<https://www.intechopen.com/books/probiotics/encapsulation-technology-to-protect-probiotic-bacteria#article-front>



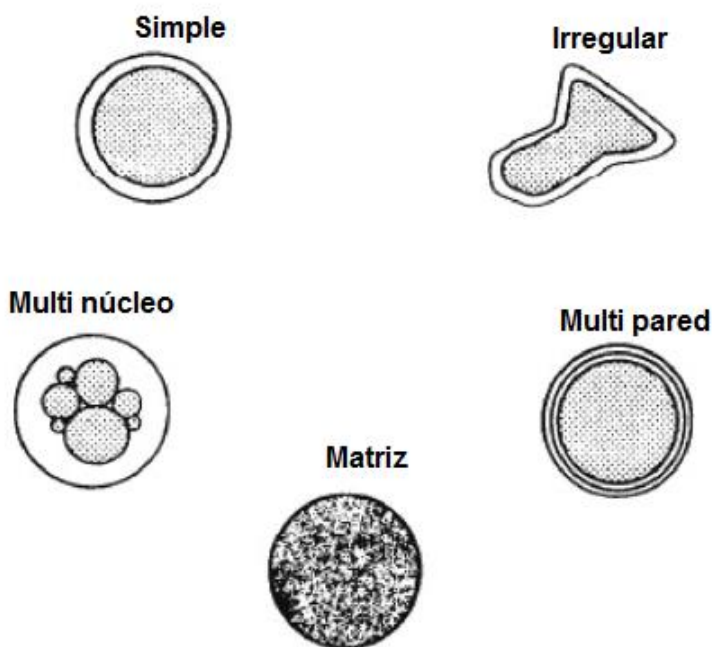
La microencapsulación es definida como un proceso en el cual pequeñas partículas o gotas de líquido son rodeadas por un recubrimiento, la matriz que recubre es conocida como pared y el material interno es denominado núcleo, el cual puede estar formado por uno o varios componentes. (Saavedra Hortúa, 2015, 30)

Durante la elaboración de ingredientes funcionales, esta técnica se emplea para proteger condiciones de procesamiento severas durante la producción, mejorar la calidad mediante la inhibición del crecimiento microbiano y favorecer la calidad sensorial

mediante el enmascaramiento de sabores desagradables como el amargo de los polifenoles (Zhu, 2017, 543).

La mayoría de las microcapsulas formadas mediante secado por aspersión poseen formas regulares como esferas con diámetros comprendidos entre unos pocos micrómetros y unos pocos milímetros, (Gharsallaoui et al., 2007, 1108) sin embargo, como técnica no garantiza la formación de esferas perfectas y se pueden presentar otras formas irregulares como se muestra en la figura 9.

Figura 9. Morfología de diferentes tipos de micro capsulas. (Gharsallaoui et al., 2007, 1108)



Es importante determinar la morfología de las micropartículas obtenidas ya que estas pueden influir en propiedades físicas del material obtenido como lo son la solubilidad y humectabilidad (Cano-Chauca, Stringheta, Ramos, & Cal-Vidal, 2005, 427). La formación de una superficie dura durante el secado en la partícula logra impedir que moléculas de agua se difundan a través de la misma al momento de solubilizar y/o humectar.

Agentes encapsulantes.

Diversos materiales han sido estudiados y empleados como agentes encapsulantes que brindan protección a los compuestos de interés, entre ellos se destacan el almidón (Zhu, 2017, 543) maltodextrina (Quek, Chok, & Swedlund, 2007, 386) (Wu, Zou, Mao, Huang, & Liu, 2014, 497) (López H., Márquez C., Mayo A., Toledo S., & Pérez S., 2009, 628) proteínas (Lia et al., 2015, 302) (Tontul & Topuz, 2017, 92) goma arábica (Lia et al., 2015, 302) (García-saldaña et al., 2016, 95) gelatina (García-saldaña et al., 2016, 94).

Goma arábica.

La goma arábica (GomA, E424) es un exudado gomoso seco comestible obtenido del tronco y las ramas de Acacia Senegal y Acacia Seyal, este exudado es rico en fibras solubles de baja viscosidad (Sanchez et al., 2017, 2). Esta goma se logra disolver

fácilmente en agua fría o caliente hasta concentraciones aproximadamente 50 – 55 % pero es insoluble en alcohol (Verbeken, Dierckx, & Dewettinck, 2003, 11), no obstante, aunque no es soluble en alcohol logra disolverse cuando se mezcla con soluciones de alcohol inferiores al 50%, cuando esta concentración se excede la GomA se precipita (Sanchez et al., 2017, 3). En la actualidad, su uso en la industria de alimentos se ve limitado debido al alto costo que posee en el mercado, sin embargo, esta goma goza de grandes propiedades que la hacen idónea para la microencapsulación de ingredientes funcionales, una combinación de esta goma con gelatina se ha reportado en la literatura para la encapsulación de brócoli por coacervación (Sánchez, García, Calvo, Bernalte, & González-Gómez, 2016, 244) y de sulforafano mediante el secado por aspersion. (García-saldaña et al., 2016, 95)

Gelatina

Ampliamente usada en el secado por aspersion debido a sus buenas propiedades de emulsificación, formación de película y solubilidad en agua, (Shu, Yu, Zhao, & Liu, 2006, 665) esta proteína es considerablemente empleada como agente formador de pared en busca de proteger ingredientes funcionales en la industria de alimento y farmacia permitiendo una liberación controlada en el intestino y sangre ya que puede mantener la concentración del fármaco en sangre o entregar el fármaco directamente a

las células u órganos específicos (Chen et al., 2017, 493) en general la gelatina representa una buena fuente de materia prima para la obtención de micropartículas puesto que brinda la posibilidad de sustituir otros de carácter sintético y dar paso al uso de proteínas naturales, adicionalmente, su costo no es tan elevado comparado con las gomas.

Maltodextrina

Las maltodextrinas de diferentes equivalente de dextrosa (DE) se usan comúnmente como material de la pared por su alta solubilidad en agua, de baja viscosidad, bajo contenido de azúcar y sus soluciones son incoloras (Robert et al., 2010, 1388); este agente encapsulante es de amplio uso en la industria debido a su bajo costo en el mercado, además, Yousefi et al. (2015, 467) mencionan que el uso de maltodextrina se aplica predominantemente cuando se desean obtener emulsiones con un alto porcentaje de sólidos sin efectuar un aumento significativo en la viscosidad, lo cual va a generar una alta solubilidad y humectabilidad del producto seco cuando el secado se realiza por aspersion. (Yousefi, Emam-djomeh, Mousavi, Kobarfard, & Zbicinski, 2015, 467)

Metodología

Reactivos:

Se emplearon reactivos como Hexano, diclorometano, cloroformo y acetona (grado reactivo, Merck, Darmstadt, Alemania), acetona, y metanol, (grado HPLC, Merck, Darmstadt, Alemania), RMCD: β ciclo dextrina metilada, AAPH: 2,2'-azobis (2-amidinopropano) dihidrocloruro, Trolox: ácido-6- hidroxí-2,5,7,8- terametilcroman-2-carboxílico y asolecitina de soya (Sigma – Aldrich Co., St. Louis, Estados Unidos), Biodes-ULTRA empleado como desinfectante se obtuvo de Industrias Cory Medellín, Colombia, Estandar de glucorafanina sal de potasio se obtuvo de ChromaDex (Irvine, EE.UU)

Identificación de zonas de producción de excedentes y recolección de la materia prima:

La materia prima de brócoli se recolectó en el Municipio de San Pedro de los Milagros, Antioquia; en la Finca San Esteban (Agrosan), lugar donde se tomaron inflorescencias y hojas de brócoli para realizar la caracterización microbiológica, bromatológica y de los compuestos de interés (compuestos fenólicos totales y glucorafaina).

Lavado y desinfección del material vegetal:

Las muestras tomadas directamente desde el cultivo se llevaron al laboratorio donde fueron lavadas con abundante agua y se desinfectaron mediante la inmersión durante 15 minutos en una solución de BioDes Ultra, (Extractos cítricos al 16%) solución

que se preparó de acuerdo a las recomendaciones del fabricante mostradas en la tabla 5; inflorescencias y hojas se lavaron y desinfectaron por separado. Los utensilios y equipos también se desinfectaron de acuerdo a las recomendaciones del fabricante mostradas en la tabla 5.

Tabla 5. Recomendaciones del fabricante de BioDes Ultra.

Area	Dilucion / PPM	Tiempo de contacto
<i>Superficies en general/ ambientes</i>	3 ml/ ajustando 1 L de agua / 480 PPM	No enjuagar
<i>Hortalizas, tuberculos y frutas porosas</i>	10 – 15 mL/ ajustando 1 L de agua / 1600 – 2400 PPM	15 minutos

Proceso de secado

Posterior al proceso de limpieza y desinfección, las muestras de brócoli fueron ubicadas en un secador de lecho fluidizado (modelo 0193, serie 002 ACTUM, Rionegro, Antioquia- Colombia). Durante el proceso de secado la temperatura se fijó en 50 °C y la humedad final fue de 9,4% medida por termo gravimetría mediante un analizador halógeno de humedad (Modelo HB43-S, Mettler Toledo International Inc.). Con el fin de obtener un tamaño de partícula pequeño y homogéneo, el producto seco se procesó en una licuadora Clásica (OSTER SKU: 004655-013-000), el polvo resultante fue tamizado en tres mallas diferentes (ASTME-11) número 20, 30 y 40 con aberturas de 0.850 μm , 0.600 μm , 0.425 μm respectivamente, buscando obtener un tamaño inferior a 0.425 μm el material que no pasara la malla 30 era molido de nuevo y posteriormente tamizado. El polvo obtenido se almacenó en una bolsa con cierre hermético al interior de un empaque

negro para evitar el contacto con la luz, estas bolsas se almacenaron en un cuarto con 40% de humedad relativa.

Caracterización microbiológica

Previo al proceso de limpieza y desinfección del material vegetal, desde el campo se tomaron muestras en bolsas estériles para realizar la caracterización microbiológica; esta caracterización se llevó a cabo siguiendo protocolos del laboratorio de microbiología de la Corporación Universitaria Lasallista, dichos protocolos están basados en los métodos AOAC mostrados en la tabla 6.

Tabla 6. Métodos empleados para la caracterización microbiológica del brócoli.

Análisis	Referencia
Coliformes y E. coli en alimentos. capítulo 17 edición 18, 2005	Método No 996.02 de la AOAC
Recuento Mesófilos y aislamiento de Salmonella	Método No 74.1991 de la AOAC

Una vez concluido el proceso de secado y tamizado también se realizó una nueva caracterización microbiológica con el fin de evaluar la efectividad del proceso de desinfección.

Caracterización bromatológica

Posterior al proceso de secado se realizó la caracterización bromatológica de hojas e inflorescencias por separado, el procedimiento realizado en el laboratorio

obedece a guías del laboratorio de Química de la Corporación Universitaria Lasallista y estas a su vez corresponden a los siguientes métodos AOAC

Tabla 7. Métodos AOAC empleados para la caracterización bromatológica del brócoli.

Parámetro	Método
Extracto etéreo (%)	Método No 989.05 de la AOAC
Proteína (%)	Método No 954.01 de la AOAC
Cenizas (%)	Método No 942.05 de la AOAC
Fibra cruda (%)	Método No 993.21 de la AOAC

Porcentaje de humedad

El contenido de humedad se determinó por termogravimetría mediante un analizador halógeno de humedad (Modelo HB43-S, Mettler Toledo International Inc.). Alrededor de un gramo de muestra fue utilizado para cada medición, las cuales se realizaron por triplicado.

Determinación de la capacidad antioxidante (ORAC)

La capacidad antioxidante de las muestras de brócoli y los extractos obtenidos fue analizada por el método Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) por sus siglas en inglés reportado por (Álvarez et al., 2012, 775); por medio de este se mide la pérdida en la disminución de la fluoresceína ocasionada por el AAPH como fuente de radicales peróxilos (ROO^\cdot), esta disminución varía gracias a la acción de los antioxidantes presentes en la muestra quienes se encargan de brindar protección a la fluoresceína del

daño oxidativo. La intensidad de la fluoresceína se determinó en un lector de placas Synergy HT (Biotek Instruments Inc, USA) La curva de calibración se realizó empleando Trolox en concentraciones de 5, 10, 25, 50, 100, 150, 200 μM , en buffer fosfato pH 7,4 10Mm.

Para el análisis se aprovechó el extracto hidrofílico empleando diluciones (1:50; 1:100; 1:125) en buffer fosfato según el caso de cada una de las muestras permitiendo que los datos obtenidos ingresaran en la curva de calibración. En una microplaca de 96 pozos (Costar, USA) fueron adicionados en cada pozo y en estricto orden 150 μL de fluoresceína, 25 μL de dilución respectiva de trolox (5, 10, 25, 50, 100, 150, 200 μM) y 25 μL de muestra; el plato se pre incubó por 30 minutos a 37 $^{\circ}\text{C}$, después se adicionó a cada pozo la solución de AAPH y se midió la intensidad de fluorescencia cada dos minutos durante 120 minutos, con una onda de emisión de 485nm y excitación 520 nm, los resultados obtenidos se reportaron como micro moles equivalentes de Trolox por cada gramo de extracto ($\mu\text{mol TE/ g extracto}$). Todas las mediciones se realizaron por triplicado.

Contenido total de compuestos fenólicos:

El contenido total de compuestos fenólicos fue definido por el método Folin-Ciocalteau, una técnica aceptada en el ámbito internacional por la AOAC 1997; el principio del método se fundamenta en la reducción de los ácidos fosfomolibdico y fosfotungstico hasta un complejo elemental de molibdeno y tungsteno por acción de los compuestos fenólicos presentes en la muestra. Esto fue monitoreado en un espectrofotómetro lector de placas Synergy HT (Biotek Instruments Inc, USA). Para la curva de calibración se empleó ácido gálico (GAE) en concentraciones 10, 20, 40, 60,

80, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en agua destilada. Como muestras de análisis se emplearon diluciones 1:10 en agua destilada de los diferentes extractos obtenidos. En una microplaca de 96 pozos (Costar, USA) fueron adicionados en cada pozo y en estricto orden 225 μL de agua destilada, 30 μL de la dilución respectiva de estándar, 30 μL de muestra, 30 μL de solución de Na_2CO_3 y 15 μL de reactivo de folin 2N; el plato se guardó en la oscuridad durante 60 minutos y posteriormente se midió la absorbancia a 760nm, las mediciones se realizaron por triplicado y los resultados obtenidos se expresaron como equivalentes de ácido gálico GAE (mg/g).

Contenido de glucorafanina:

Para la determinación del contenido de glucorafanina se utilizó el método propuesto por (Baenas, Moreno, & García-Viguera, 2012, 11410) con algunas modificaciones; este método fue empleado para realizar una extracción inicial que permitió determinar el contenido de este glucosinolato en inflorescencias y hojas de brócoli. 100mg de muestra seca se mezclaron con 1.5 mL de metanol 700 g L^{-1} y se llevaron a un baño maría (Memmert GmbH + Co. KG, Alemania) a 70°C durante 30 minutos con agitación en vortex (Fisher pulse vortex mixer Modelo 945420, USA), cada 5 minutos durante 30 segundos a 3000 rpm para su posterior centrifugación en una centrífuga (Consul 21 R, Orto Alresa, México), durante 30 minutos a 4°C y 4000 rpm, después de esto se separó el sobrenadante y el solvente se evaporó en un rotoevaporador (R114 Buchi, Alemania), con un baño de agua (B-840, Buchi, Alemania), y con una bomba de vacío (R300, Boeco, Alemania), a 50 MPa, el material seco fue reconstituido en Agua – acetonitrilo (95:5) y pasado por un filtro de 0.22 μm (Filter Bio PTEF Syringe filter diámetro 13 mm) previo a la cuantificación por cromatografía.

Cromatografía líquida de alta resolución (UPLC)

Se dispuso de cromatografía líquida de alta resolución para la identificación y cuantificación de glucorafanina en la matriz vegetal de estudio, este análisis se llevó a cabo en un cromatógrafo líquido UPLC marca XEVO® (Waters, Milford, MA, EE.UU) acoplado a un espectro de masas con analizador triple cuádrupolo (TQD) y con una interface electro – Spray (ESI). El procedimiento fue similar al empleado en estudios previos de (Ares, Bernal, Nozal, Turner, & Plaza, 2015) con algunas modificaciones. La columna empleada fue (ACQUITY UPLC® CHS™ C18 1.7 μ M) C18 (2.1 x 100 mm x 1.7 μ m), la fase móvil empleada consistió en una mezcla de (A) ácido fórmico en agua (0.5% v/v) y (B) acetonitrilo, aplicado en un flujo de 0.3mL/min. El volumen de inyección de la muestra se fijó en 3 μ L y la temperatura de la columna se fijó en 50 °C con un corrido isocrático de 5 minutos con proporciones 95:5; las condiciones del estudio de MRM se definieron en ion precursor 436,0299 (M/Z), ion producto 1. 96,1702 (M/Z), ion producto 2. 177,9223 (M/Z), ion producto 3. 371,9523 (M/Z), voltaje del cono 100V, energía de colisión 24, 26 y 20V; las condiciones del espectro se fijaron en voltaje del capilar 2KV, voltaje del cono 51V, temperatura de desolvatación 200C, flujo del gas 650 L/hora, cono 0 L/H y temperatura de la fuente 150C.

Selección del solvente de extracción:

Se llevó a cabo la extracción de glucorafanina empleando como solvente diferentes proporciones de etanol y agua a diferentes pH definidas por dos diseños experimentales diferentes; cabe aclarar que todos los experimentos se realizaron de forma aleatoria en el orden entregado por el software Desing – Expert Version 6.0.1 y

Statgraphics Centurion 16.103. El plan experimental para diferentes proporciones de etanol – agua se presenta en la tabla 8.

Tabla 8. Proporciones de etanol – agua empleados para la extracción de Glucorafanina brindadas por el software Desing – Expert Version 6.0.1

Mezcla	Proporción etanol – agua
1	0 : 1
2	1 : 0
3	0.5 : 0.5
4	0.25 : 0.75
5	0.75 : 0.25
6	0 : 1
7	1 : 0
8	0.5 : 0.5
9	0 : 1

También se evaluó el efecto del agua a diferentes pH sobre la extracción de Glucorafanina, para esto se empleó un diseño unifactorial con tres factores por medio del software Statgraphics Centurion 16.103.

Proceso de extracción:

Durante el desarrollo de esta investigación se empleó el software Statgraphics Centurion 16.103 para generar y analizar un diseño experimental con superficie respuesta Box – Behnken que se presenta en la tabla 9. Con el cual se definieron las condiciones de operación del equipo de ultrasonido SB-300DTY (Serie DYT, Scientz, Ningbo – China) con el fin de establecer las condiciones ideales que permitieran obtener

extractos ricos en los compuestos de interés; las variables independientes potencia (120, 210, 300 W) y frecuencia (25, 40, 59 kHz) se definieron debido a las especificaciones técnicas del equipo, ya que este solo opera en dichas condiciones que son fijas y establecidas desde fabrica y no permiten alteración o modificación alguna. Para precisar el tiempo de extracción (5, 17 y 30 minutos) se utilizó el máximo de 30 minutos, tiempo que tarda una extracción de glucosinolatos como la empleada por (Francisco et al., 2009) las variables respuesta de este diseño son:

- ORAC ($\mu\text{mol TE/g}$)
- Polifenoles totales (mg GAE/g)
- Contenido de glucorafanina (mg de GRA/100g de material seco)

Tabla 9. Plan experimental para la optimización del proceso de extracción mediante un tanque sonicador.

Muestra	Potencia (w)	Frecuencia (kHz)	Tiempo (minutos)
1	210	40	17
2	210	25	30
3	210	25	5
4	121	40	5
5	210	59	30
6	300	59	17
7	121	40	30
8	121	25	17
9	300	40	30
10	210	40	17

11	210	40	17
12	121	59	17
13	210	59	5
14	300	25	17
15	300	40	5
16	210	40	17
17	210	25	30
18	210	25	5
19	121	40	5
20	210	59	30
21	300	59	17
22	121	40	30
23	121	25	17
24	300	40	30
25	210	40	17
26	210	40	17
27	121	59	17
28	210	59	5
29	300	25	17
30	300	40	5

Microencapsulación de los extractos:

Las condiciones empleadas para el proceso de secado por aspersión de los tres extractos obtenidos fueron similares a las reportadas por Wu et al. (2014, 498) Tian et al. (2015, 6). Para el desarrollo de la emulsión se emplearon agentes encapsulantes como la goma arábica (GomA) y gelatina (Gel) que previamente habían sido reportados por autores como Sánchez et al. (2016, 245) García-saldaña et al. (2016, 95) Wu et al.

(2014, 498), Adicionalmente, se agregó maltodextrina a la emulsión debido a que este agente encapsulante es de amplio uso en la industria gracias a su bajo costo en el mercado y a su capacidad para aumentar la cantidad de sólidos presentes sin representar un aumento significativo en la viscosidad, lo cual va a generar una alta solubilidad y humectabilidad del producto seco. (Yousefi, Emam-djomeh, Mousavi, Kobarfard, & Zbicinski, 2015, 467) El secado de los extractos se realizó en un equipo de secado en escala laboratorio (BÜCHI Mini Spray Dryer B 290).

Para definir la mezcla ideal de estos tres componentes (GomA, Maldx y Gel) se realizó el diseño de mezclas que se presenta en la tabla 10 obtenido por medio de software Desing – Expert Version 6.0.1 teniendo como variable respuesta la viscosidad de la emulsión previa al proceso de secado medida mediante un viscosímetro rotacional (Viscobasic Plus, España).

Tabla 10. Diseño de mezclas para la selección de una emulsión óptima.

Emulsión	Materiales	Porcentaje
<i>E 1</i>	GomA	1
<i>E 2</i>	Gel : GomA	0.25 : 0.75
<i>E 3</i>	Maldx	1
<i>E 4</i>	Maldx	1
<i>E 5</i>	Gel : Maldx	0.50 : 0.50
<i>E 6</i>	GomA	1
<i>E 7</i>	Gel : GomA	0.50 : 0.50
<i>E 8</i>	Gel : Maldx	0.25 : 0.75
<i>E 9</i>	Gel : GomA : Maldx	0.38 : 0.31 : 0.31

<i>E10</i>	Gel : Maldx	0.50 : 0.50
<i>E 11</i>	Gel : GomA : Maldx	0.25 : 0.56 : 0.19
<i>E 12</i>	GomA : Maldx	0.50 : 0.50
<i>E 13</i>	GomA : Maldx	0.50 : 0.50
<i>E 14</i>	Gel : GomA : Maldx	0.13 : 0.19 : 0.69

Todas las emulsiones se realizaron de forma aleatoria en el orden entregado por el software; cada uno de los agentes encapsulantes se disolvió por separado en agua des ionizada y de la formulación a 50 °C. La goma arábica se dejó hidratar durante una hora previa a la mezcla con los demás componentes de la emulsión, el extracto se agregó gota a gota cuando todos los agentes encapsulantes se encontraban disueltos y mezclados. Cada una de las emulsiones se sometió durante 5 minutos a 6000 rpm en un (Ultra Turrax T 50 Basic IKA WERKE,USA) evitando que esta sobrepasara los 50°C.

Finalmente, el análisis de los datos mediante el software Desing – Expert Version 6.0.1 permitió establecer las proporciones óptimas de cada uno de los agentes encapsulantes que se utilizaron para realizar una emulsión que se secó por medio del secador por aspersion, con un flujo de alimentación de 2 mL, un porcentaje de aspiración del 75%, temperatura de entrada del aire de 180 ± 5 °C y salida de 80 ± 5 °C. Durante todo el proceso la emulsión se protegió de la luz cubriendo el recipiente que la contenía con papel aluminio y se mantuvo con agitación magnética constante a una temperatura de 50°C para evitar su gelificación.

El producto obtenido se almacenó en bolsas de cierre hermético al interior de un empaque metalizado en un desecador con una humedad relativa del 19% y una temperatura de 25°C hasta su análisis.

Caracterización

El polvo obtenido se caracterizó por medio de la valoración del rendimiento del proceso de secado, la eficiencia de encapsulación, la actividad acuosa, el porcentaje de humedad, el tamaño de partícula y el potencial z. Dichos análisis se definen a continuación.

Rendimiento del proceso de secado

El rendimiento obtenido durante el proceso de secado se determinó por medio de la siguiente ecuación 1

Ecuación 1. Rendimiento del proceso de secado por aspersión

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{\text{Producto obtenido en el secado (g)}}{\text{Agentes encapsulantes (g)} + \text{Extracto (g)}} * 100$$

Eficiencia de encapsulación

Para determinar la eficiencia de encapsulación se tomaron 50 mg de cada una de las formulaciones desarrolladas a partir de la emulsión óptima (ver apartado de resultados) (F1: extracto ORAC, F2: Extracto compuestos fenólicos, F3: extracto GRA) se adicionaron 750µL de metanol frío (4°C) y se aplicó agitación mecánica durante 1 minuto a 3000 rpm en un vortex (Fisher Scientific, Estados Unidos), posteriormente la muestra se centrifugó a 8000 rpm durante 30 minutos a 4°C; se separó el sobrenadante (compuestos “libres” o no encapsulados) el precipitado resultante se sometió a una corriente de nitrógeno en vacío para evaporar residuos de metanol, posterior a esto se adicionó 1 mL de agua ultrapura y se aplicó agitación mecánica a 3000 rpm durante 2

minutos seguido de sonicación durante 3 minutos a 25 kHz, 120 W y 25°C en un ultrasonido SB-300DTY (Serie DYT, Scientz, Ningbo – China) después la muestra se centrifugó a 8000 rpm durante 20 minutos, se separó el sobrenadante y se filtró por medio de un filtro de nylon de 0,45µm, a partir del líquido obtenido se realizaron las diluciones pertinentes para cada uno de los análisis necesarios.

Actividad acuosa (aw)

Para determinar la actividad acuosa se empleó un AquaLab Serie 3 (Decagon Devices, Inc., Pullman, Estados Unidos), este equipo emplea un sensor de punto de rocío mediante la técnica del espejo enfriado y medición infrarroja de la temperatura de la muestra se determina el valor de Aw; para esto, se emplearon aproximadamente 2g de muestra y todas las mediciones se realizaron por triplicado.

Humedad

El contenido de humedad de cada una de las muestras se determinó por termogavimetría mediante un analizador halógeno de humedad (Modelo HB43 – S. Mettler Toledo International Inc.). Para esto se empleó el método de Bustos-Garza, Yáñez-Fernández, & Barragán-Huerta, (2013, 642). El analizador fue calentado con antelación, en él se dispuso de aproximadamente 1g de la muestra sobre un plato de aluminio previamente tarado para iniciar la medición de la humedad. Todas las mediciones se realizaron por triplicado para cada una de las muestras.

Tamaño de partícula

Se tomaron aproximadamente 10mg de muestra y se disolvieron en 1 mL de etilenglicol, luego se sometió a agitación mecánica a 3000 rpm durante 1 minuto en un vortex, (Fisher pulse vortex mixer Modelo 945420, USA) posteriormente, se adicionó la solución a la celda del analizador de partícula zeta/nano NanoPlus 3 (Micromeritics®, Estados Unidos), con el método de dispersión de luz dinámica. En las condiciones empleadas para la determinación del tamaño se empleó etilenglicol como diluyente con un índice de refracción 1,4318. Se realizaron tres repeticiones cada una con toma de 30 datos, los cuales fueron promediados

Potencial z

Se utilizó el analizador de partícula zeta/nano NanoPlus 3 (Micromeritics®, Estados Unidos) mediante el método de movilidad electroforética. Para la lectura, se emplearon se emplearon 100 mg de muestra disueltos en 1.5 mL de agua ultrapura (miliQ, 18,2 M Ω .cm), cada análisis se realizaron por triplicado.

Solubilidad.

Para determinar la solubilidad de las diferentes formulaciones obtenidas se empleó un método reportado por Cano-Chauca et al. (2005, 422). En un tubo cónico se agregaron 50 mL de agua y 1 gramo de producto seco (P1), esta mezcla se sometió a agitación en un vortex (Fisher pulse vortex mixer Modelo 945420, USA) durante 2

minutos y centrifugación a 3000 rpm durante 5 minutos; 25 mL del sobrenadante fueron vertidos en una caja de Petri previamente pesada y libre de humedad (P2), esta caja de Petri junto con la muestra fueron calentadas durante 5 horas en una estufa convectiva (MEMMERT UN55, Alemania) a una temperatura de 105°C subsiguiente a esto se registró el peso (P3). El porcentaje de solubilidad se determinó por medio de la ecuación 2.

Ecuación 2. Porcentaje de solubilidad.

$$\% \text{ solubilidad} = \frac{P2 - P3}{P1} * 100$$

Humectabilidad.

La humectabilidad se determinó por medio del método reportado por Westergaard, (2004, 209). 1 gramo de polvo fue depositado sobre la superficie de 100mL de agua contenida en un beaker de 200mL, se registró el tiempo que tardó en sumergirse el total de la muestra.

Contenido de compuestos bioactivos en el tiempo.

Cada 15 días y durante 60 días se determinó el contenido de compuestos fenólicos totales, glucorafanina y la capacidad antioxidante en cada una de las

formulaciones obtenidas, el contenido inicial de cada compuesto, es decir al tiempo que se obtuvieron los prototipos (día cero), se empleó como referente para determinar el contenido remanente de cada uno de los analitos; cada 15 días se tomaron 50mg de muestra y se llevó a cabo el procedimiento descrito anteriormente en la sección eficiencia de encapsulación.

Resultados

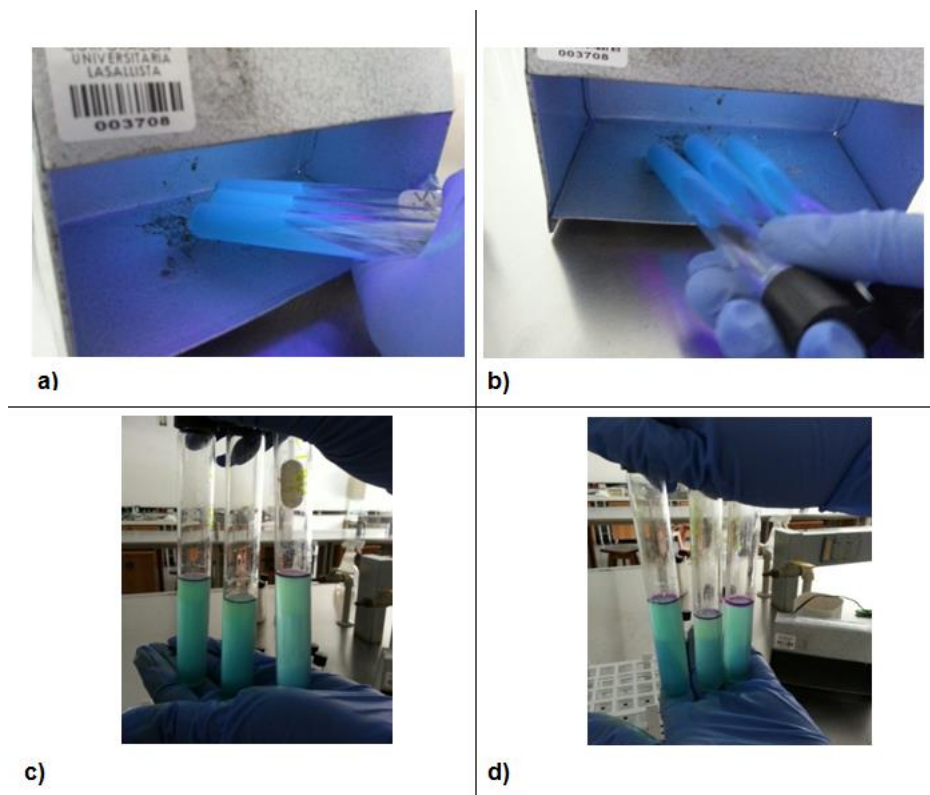
Caracterización microbiológica

Se llevó a cabo un análisis en fresco previo al proceso de limpieza y desinfección en el brócoli; para la lectura e interpretación del recuento de coliformes totales y fecales por el método del NMP, se emplearon diluciones 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} ; la prueba arrojó un resultado positivo para ambos casos y los resultados se presentan en la tabla 11; para confirmar este hecho se realizó la prueba indol a las diluciones y esta dio positiva para las diluciones 10^{-1} , y 10^{-2} . Esta prueba confirma la presencia de *Escherichia coli* (coliforme fecal) por medio de una coloración rojiza en la parte superior del tubo como se evidencia en la figura 10. Los resultados obtenidos se presentan bajo criterio de la Norma técnica Colombiana (ICONTEC, 2009).

Tabla 11. Reporte de resultados recuento de coliformes totales y fecales por el método NMP para brócoli fresco sin desinfectar.

Análisis	Dilución			Resultado NMP/ g ó (UFC/g)
	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	
NMP de Coliformes totales hojas	3	3	1	500
NMP de Coliformes fecales Inflorescencias	3	3	0	200

Figura 10. Resultados presencia de coliformes totales y fecales en muestras de brócoli fresco sin desinfectar

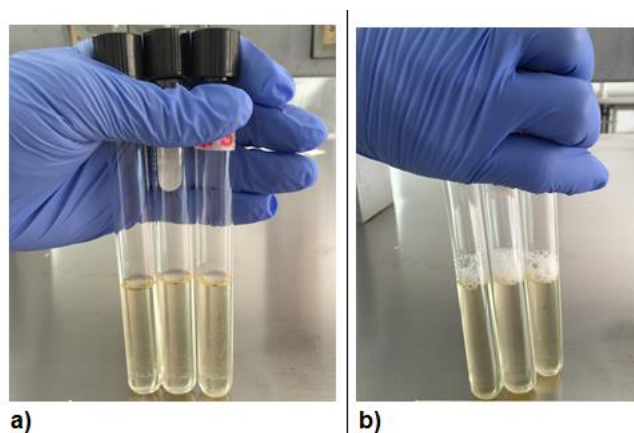


a. Hojas de brócoli con fluorescencia, b. inflorescencias de brócoli con fluorescencia, c. hojas de brócoli resultado prueba indol, d. inflorescencias de brócoli resultado prueba indol.

Recuento de coliformes por el método del número más probable (NMP) empleando como medios de cultivo Fluorocult LMX y Chromocult para brócoli seco desinfectado

Posterior al proceso de limpieza, desinfección, secado y molienda se tomó de nuevo una muestra para llevar a cabo un nuevo análisis microbiológico, este análisis confirmó la efectividad del proceso de limpieza y desinfección puesto que no hubo crecimiento de microorganismos en los diferentes medios de cultivo empleados (figura 11). La tabla 12 presenta los resultados obtenidos para este análisis.

Figura 11. Resultados caldo LMX para hojas e inflorescencias de brócoli seco desinfectado.



a. Recuento de coliformes para hojas de brócoli, b. recuento de coliformes para inflorescencias de brócoli.

Tabla 12. Reporte de resultados Recuento de coliformes totales y fecales por el método NMP para brócoli seco desinfectado.

Análisis	Dilución			Resultado NMP/ g ó (UFC/g)	Límite permisible
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³		
NMP de Coliformes totales	0	0	0	<3	<10 UFC/g
NMP de Coliformes fecales	0	0	0	<3	<10 UFC/g

Por medio del agar Chromocult que contiene mezcla de peptonas, piruvato, sorbitol y buffer de fosfato que garantizan el rápido crecimiento de las colonias aún de los coliformes subletalmente dañados, se evaluó también la eficacia del proceso de desinfección, los resultados obtenidos se presentan en la tabla 13 y la figura 12 presenta información visual de los resultados obtenidos.

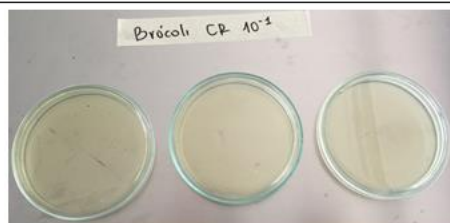
Tabla 13. Reporte de resultados Recuento de coliformes totales y fecales en placa por extensión de superficie.

Análisis	Dilución			Resultado NMP/ g ó (UFC/g)	Límite Permisible
	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}		
Coliformes fecales en placa	0	0	0	<3	<10 UFC/g
Coliformes no fecales	0	0	0	<3	<10 UFC/g
Coliformes totales en placa	0	0	0	<3	<10 UFC/g

Figura 12. Resultados de Chromocult para hojas e inflorescencias de brócoli desinfectado.



a)



b)

- a. Resultado para hojas de brócoli, b. resultado para inflorescencias de brócoli.

Recuento de aerobios mesófilos en alimentos (RAM)

Se llevó a cabo el análisis de mesófilos aerobios en alimentos (RAM), este método es uno de los indicadores de calidad de mayor uso en la industria de alimentos; para las muestras de inflorescencias y hojas de brócoli seco y desinfectado analizado el resultado es <10 UFC/ g o mL de brócoli, ya que no se presentaron colonias en los platos de cultivo como se evidencia en la figura 13. El límite permisible para el recuento de mesófilos en este alimento es de 200000UFC/g

Figura 13. Resultados para plate count en inflorescencias y hojas de brócoli desinfectado.



a)



b)

- a. Resultado para mesófilos en hojas de brócoli, b. resultado para mesófilos en inflorescencias de brócoli.

Caracterización bromatológica

Esta caracterización fue realizada sobre el polvo seco de inflorescencias y hojas para llevar a cabo cada uno de los análisis, los resultados se presentan en la tabla 14.

Tabla 14. Resultado de análisis bromatológicos.

Resultado análisis bromatológicos para inflorescencias de brócoli

Análisis	Resultado
Extracto etéreo (%)	0,018
Proteína (%)	0,22
Cenizas (%)	8,94
Fibra cruda (%)	17,34
Humedad en fresco (%)	89,90
Humedad después del secado (%)	12,50
Polifenoles totales (mg GAE/100g)	0,76
Capacidad Antioxidante ($\mu\text{mol TE/g}$)	11,85
Resultado análisis bromatológicos para hojas de brócoli	
Análisis	Resultado
Extracto etéreo (%)	0,016
Proteína (%)	23,01
Cenizas (%)	12,75
Fibra cruda (%)	14,80
Humedad en fresco (%)	79,80
Humedad después del secado (%)	9,40
Polifenoles totales (mg GAE/100g)	204,62
Capacidad Antioxidante ($\mu\text{mol TE/g}$)	2769,40

El contenido de glucorafanina fue evaluado tanto en hojas como en inflorescencias, los resultados obtenidos determinaron la selección de hojas de brócoli para el desarrollo del presente trabajo investigativo; el resultado para hojas es de 164,23 mg/100g de materia seca e inflorescencias 69,75 mg/100g de materia seca, datos similares a los reportados por Bernal et al. (2014, 73) Quienes determinaron que las hojas de brócoli pueden ser fuente potencial en el contenido de algunos glucosinolatos como la glucorafanina.

Selección del solvente

La tabla 15 muestra el plan experimental y resultados de las diferentes extracciones realizadas a partir de hojas de brócoli.

Tabla 15. Concentración de Glucorafanina, empleando agua a diferentes pH para la extracción a partir de hojas de brócoli.

Experimento	pH	Glucorafanina mg GRA/100DW
1	9	10,5
2	3	7,8
3	3	7,95
4	9	10,5
5	7	12
6	7	12,6

El análisis de varianza (ANOVA) (Tabla 16) para la variable respuesta concentración de Glucorafanina (mg GRA/100g material seco) realizado en el software Statgraphics Centurion XV; permitió evidenciar que existen diferencias estadísticamente

significativas entre cada uno de los niveles del factor ($p < 0,05$) con un nivel del 95% de confianza, por tal razón se decidió emplear agua a pH 7 para las extracciones durante el desarrollo de este trabajo de investigación, ya que esta permite una mayor concentración de GRA en el extracto final.

Tabla 16. Análisis de varianza (ANOVA) para la concentración de GRA en extractos obtenidos empleando agua des ionizada a pH 3, 7 y 9 a partir de hojas de brócoli.

Fuente	Suma de cuadrados	GI	Cuadrado	Razon F	Valor P
<i>pH</i>	19,8075	2	9,90375	155,35	0,0009
<i>Error</i>	0,19126	3	0,06375		
<i>Total</i> <i>(Corr.)</i>	19,9988	5			

El nivel más bajo de glucorafanina se dio en la extracción con agua pH 3, esto se debe a que un bajo pH induce altas pérdidas de glucosinolatos (Pérdida de 69%), mientras que los compuestos fenólicos y vitamina C son más estables (Vallejo, Gil-Izquierdo, Pérez-Vicente, & García-Viguera, 2004, 137). No solo la acción de la mirosinasa es responsable de la degradación de los glucosinolatos, cuando se tienen bajos niveles de pH estas pérdidas pueden ser significativas, en el brócoli la pérdida de glucosinolatos alifáticos representa cerca del 27%, el 73% restante corresponde a glucosinolatos de naturaleza indólica (Latté et al., 2011, 3290), la Glucorafanina es un glucosinolatos de naturaleza indólica.

También se evaluó el efecto de la mezcla de etanol y agua por medio de un diseño de mezclas que permitió establecer las condiciones ideales para la extracción de glucorafanina con etanol; como se evidencia en la tabla 17 cuando se emplea agua como solvente para la extracción, la concentración de glucorafanina obtenida es mucho menor a la obtenida cuando se emplean diversas proporciones de agua y etanol. La literatura reporta la extracción de glucorafanina con metanol empleando temperaturas de 70°C, sin embargo, en la mayoría de los casos la extracción de compuestos fenólicos esta mediada por una mezcla (50% v/v) de etanol con una solución buffer de pH 7.4 (Gawlik-Dziki et al., 2012, 470), los resultados obtenidos bajo este diseño experimental y que se muestran en la tabla 17, permitieron determinar la mezcla optima (50% v/v) para realizar la extracción de glucorafanina, no obstante, debido al interés de desarrollar un producto de amplia aplicación en la industria de alimentos y de fácil secado por un sistema de aspersion se decidió utilizar agua como único solvente.

Tabla 17. Concentración de Glucorafanina, empleando agua a diferentes pH para la extracción a partir de hojas de brócoli.

<i>Experimento</i>	<i>Agua</i>	<i>Etanol</i>	<i>mg GRA/100g</i>
1	50	50	94,59
2	75	25	36,56
3	100	0	12,6
4	0	100	68,95
5	0	100	71,17
6	100	0	13,45
7	100	0	12,59
8	50	50	106,06
9	25	75	71,9

En el análisis de varianza (Tabla 18) los valores de “Prob>F” inferiores a 0,05 indican que los términos del modelo son significativos, en este caso las proporciones de la mezcla son significativas en términos del modelo cuadrático para la concentración de glucorafanina (mg/100 g de material seco). Los valores superiores a 0,1 indican que los términos del modelo no son significativos.

Tabla 18. Análisis de varianza para la concentración de glucorafanina obtenida a partir de hojas de brócoli y empleando diferentes proporciones de etanol y agua como solvente

Fuente	Suma de cuadrados	DF	Cuadrado medio	Valor F	Prob > F
Modelo	9241,512803	2	4620,756402	20,8170944	0.0020
Mezcla lineal	5576,830351	1	5576,830351	25,124329	0.0024
AB	3664,682452	1	3664,682452	16,5098598	0.0066
Residual	1331,815952	6	221,9693254		
Error	68,73205	4	17,1830125		
Total	10573,32876	8			

Condiciones de extracción con ultrasonido

Box – Behnken BBD es un diseño de experimentos tipo superficie respuesta que se emplea para proveer información que permita entender las variables que afectan la salida de un modelo (Bernal et al., 2014, 70). Gracias a este tipo de diseños se emplea una metodología superficie respuesta esférica que consta de un punto central y varios

puntos medios de los bordes de un cubo superpuesta a la esfera (Ding, Zheng, Xia, Ren, & Kan, 2016, 207). Las superficies de respuesta se exploran para determinar la combinación de niveles de los factores que proporcionan una condición operativa óptima (Kuehl, 2001, 424), como lo son los niveles óptimos de frecuencia, potencia y tiempo que permitan la obtención de cada uno de los compuestos de interés; diversos autores reportan el uso de estos diseños experimentales para realizar la selección de un solvente ideal que permita la extracción de glucosinolatos, Bernal et al. (2014, 70) reportan el uso de un BBD para seleccionar el solvente idóneo que permita la extracción de glucosinolatos en hojas de brócoli. Estos diseños requieren de un menor número de experimentos en comparación con otros diseños estadísticos (Espada-Bellido et al., 2017, 26).

Obtención de un extracto con alta capacidad antioxidante ORAC

Para la evaluación de la variable capacidad antioxidante ORAC las mejores condiciones de extracción fueron 300 W de potencia, 59 kHz de frecuencia durante 8,7 minutos, valores que se evidencian en el gráfico presentado en la figura 14. Un modelo logarítmico se empleó para acoplar los datos, la ecuación de regresión que se ajusta a los datos se presenta en la ecuación 3 y los valores de las variables están especificados en sus unidades originales, los resultados obtenidos para cada uno de los 30 experimentos se presentan en la tabla 19.

Ecuación 3. Ecuación de regresión que se ha ajustado a los datos para la optimización de las condiciones de obtención de un extracto con un valor alto para ORAC a partir de hojas de brócoli.

$$\begin{aligned} \text{Log (ORAC)} = & 5,82053 - 0,0127579 * \text{Potencia} - 0,02562 * \text{Frecuencia} + 0,0491554 \\ & * \text{tiempo} + 0,0000368743 * \text{Potencia}^2 - 0,00000410978 * \text{Potencia} \\ & * \text{Frecuencia} - 0,000145697 * \text{Potencia} * \text{tiempo} + 0,00032144 \\ & * \text{Frecuencia}^2 + 0,000193891 * \text{Frecuencia} * \text{tiempo} - 0,000963508 \\ & * \text{tiempo}^2 \end{aligned}$$

Tabla 19. Planes experimentales y resultados para las extracciones con ultrasonido

Experimento	Potencia	Frecuencia	tiempo	ORAC	Polifenoles totales	Glucorafanina
	w	kHz	min	$\mu\text{mol TE / g}$	mg GAE / g	mg Glucorafanina/100g
1	210	40	17	$73,08 \pm 1,95$	$5,81 \pm 0,37$	$12,89 \pm 0,00$
2	210	25	30	$59,87 \pm 1,33$	$5,57 \pm 0,05$	$12,75 \pm 0,12$
3	210	25	5	$78,31 \pm 1,27$	$4,5 \pm 0,01$	$9,66 \pm 0,12$
4	120	40	5	$68,99 \pm 1,51$	$2,98 \pm 0,09$	$10,83 \pm 0,12$
5	210	59	30	$85,48 \pm 1,45$	$3,53 \pm 0,14$	$11,42 \pm 0,20$
6	300	59	17	$133,3 \pm 2,49$	$4,26 \pm 0,11$	$16,88 \pm 0,12$
7	120	40	30	$97,66 \pm 5,09$	$2,97 \pm 0,10$	$16,76 \pm 0,10$
8	120	25	17	$133,91 \pm 4,01$	$3,86 \pm 0,02$	$14,19 \pm 0,00$
9	300	40	30	$77,47 \pm 2,67$	$4,32 \pm 0,16$	$13,57 \pm 0,19$
10	210	40	17	$66,73 \pm 0,54$	$5,67 \pm 0,05$	$13,95 \pm 1,16$
11	210	40	17	$91,72 \pm 7,84$	$5,95 \pm 0,18$	$13,93 \pm 0,23$
12	120	59	17	$131,89 \pm 2,79$	$5,42 \pm 0,07$	$18,4 \pm 0,12$
13	210	59	5	$102,68 \pm 1,59$	$6,71 \pm 0,14$	$15,15 \pm 0,00$

14	300	25	17	122,21 ± 0,33	5,03 ± 0,49	20,05 ± 0,00
15	300	40	5	141,48 ± 1,29	3,57 ± 0,20	18,38 ± 0,19
16	210	40	17	85,17 ± 0,08	4,91 ± 0,30	12,84 ± 0,23
17	210	25	30	60,91 ± 10,31	4,88 ± 0,32	17,21 ± 0,25
18	210	25	5	86,47 ± 2,41	4,62 ± 0,36	9,65 ± 0,12
19	120	40	5	93,96 ± 0,20	3,72 ± 0,24	12,73 ± 0,00
20	210	59	30	70,25 ± 0,49	4,18 ± 0,02	13,92 ± 0,21
21	300	59	17	110,02 ± 1,70	2,74 ± 0,15	16,92 ± 0,12
22	120	40	30	97,79 ± 0,19	4,16 ± 0,36	16,76 ± 0,1
23	120	25	17	106,16 ± 2,19	3,23 ± 0,32	14,19 ± 0,12
24	300	40	30	77,79 ± 1,98	3,78 ± 0,1	13,57 ± 0,35
25	210	40	17	92,12 ± 1,13	4,97 ± 0,01	14,53 ± 0,12
26	210	40	17	79,02 ± 6,23	4,61 ± 0,15	14,52 ± 0,12
27	120	59	17	131,91 ± 2,79	5,43 ± 0,10	20,7 ± 0,12
28	210	59	5	76,75 ± 2,23	5,81 ± 0,39	16,04 ± 0,25
29	300	25	17	98,43 ± 1,19	5,9 ± 0,17	16,94 ± 0,12

30	300	40	5	$109 \pm 0,39$	$5,37 \pm 0,26$	$16,94 \pm 0,10$
----	-----	----	---	----------------	-----------------	------------------

El análisis estadístico se realizó mediante el software Statgraphics Centurion XV, se evaluó el efecto de la potencia, frecuencia, tiempo de extracción y la interacción entre ellas obteniendo las condiciones de operación para el equipo con un nivel de confianza del 95%, la prueba de ajuste que se evidencia en la tabla 20 presenta un valor mayor a 0,05 lo que indica que el modelo seleccionado se ajusta a los datos experimentales.

El análisis de varianza (tabla 20) permitió establecer la variabilidad de la variable respuesta, en este caso 4 efectos tiempo, interacción potencia – potencia, potencia – tiempo y tiempo – tiempo tienen un valor $p < 0,05$ por lo cual se puede afirmar que estos tienen un efecto estadísticamente significativo sobre la variable respuesta con un nivel de confianza del 95%.

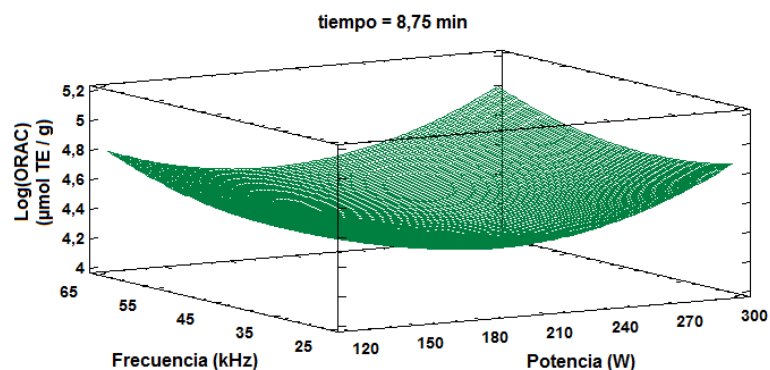
Tabla 20. Análisis de varianza para el efecto de cada una de las variables de extracción sobre la capacidad antioxidante ORAC de un extracto por medio de ultrasonido.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Potencia	0,00000625611	1	0,00000625611	0,00	0,9852
B:Frecuencia	0,0706737	1	0,0706737	4,00	0,0618
C:tiempo	0,122373	1	0,122373	6,92	0,0175
AA	0,658785	1	0,658785	37,28	0,0000
AB	0,000318496	1	0,000318496	0,02	0,8948
AC	0,2151	1	0,2151	12,17	0,0028
BB	0,0615818	1	0,0615818	3,48	0,0793
BC	0,0136856	1	0,0136856	0,77	0,3911
CC	0,166712	1	0,166712	9,43	0,0069

Falta de ajuste	0,051826	3	0,0172753	0,98	0,4264
Error puro	0,300419	17	0,0176717		
Total (corr.)	1,73063	29			

Es necesario mencionar que la capacidad antioxidante de un extracto es una función que depende de la concentración de compuestos bioactivos con poder antioxidante contenidos en el mismo, en este sentido, el tiempo para la obtención de un extracto con alta capacidad antioxidante es acorde para evitar la degradación de algunas vitaminas como la vitamina C, si tenemos en cuenta el efecto que tiene la sonicación en el tiempo sobre la temperatura, Pongmalai et al. (2016, 41) reportaron el incremento en el contenido de vitamina C durante los primeros 15 minutos de una extracción asistida con ultrasonido para glucosinolatos de coles frescas, posterior a estos 15 minutos el contenido se estabilizó y solo comenzó a disminuir cuando la mezcla alcanzó una temperatura cercana a los 63°C.

Figura 14. Gráfica de superficie de respuesta para el diseño aplicado a la obtención de un extracto con alta capacidad antioxidante ORAC a partir de hojas de brócoli.



Obtención de un extracto rico en compuestos fenólicos

Los resultados obtenidos después del plan experimental y mostrados en la tabla 19 junto con el análisis de varianza presente en la tabla 21, permitieron determinar el efecto de las variables y las posibles interacciones entre ellas, además permitieron evaluar la significancia del modelo estadístico. Así, se pudo evidenciar que 5 tipos de tratamientos ($p < 0,05$) tiempo y las interacciones Potencia – potencia, potencia – frecuencia, frecuencia – tiempo y tiempo - tiempo presentan diferencias estadísticamente significativas con un nivel de confianza del 95%; la prueba de falta de ajuste evidente en la tabla 21, presenta un valor mayor a 0,05 lo que indica que el modelo seleccionado se ajusta a los datos experimentales.

Tabla 21. Análisis de varianza para la variabilidad en la concentración de polifenoles totales.

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Potencia	0,308471	1	0,308471	0,76	0,3953
B:Frecuencia	0,00359032	1	0,00359032	0,01	0,9261
C:tiempo	1,32835	1	1,32835	3,27	0,0881
AA	7,06453	1	7,06453	17,42	0,0006
AB	7,71289	1	7,71289	19,02	0,0004
AC	0,187127	1	0,187127	0,46	0,5061
BB	0,136512	1	0,136512	0,34	0,5694
BC	4,92948	1	4,92948	12,15	0,0028
CC	1,66685	1	1,66685	4,11	0,0586
Falta de ajuste	0,762306	3	0,254102	0,63	0,6077
Error puro	6,8955	17	0,405618		
Total (corr.)	30,8145	29			

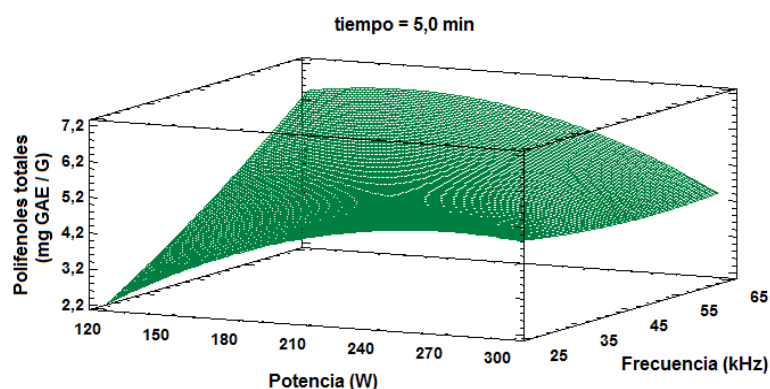
Con un R cuadrado de 75,15% que explica la variabilidad en el contenido de polifenoles totales en cada uno de los extractos obtenidos, se determinaron las condiciones óptimas para la extracción de estos compuestos empleando como técnica el ultrasonido a 178 w, 59 kHz y 5 minutos y agua desionizada como solvente (figura 15), estas condiciones no estaban planteadas en el primer diseño por lo que el valor optimo fue verificado por medio del ensayo de un proceso de extracción bajo estas condiciones, el resultado obtenido $6,42 \pm 1,3$ (mg GEA / g de material seco) fue cercano al valor óptimo brindado por el software 6,18 (mg GAE / g de material seco) y el coeficiente de variación obtenido es del 2,70%.

Al comparar el tiempo de extracción obtenido como ideal con estudios realizados por otros autores, se puede evidenciar que el tiempo logrado en este caso es inferior a otros tiempos reportados en la literatura. Espada-Bellido et al. (2017, 30) evaluaron una cinética de extracción para determinar el tiempo óptimo que permitiera la extracción de compuestos fenólicos a partir de mora, luego de evaluar diferentes momentos encontraron que 10 minutos es el tiempo ideal para realizar una extracción asistida por ultrasonido cuantitativa. Los mismos autores reportan que tiempos de extracción más largos conducen a menor recuperación y esto se debe a la degradación de los compuestos fenólicos, sin embargo, dichos autores también resaltan el efecto de la temperatura en la obtención de estos analitos. La extracción asistida con ultrasonido usando como solvente Metanol en agua y pH 7 (61%v/v) a una temperatura de 64°C y amplitud de ultrasonido del 70% son consideradas las condiciones óptimas por el autor.

El resultado obtenido para el factor potencia 178 W (Figura 15) es un valor que podría considerarse bajo si se tiene presente que el máximo permitido por el baño

sonicador es 300 W, este resultado es similar al reportado por Oniszczuk & Olech. (2016, 362) quienes emplearon 100 W de potencia para la extracción de compuestos fenólicos a partir de *Brassica oleracea L. var. Sabellica* (Col rizada); estos autores también argumentan que el uso de una frecuencia relativamente baja (20kHz) y un tiempo de extracción corto podría limitar la degradación de los compuestos fenólicos durante la extracción, por lo tanto, es posible el uso de cortos periodos de tiempo para la obtención de estos compuestos.

Figura 15. Gráfica de superficie de respuesta para el diseño aplicado a la obtención de un extracto con alto contenido de polifenoles a partir de hojas de brócoli.



A continuación, en la ecuación 4 se presenta la ecuación de regresión que se ajusta al modelo de los datos.

Ecuación 4. Ecuación de regresión ajustada a los datos para concentración de polifenoles totales presente en extractos a partir de residuos de cosecha de brócoli.

Polifenoles totales

$$\begin{aligned}
 &= -8,90364 + 0,0815038 * \text{Potencia} + 0,159383 * \text{Frecuencia} \\
 &+ 0,266592 * \text{tiempo} - 0,000120752 * \text{Potencia}^2 - 0,000639552 \\
 &* \text{Potencia} * \text{Frecuencia} - 0,000135893 * \text{Potencia} * \text{tiempo} \\
 &+ 0,000478586 * \text{Frecuencia}^2 - 0,00367982 * \text{Frecuencia} * \text{tiempo} \\
 &- 0,00304663 * \text{tiempo}^2
 \end{aligned}$$

Obtención de un extracto rico en glucorafanina.

Durante la evaluación de la variable contenido de glucorafanina expresada como (mg de GRA/100 g de hojas secas), se determinaron los valores óptimos que permitieron la obtención de un extracto rico en glucorafanina en el tanque sonicador con 120 W de potencia, 59 kHz de frecuencia durante 20 minutos, estos se evidencian en la figura 16, como se mencionó en la obtención de un extracto rico en compuestos fenólicos se realizó una nueva extracción para verificar el cumplimiento de las nuevas condiciones. El resultado obtenido $17,63 \pm 2,43$ (mg de GRA/100 g de hojas secas) fue cercano al valor óptimo 19,58 (mg de GRA/100 g de hojas secas) brindado por el software y el coeficiente de variación obtenido fue de 7,41%, los resultados obtenidos para cada uno de los 30 experimentos se presentan en la tabla 19.

La ecuación de regresión que se ajusta a los datos se presenta en la ecuación 5 y los valores de las variables están especificados en sus unidades originales.

Ecuación 5. Ecuación de regresión ajustada a los datos para la optimización de las condiciones de obtención de un extracto rico en GRA a partir de excedentes de cosecha del brócoli.

$$\begin{aligned} \text{GRA} = & 2,09339 - 0,0476255 * \text{Potencia} + 0,226922 * \text{Frecuencia} + 1,17462 * \text{tiempo} \\ & + 0,000321917 * \text{Potencia}^2 - 0,00114197 * \text{Potencia} * \text{Frecuencia} \\ & - 0,002013 * \text{Potencia} * \text{tiempo} + 0,00275804 * \text{Frecuencia}^2 \\ & - 0,00953098 * \text{Frecuencia} * \text{tiempo} - 0,00937762 * \text{tiempo}^2 \end{aligned}$$

El análisis de varianza ANOVA (Tabla 22) permitió determinar la variabilidad de GRA en piezas separadas para cada uno de los efectos, entonces prueba la significancia estadística de cada efecto comparando su cuadrado medio contra el error estimado experimental; en este caso se evidenció que 6 efectos tienen un valor ($p < 0,05$) lo que indica que estos tienen diferencias estadísticamente significativas bajo un nivel de confianza del 95% el valor R cuadrado indica que el modelo ajustado explica en un porcentaje superior al 87,35% la variabilidad en la concentración de GRA y la prueba de falta de ajuste superior al 0,05 lo que indica que el modelo empleado se ajusta a los datos experimentales.

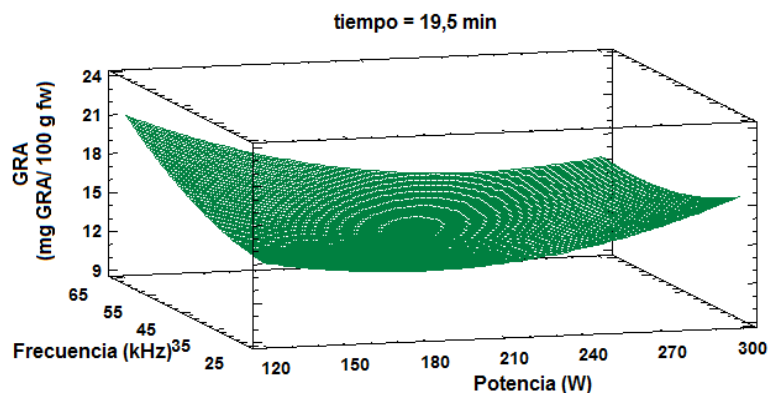
Tabla 22. Análisis de varianza para la variabilidad en la concentración de GRA.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Potencia	2,47806	1	2,47806	1,58	0,2255
B:Frecuencia	12,4897	1	12,4897	7,97	0,0117
C:tiempo	1,35597	1	1,35597	0,87	0,3652

AA	50,2092	1	50,2092	32,06	0,0000
AB	24,5908	1	24,5908	15,70	0,0010
AC	41,0608	1	41,0608	26,21	0,0001
BB	4,53371	1	4,53371	2,89	0,1071
BC	33,0691	1	33,0691	21,11	0,0003
CC	15,7922	1	15,7922	10,08	0,0055
Falta de ajuste	1,62003	3	0,54001	0,34	0,7933
Error puro	26,6277	17	1,56633		
Total (corr.)	223,388	29			

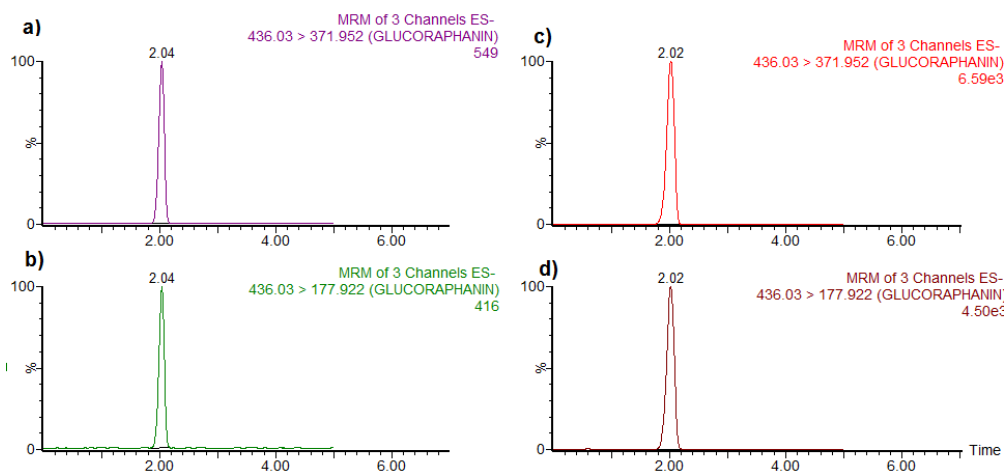
Diversos autores reportan el efecto que tiene la sonicación sobre el aumento en la temperatura que se debe a la energía liberada por el colapso de las burbujas durante el proceso (Pongmalai, Devahastin, Chiewchan, & Soponronnarit, 2015, 40). Estos autores también evaluaron la evolución de la temperatura durante el proceso de extracción de glucosinolatos a partir de hojas de coles en etanol durante la sonicación, en el experimento la temperatura inicial del proceso fue de 25°C, igual a la empleada en este trabajo de investigación, la temperatura de la mezcla se incrementó con el tiempo de sonicación hasta llegar a aproximadamente 57 ° C cuando la sonicación se realizó durante 40 min (Pongmalai et al., 2015, 40). Para el caso de esta investigación la temperatura máxima registrada durante los 20 minutos de sonicación asciende hasta los 37 °C.

Figura 16. Gráfica de superficie de respuesta para el diseño aplicado a la obtención de un extracto rico en GRA a partir de hojas de brócoli.



La figura 17 presenta los cromatogramas obtenidos para el estándar de glucorafanina (figura 17.a) (figura 17.b) y muestras (figura 17.c) (figura 17.d). Al comparar los tiempos de retención se evidencia que estos son similares entre las muestras y el estándar de referencia, por tanto esta imagen sirve para confirmar la presencia de este glucosinolato en los diferentes extractos obtenidos durante el desarrollo del plan experimental que permitió definir las condiciones ideales de operación del tanque sonicador.

Figura 17. cromatogramas obtenidos por UPLC para (a) (b) estándar de GRA y (c) (d) muestras obtenidas a partir de diferentes condiciones de sonicación programadas por el plan experimental relacionado en el apartado proceso de extracción.



Previo al proceso de secado se realizaron tres nuevos procesos de extracción empleando las condiciones obtenidas en el apartado proceso de extracción para cada una de las variables respuesta (Extracto: 1 ORAC, extracto 2: compuestos fenólicos, extracto 3: glucorafanina), estos procesos de extracción se llevaron a cabo con el fin de obtener las cantidades de extractos necesarios durante el proceso de secado; para ello se procedió con un escalado en el cual se conservó la proporción muestra: solvente, (50mg de muestra por cada 1,5mL de agua), este escalado se llevó a cabo en tubos cónicos de 45mL, en él se dispuso de 2000mg de hojas de brócoli en polvo y 30mL de agua para realizar la extracción.

La eficacia del proceso de extracción se determinó tomando como referente el valor inicial determinado durante la caracterización de las hojas de brócoli en cuanto al contenido glucorafanina, la eficiencia obtenida durante un ciclo de extracción en el

tanque sonicador a 120 W de potencia, 59 kHz de frecuencia durante 20 minutos fue de 36,63%

Microencapsulación de los diferentes extractos empleando secado por aspersión

Secado de los extractos:

La tabla 23 presenta los resultados experimentales obtenidos durante la ejecución del diseño propuesto para la selección de una emulsión óptima que permitiera el secado de los extractos resultantes en el apartado de extracción.

Tabla 23. Resultados experimentales diseño de mezclas para la selección de una emulsión óptima.

Emulsión	Gelatina	Goma arábica	Maltodextrina	Viscosidad (cPs)
E1	0,00	1,00	0,00	180,3 ± 3,6
E2	0,25	0,75	0,00	265,8 ± 10,4
E3	0,00	0,00	1,00	34,5 ± 0,9
E4	0,00	0,00	1,00	35,1 ± 0,78
E5	0,50	0,00	0,50	232,7 ± 2,56
E6	0,00	1,00	0,00	182,4 ± 3,4
E7	0,50	0,50	0,00	267,45 ± 4,40
E8	0,25	0,00	0,75	189,3 ± 2,4
E9	0,38	0,31	0,31	242,4 ± 5,52
E10	0,50	0,00	0,50	195,4 ± 5,47
E11	0,25	0,56	0,19	267,4 ± 2,7
E12	0,00	0,50	0,50	196,5 ± 2,6

E13	0,00	0,50	0,50	197,2 ± 1,76
E14	0,13	0,19	0,69	234,6 ± 2,86

En el análisis de varianza ANOVA de la tabla 24, los valores de “Prob>F” inferiores a 0,05 indican que los términos del modelo son significativos, en este caso, los componentes de la mezcla son significativos en términos del modelo cuadrático para el caso de viscosidad. Los valores superiores a 0,1 indican que los términos del modelo no son significativos

Tabla 24. Análisis de varianza para la variable viscosidad

Fuente	suma de cuadros	DF	Cuadrado medio	Valor F	Prob > F
Modelo	68544,72054	5	13708,94411	27,89190875	< 0.0001
Mezcla	48534,06848	2	24267,03424	49,373161	< 0.0001
lineal					
AB	5782,253303	1	5782,253303	11,76444227	0.0090
AC	6758,532493	1	6758,532493	13,75075791	0.0060
BC	11714,43592	1	11714,43592	23,83392734	0.0012
Residual	3932,020352	8	491,502544		
Falta de ajuste	3233,745352	4	808,4363381	4,631048444	0.0834
Error	698,275	4	174,56875		
Total	72476,74089	13			

Finalmente, el diseño D – optimal facultó establecer las proporciones ideales presentes en la tabla 25, que permitieron obtener una emulsión óptima para el proceso de secado por aspersión. Estas condiciones son relevantes puesto que la información

existente en la literatura para la microencapsulación de GRA es poca, por tal razón serían unas condiciones pioneras para la obtención de prototipos intermediarios enriquecidos aplicables a matrices alimentarias.

Tabla 25. Proporciones optimas de gelatina, goma arábica y maltodextrina.

Componente	Nivel (%)	Nivel mínimo	Nivel máximo
Gelatina	0,25	0	0,5
Goma arábica	0,375	0	1
Maltodextrina	0,375	0	1
Total	1		

Teniendo definidas estas proporciones, fue posible desarrollar la formulación de la emulsión a secar, en ella se fijó el porcentaje de sólidos y agua en 70% y 30% respectivamente; también se determinó la cantidad de sólidos en el extracto 3^oBx y a partir de esta concentración de sólidos se determinó la cantidad en gramos del extracto a incorporar en la emulsión, la tabla 26 presenta la formulación empleada para la obtención de la emulsión a secar.

Tabla 26. Formulación de la emulsión empleada para la obtención de prototipos intermediarios enriquecidos aplicables a matrices alimentarias.

Componente	Gramos
Agua	119
Goma arábica	19,38
Gelatina	7,65
Maltodextrina	19,38
Extracto	30

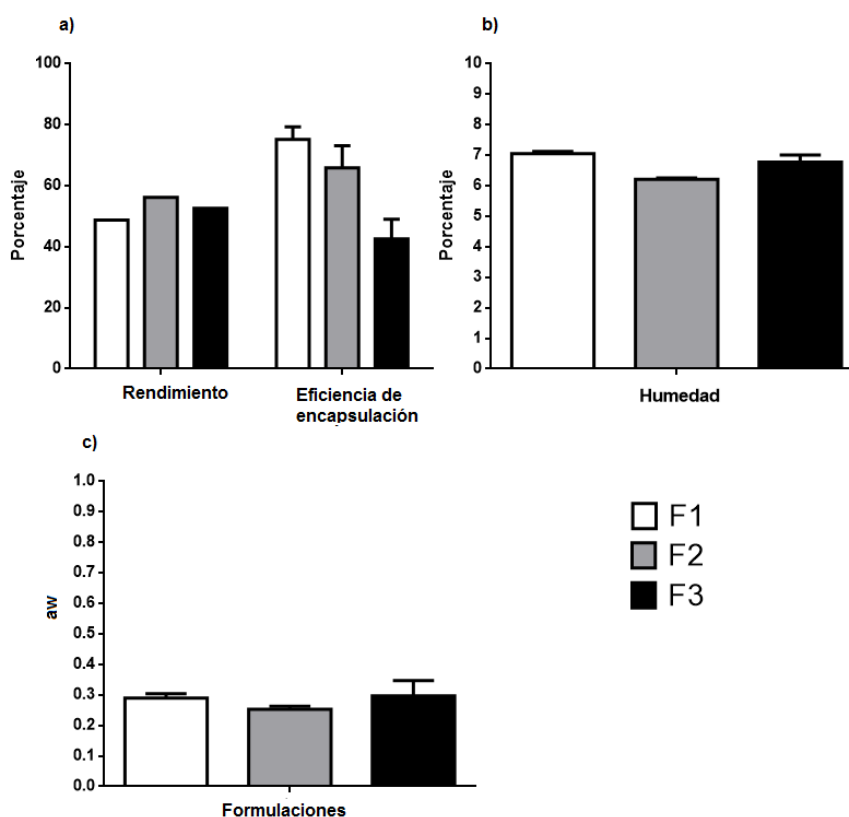
El resultado de viscosidad obtenido en esta emulsión fue de 273,3 cPs similar al predicho por el software con un nivel de confianza del 95%; este valor es importante desde el punto de vista tecnológico ya que la viscosidad tiene relación directa con la eficiencia de encapsulación y el porcentaje de sólidos presentes en la misma.

La viscosidad de una emulsión incrementa en relación al contenido de sólidos, por lo tanto, un aumento en la viscosidad de la emulsión debe ayudar a la retención del compuesto a proteger (eficiencia de encapsulación) (Rajabi, Ghorbani, Mahdi, Sadeghi, & Rajabzadeh, 2015, 331), esto se debe a la reducción en la circulación interna dentro de las pequeñas gotas, lo cual ocasiona que se requiera de menor cantidad de tiempo para formar una corteza protectora que es en sí, una membrana semi-permeable (Rajabi et al., 2015, 329). Un alto contenido de sólidos en la emulsión puede garantizar un alto valor en el resultado de eficiencia de encapsulación (Rajabi et al., 2015, 239).

Caracterización.

En la figura 18 se presentan los parámetros de humedad para las micropartículas obtenidas a partir del secado de cada uno de los extractos (F1: Extracto ORAC, F2: Extracto compuestos fenólicos, F3: Extracto glucorafanina) provenientes de la extracción asistida con ultrasonido, en la misma figura se presentan valores como la eficiencia de encapsulación y rendimiento del proceso de secado. Se muestran los datos promedio \pm desviación estándar (n=3).

Figura 18. (a) Porcentajes de rendimiento y eficiencia de encapsulación en el proceso de microencapsulación para cada una de las formulaciones (b) Porcentaje de humedad para cada una de las formulaciones (c) actividad acuosa (aw) para cada una de las formulaciones.



La actividad de agua (aw) se define como la relación de la presión de vapor del agua en un sistema alimentario a la presión de vapor del agua pura a la misma temperatura (Damodaran, 1996, 42); los datos mostrados en la figura 18 para aw fueron medidos a una temperatura de 22.14 ± 0.24 . La humedad y el aw son diferentes ya que el primero representa la composición en agua de un sistema alimentario y el aw hace relación a la cantidad de agua libre y que se encuentra disponible para reacciones bioquímicas (Quek et al., 2007, 390). Los valores obtenidos son bajos e ideales para

extender la vida útil de los prototipos obtenidos ya que estos valores evitan daños en el sistema generando así mayor estabilidad microbiológica (Quek et al., 2007, 390), adicionalmente, los valores de humedad se encuentran en un intervalo dentro del rango recomendado (3 al 10%) para esta clase de alimentos (Lia et al., 2015, 305). Los valores de humedad son bajos y pueden tener relación al contenido de sólidos que se fijó en 25°Bx. Rajabi et al. (2015, 331) Encontraron que un alto contenido de sólidos en la emulsión se ve reflejado en valores mínimos de humedad para el producto seco obtenido mediante secado por aspersión.

En la figura 18 se puede apreciar que el resultado obtenido para el rendimiento de extracción fue superior en la formulación dos e inferior para la formulación uno 56,15% y 48,72 % respectivamente, en el caso en particular del extracto GRA el rendimiento obtenido durante el proceso de secado es de 52,53%. A su vez este gráfico también brinda información del porcentaje obtenido en cuanto a la eficiencia de encapsulación, para esta variable, el porcentaje más alto corresponde al proceso de secado del extracto ORAC; 77,11% de extracto empleado para el secado quedó al interior de las cápsulas obtenidas, seguido de este se encuentra el secado del extracto compuestos fenólicos y finalmente el extracto GRA con una eficiencia de encapsulación del 65,81 y 42,58 respectivamente.

Cuando se realiza un secado por aspersión es necesario determinar diferentes propiedades del producto obtenido, en este caso la solubilidad mostrada en la figura 19 y humectabilidad presentada en la tabla 28 cobran importancia puesto que los resultados obtenidos para el potencial Z ilustrados en la tabla 27 son bajos y esto podría generar la aglomeración de las micro partículas obtenidas. Sandoval Yoval, Luciano. Montellano

Palacios, Leticia. Piña Soberanis, Martín. Sánchez Guzmán. (2012, 1) evaluaron el efecto del potencial Z en la aglomeración. En este estudio encontraron que tener un potencial Z bajo (Cero) permitió la aglomeración de partículas de lodo puesto que se desestabiliza la carga de las partículas que lo componen y estas se atraen entre sí; adicionalmente, existen diversos factores del proceso que pueden afectar la solubilidad y humectabilidad como el uso de una temperatura alta, especialmente cuando se trabaja con productos con altas concentraciones de sólidos (Cano-Chauca et al., 2005, 427); la composición inicial de la materia prima que se seca durante el proceso, los agentes de soporte, el caudal del aire y bajas velocidades de alimentación también son factores que pueden afectar la solubilidad y humectabilidad del producto seco (Kha, Nguyen, & Roach, 2010, 387).

Los valores de solubilidad obtenidos para cada una de las formulaciones son cercanos al 47%, estos datos son inferiores a los reportados por Cano-Chauca et al. (2005, 427) quienes obtuvieron porcentajes de solubilidad entre el 70 y 90% para mango en polvo obtenido mediante secado por aspersion empleando como agentes encapsulantes maltodextrina y goma arábica; de estos agentes encapsulantes el primero posee propiedades físicas que le confieren un alto grado de solubilidad y el segundo posee propiedades de emulsificación y alta solubilidad en agua (Cano-Chauca et al., 2005, 427). Autores como Yousefi et al. (2015, 467) Mencionan que el uso de maltodextrina como agente encapsulante se aplica predominantemente cuando se desean obtener polvos con un alto porcentaje de solubilidad en agua, lo que sugiere que en caso de aumentar el porcentaje de maltodextrina dentro la formulación de la emulsión

sometida al proceso de secado, permitiría un aumento en el porcentaje de solubilidad del producto obtenido.

En cuanto a la temperatura de secado y su efecto sobre la solubilidad autores como Chegini & Ghobadian. (2005, 661) Quek et al. (2007, 389) e Islam et al. (2017, 136) Informaron que el aumento en la temperatura de entrada en el aire empleado para el secado de polvo de naranja y sandía disminuye la solubilidad de los polvos obtenidos y esto se explicó argumentando que la alta temperatura induce a la formación de una pared dura sobre la superficie de la partícula que logra impedir que moléculas de agua se difundan fácilmente a través de la misma.

En este caso la humectabilidad no fue afectada por la aglomeración de las partículas; los valores obtenidos para las tres formulaciones varían entre $0,03 \pm 0,002$ y $0,04 \pm 0,002$ y son similares a valores reportados en la literatura, Serna-cock & Ayala-aponte. (2015, 44) indican que polvos obtenidos a partir de cascara de mango poseen valores de humectación que varían entre $0,006 \pm 0,001$ a $3,200 \pm 0,151$ g/seg.

Tamaño de partícula y potencial z.

La tabla 27 presenta los resultados obtenidos al evaluar el tamaño de partícula y el potencial z para cada una de las formulaciones elaboradas.

Tabla 27. Tamaño de partícula y potencial Z para cada una de las formulaciones.

Formulación	Tamaño (μm)	PD	Potencial Z (mV)
F1	3,00	2,467	-7,42
F2	4,84	3,292	-13,2
F3	5,56	3,388	-10,2

PD: Índice de polidispersidad

F1: extracto Orac, F2: Extracto compuestos fenolicos, F3: extracto GRA

Solubilidad y humectabilidad.

A continuación, en la figura 19 se presentan los datos obtenidos durante el análisis de porcentaje de solubilidad y en la tabla 25 los resultados obtenidos para humectabilidad.

Figura 19. Porcentaje de solubilidad para cada una de las formulaciones F1: extracto ORAC, F2: extracto compuestos fenolicos, F3: extracto GRA.

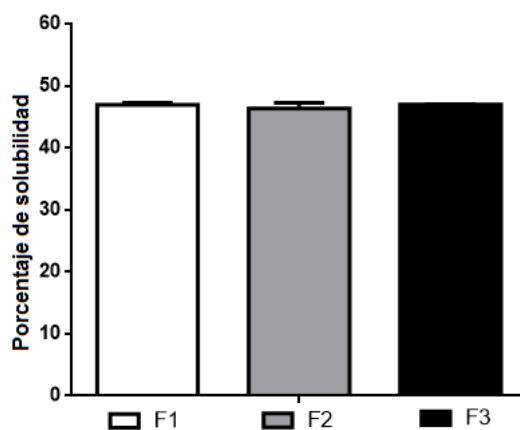


Tabla 28. Humectabilidad (g/seg) para cada una de las formulaciones F1: extracto ORAC, F2: extracto compuestos fenolicos, F3: extracto GRA.

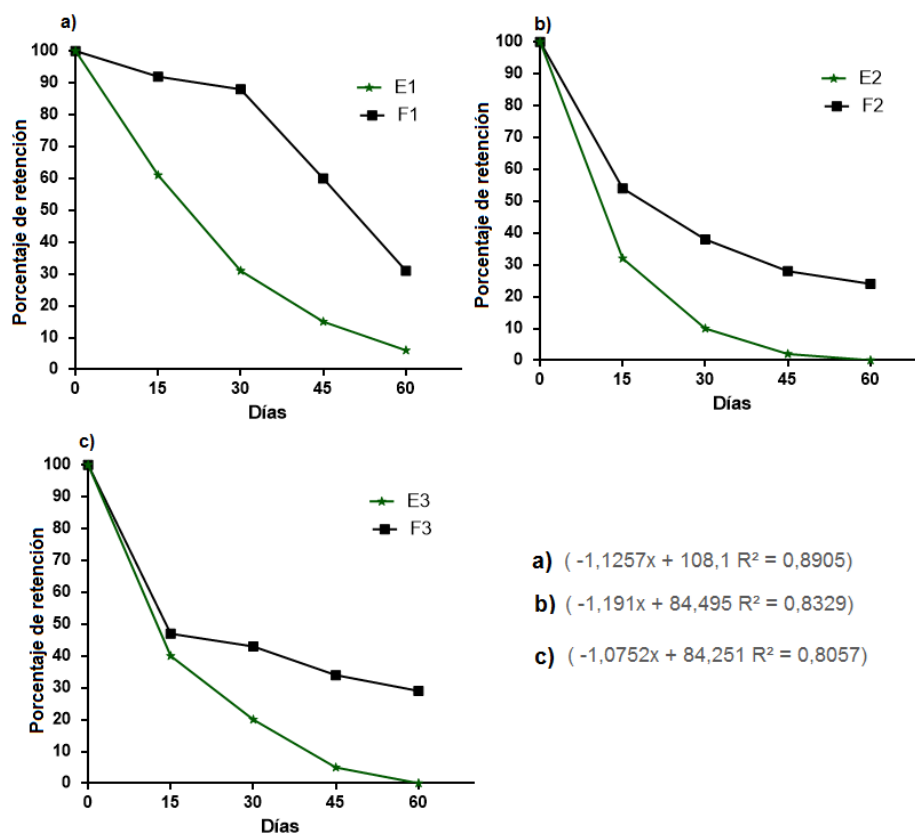
Formulación	Humectabilidad (g/seg)
F1	0,0412 ± 0,0012
F2	0,0398 ± 0,0010
F3	0,0364 ± 0,0009

Estabilidad en el tiempo de cada una de las formulaciones.

El análisis de estabilidad en función del tiempo para cada una de las formulaciones microencapsuladas durante el secado por aspersión se muestran en la figura 20.

La formulación 1 empleada para proteger compuestos que le otorgan al extracto su valor ORAC brindó una alta protección a las mismas durante los primeros 30 días de almacenamiento, sin embargo, luego de este día se presentó una pérdida significativa en dicha protección lo que generó una disminución cercana al 70% en el porcentaje de retención de los compuestos. Para el caso de las formulaciones dos y tres (compuestos fenólicos y GRA respectivamente) desde el día 15 se registra una pérdida significativa, disminuye alrededor del 50% el porcentaje de retención de los compuestos al interior de las microcapsulas, posteriormente ambas formulaciones siguen presentando pérdidas similares que llegan en el día 60 a niveles de retención similares a los de la formulación 1.

Figura 20. Estabilidad en el tiempo para cada una de las formulaciones y control (extracto sin encapsular) (a) Formulación 1 (Extracto ORAC), (b) Formulación 2 (Extracto compuestos fenolicos), (c) Formulación 3 (Extracto GRA).



Con el fin de obtener información que permita establecer la velocidad de degradación de cada una de las formulaciones se aplicó un modelo de regresión lineal, las ecuaciones a, y c se presentan en el figura 17 y gracias a ellas se encontró que la tasa de degradación en todas las formulaciones es similar pero que es mayor en la formulación 1 ya que esta posee el valor más alto para la pendiente.

Ballesteros, Ramirez, Orrego, Teixeira, & Mussatto. (2017, 630) mencionan que el secado por aspersión y los componentes de pared (maltodextrina y goma árabe) son factores determinantes en la encapsulación de compuestos fenólicos y aunque la goma

arábica es más estable térmicamente presenta un factor perjudicial en la retención de dichos compuestos; el uso de maltodextrina como agente formador de pared es eficaz para la protección de compuestos fenólicos (Zoric et al., 2017, 255). Con el fin de evitar la degradación acelerada de estos compuestos se debe pensar en la calidad del empaque que les brindará protección a las micropartículas que los contienen, se ha demostrado que empaques laminados de polietileno (PET) pueden incrementar en un 30% la retención de compuestos fenólicos después de 6 meses a 4°C (Zoric et al., 2017, 256), esto abre la posibilidad a que en investigaciones posteriores se evalúe el impacto que tiene un empaque de PET en la protección de los compuestos presentes en cada una de las formulaciones especialmente en la formulación 2.

Conclusiones

De acuerdo con los resultados obtenidos, la presente investigación muestra que las hojas de brócoli pueden ser una fuente alternativa para la obtención de compuestos bioactivos a partir de brócoli, lo que permite un mayor aprovechamiento de los excedentes de cosecha puesto que brinda al horticultor una nueva alternativa idónea para aprovechar recursos que en la actualidad se consideran excedentes y no representan alguna clase de ingreso o ganancia a lo largo de la cadena productiva.

Las condiciones óptimas para la obtención de glucorafanina bajo una extracción medida por ultrasonido y empleando agua como solvente a partir de hojas de brócoli son 120 W, 59 kHz y 20 minutos, estas condiciones se presentan como una nueva opción para la adquisición de este compuesto empleando hojas de brócoli, sin embargo, la eficiencia de extracción para el proceso es del 36,63% en comparación a la extracción convencional con metanol en agua a 70°C; también se determinaron las condiciones óptimas para la obtención de un extracto con alto valor ORAC y rico en compuestos fenólicos estas son 300 W, 59 kHz durante 8,7 min y 178 W, 59 kHz durante 5 minutos respectivamente.

La técnica de secado por aspersion permitió el desarrollo de prototipos enriquecidos con sustancias bioactivas como compuestos fenólicos y glucorafanina, la formulación empleada posee el balance óptimo de maltodextrina, goma arábica y gelatina como agentes encapsulantes lo que brindó una eficiencia de encapsulación superior al 40%.

En el proceso de caracterización realizado a las micro capsulas se evidencia que estas poseen características físicas que están dentro del rango usual para este tipo de alimentos.

Perspectivas

Gracias a la clasificación de GRAS (“generally accepted as safe”) otorgada a la glucorafanina por la “Food and Drug Administration” o “Administración de Medicamentos y Alimentos” FDA por sus siglas en inglés, se provee el uso de este compuesto como un ingrediente funcional para la industria de alimentos, debido a este impacto se sugiere realizar un análisis económico total del proceso, desde la etapa de recolección de los excedentes de cosecha hasta la obtención y micro encapsulación.

Debido a la eficiencia obtenida durante el proceso de extracción se recomienda realizar un estudio que permita determinar cuántos ciclos de extracción son necesarios para obtener una concentración similar a la obtenida con metanol a 70°C.

En busca de obtener una mayor eficiencia de encapsulación para cada uno de los extractos se recomienda evaluar el efecto que tendría el aumento en la proporción de la maltodextrina como parte de la formulación.

Se recomienda evaluar la estabilidad de los analitos al interior de las cápsulas conservado las mismas en diferentes empaques que brinden protección a la luz, humedad y diversos factores medio ambientales que podrían afectarla.

Referencias

- Adolfo, R., & Huertas, P. (2011). Revisión : Microencapsulación de Alimentos, 63(2), 5669–5684.
- Álvarez, R., Carvalho, C. P., Sierra, J., Lara, O., Cardona, D., & Londoño-Londoño, J. (2012). Citrus juice extraction systems: Effect on chemical composition and antioxidant activity of clementine juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(3), 774–781. <https://doi.org/10.1021/jf203353h>
- Appendino, G., & Bardelli, A. (2010). Broccoli, PTEN deletion and prostate cancer: where is the link? *Molecular Cancer*, 9(1), 308. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-9-308>
- Ares, A. M., Bernal, J., Nozal, M. J., Turner, C., & Plaza, M. (2015). Fast determination of intact glucosinolates in broccoli leaf by pressurized liquid extraction and ultra high performance liquid chromatography coupled to quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Food Research International*, 76, 498–505. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.06.037>
- Ares, A. M., Nozal, M. J., & Bernal, J. (2013). Extraction, chemical characterization and biological activity determination of broccoli health promoting compounds. *Journal of Chromatography A*, 1313, 78–95. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.07.051>
- Baenas, N., Moreno, D. A., & García-Viguera, C. (2012). Selecting sprouts of Brassicaceae for optimum phytochemical composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(45), 11409–11420. <https://doi.org/10.1021/jf302863c>
- Ballesteros, L. F., Ramirez, M. J., Orrego, C. E., Teixeira, J. A., & Mussatto, S. I. (2017). Optimization of autohydrolysis conditions to extract antioxidant phenolic compounds from spent coffee grounds. *Journal of Food Engineering*, 199, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2016.11.014>
- Bernal, J., Ares, A. M., Nozal, M. J., & Bernal, J. L. (2014). Optimized extraction, separation and quantification of twelve intact glucosinolates in broccoli leaves. *Food Chemistry*, 152, 66–74. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.11.125>
- Bustos-Garza, C., Yáñez-Fernández, J., & Barragán-Huerta, B. E. (2013). Thermal and pH stability of spray-dried encapsulated astaxanthin oleoresin from *Haematococcus pluvialis* using several encapsulation wall materials. *Food Research International*, 54(1), 641–649. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.07.061>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.04.140>
- Cano-Chauca, M., Stringheta, P. C., Ramos, A. M., & Cal-Vidal, J. (2005). Effect of the carriers on the microstructure of mango powder obtained by spray drying and its functional characterization. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*,

- 6(4), 420–428. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2005.05.003>
- Cartea, M. E., Francisco, M., Soengas, P., & Velasco, P. (2011). Phenolic compounds in Brassica vegetables. *Molecules*, *16*(1), 251–280. <https://doi.org/10.3390/molecules16010251>
- Chegini, G. R., & Ghobadian, B. (2005). Effect of Spray-Drying Conditions on Physical Properties of Orange Juice Powder. *Drying Technology*, *23*(3), 657–668. <https://doi.org/10.1081/DRT-200054161>
- Chemat, F., & Khan, M. K. (2011). Ultrasonics Sonochemistry Applications of ultrasound in food technology : Processing , preservation and extraction. *Ultrasonics - Sonochemistry*, *18*(4), 813–835. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2010.11.023>
- Chemat, F., Rombaut, N., Sicaire, A., Meullemiestre, A., & Abert-vian, M. (2016). Ultrasound assisted extraction of food and natural products . Mechanisms , techniques , combinations , protocols and applications . *Ultrasonics - Sonochemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.06.035>
- Chen, H., Yang, M., Shan, Z., Mansouri, S., May, B. K., Chen, X., ... Woo, M. W. (2017). On spray drying of oxidized corn starch cross-linked gelatin microcapsules for drug release. *Materials Science and Engineering C*, *74*, 493–500. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.12.047>
- Damodaran, S. (1996). *Amino acids, peptides and proteins*. (O. R. Fennema, Ed.), *Food Chemistry* (Third Edit). New York, Basel, Hong Kong: University of Wisconsin - Madison. [https://doi.org/10.1016/0260-8774\(88\)90055-6](https://doi.org/10.1016/0260-8774(88)90055-6)
- Ding, Y., Zheng, J., Xia, X., Ren, T., & Kan, J. (2016). Box-Behnken design for the optimization of nanoscale retrograded starch formation by high-power ultrasonication. *LWT - Food Science and Technology*, *67*, 206–213. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.11.022>
- Donnell, C. P. O., Tiwari, B. K., Bourke, P., & Cullen, P. J. (2010). Effect of ultrasonic processing on food enzymes of industrial importance. *Trends in Food Science & Technology*, *21*(7), 358–367. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2010.04.007>
- Espada-Bellido, E., Ferreiro-González, M., Carrera, C., Palma, M., Barroso, C. G., & Barbero, G. F. (2017). Optimization of the ultrasound-assisted extraction of anthocyanins and total phenolic compounds in mulberry (*Morus nigra*) pulp. *Food Chemistry*, *219*, 23–32. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.122>
- Fahey, J. W., Haristoy, X., Dolan, P. M., Kensler, T. W., Scholtus, I., Stephenson, K. K., ... Lozniewski, A. (2002). Sulforaphane inhibits extracellular, intracellular, and antibiotic-resistant strains of *Helicobacter pylori* and prevents benzo[a]pyrene-induced stomach tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *99*(11), 7610–5. <https://doi.org/10.1073/pnas.112203099>
- Fahey, J. W., Zalcmann, a T., & Talalay, P. (2001a). The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry*, *56*, 5–51. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)00316-2](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)00316-2)

- Fahey, J. W., Zalcmann, a T., & Talalay, P. (2001b). The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry*, 56, 5–51. Retrieved from <http://64.76.85.9:2073/science/article/pii/S0031942200003162#>
- Francisco, M., Moreno, D. A., Cartea, M. E., Ferreres, F., Garc??a-Viguera, C., & Velasco, P. (2009). Simultaneous identification of glucosinolates and phenolic compounds in a representative collection of vegetable Brassica rapa. *Journal of Chromatography A*, 1216(38), 6611–6619. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.07.055>
- Fратиanni, F., & Cardinale, F. (2014). Polyphenol Composition and Antioxidant Activity of Two Autochthonous Brassicaceae of the Campania Region, Southern Italy. *Food and Nutrition ...*, 2014(January), 66–70. Retrieved from http://file.scirp.org/Html/9-2701088_41720.htm
- García-saldaña, J. S., Campas-baypoli, O. N., López-cervantes, J., Sánchez-machado, D. I., Cantú-soto, E. U., & Rodríguez-ramírez, R. (2016). Microencapsulation of sulforaphane from broccoli seed extracts by gelatin / gum arabic and gelatin / pectin complexes, 201, 94–100. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.01.087>
- Gawlik-Dziki, U., Jezyna, M., Świeca, M., Dziki, D., Baraniak, B., & Czyz, J. (2012). Effect of bioaccessibility of phenolic compounds on in vitro anticancer activity of broccoli sprouts. *Food Research International*, 49(1), 469–476. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.08.010>
- Gharsallaoui, A., Roudaut, G., Chambin, O., Voilley, A., & Saurel, R. (2007). Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food Research International*, 40(9), 1107–1121. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2007.07.004>
- GU, Z. xin, GUO, Q. hui, & GU, Y. juan. (2012). Factors Influencing Glucoraphanin and Sulforaphane Formation in Brassica Plants: A Review. *Journal of Integrative Agriculture*, 11(11), 1804–1816. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(12\)60185-3](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(12)60185-3)
- ICONTEC. (2009). Norma Técnica Colombiana NTC 2009. Microbiología de alimentos y productos para alimentación animal. Requisitos generales y directrices para análisis microbiológicos. Bogotá.
- ICONTEC (1977) Norma Técnica Colombiana NTC 1291 Frutas y hortalizas frescas. Generalidades. Bogotá.
- ICONTEC (2007) Norma Técnica Colombiana NTC 2007 Harina de trigo. Bogotá.
- Islam, M. Z., Kitamura, Y., Kokawa, M., Monalisa, K., Tsai, F. H., & Miyamura, S. (2017). Effects of micro wet milling and vacuum spray drying on the physicochemical and antioxidant properties of orange (Citrus unshiu) juice with pulp powder. *Food and Bioproducts Processing*, 101(2012), 132–144. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2016.11.002>

- Jaramillo, J., & Díaz, C. a. (2006a). *El cultivo de las crucíferas. Brócoli, coliflor, repollo y col china*. (M. T. 20, C. C. de I. A.- CORPOICA., & C. de I. La Selva, Eds.), *Corpoica*. Rionegro, Antioquia, Colombia.
- Jaramillo, J., & Díaz, C. a. (2006b). *El cultivo de las crucíferas. Brócoli, coliflor, repollo y col china*. (M. T. 20, C. C. de I. A.- CORPOICA., & C. de I. La Selva, Eds.), *Corpoica*. Rionegro, Antioquia, Colombia. Retrieved from http://www.sidalc.net/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=INFO.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mfn=000522%5Cnhttp://www.corpoica.org.co/SitioWeb/publicaciones/comentarios.asp?id_publicacion=1519
- Kadam, S. U., Tiwari, B. K., Alvarez, C., & Donnell, C. P. O. (2015). Ultrasound applications for the extraction, identification and delivery of food proteins and bioactive peptides, *46*, 60–67. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.07.012>
- Kha, T. C., Nguyen, M. H., & Roach, P. D. (2010). Effects of spray drying conditions on the physicochemical and antioxidant properties of the Gac (*Momordica cochinchinensis*) fruit aril powder. *Journal of Food Engineering*, *98*(3), 385–392. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.01.016>
- Kuehl, R. O. (2001). *Diseño de experimentos Principios estadísticos para el diseño y análisis de investigaciones*. (T. E. S. . de C.V, Ed.) (Segunda). Tucson, Arizona.
- Lampe, J. W. (2003). Spicing up a vegetarian diet : chemopreventive effects of. *Am J Clin Nutr*, *78*, 579–583.
- Latté, K. P., Appel, K. E., & Lampen, A. (2011). Health benefits and possible risks of broccoli - An overview. *Food and Chemical Toxicology*, *49*(12), 3287–3309. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2011.08.019>
- Lia, C., Wang, J., Shi, J., Huang, X., Peng, Q., & Xueb, F. (2015). Encapsulation of tomato oleoresin using soy protein isolate-gum aracia conjugates as emulsifier and coating materials. *Food Hydrocolloids*, *45*, 301–308. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.11.022>
- López H., O. D., Márquez C., T., Mayo A., O., Toledo S., C., & Pérez S., E. (2009). Características del Aceite de Semillas de Cucurbita pepo L. microencapsulado mediante secado por aspersion con maltodextrina y goma arábica. *Latin American Journal of Pharmacy*, *28*(4), 628–632.
- Lv, J., Wu, J., Zuo, J., Fan, L., Shi, J., Gao, L., ... Wang, Q. (2017). Effect of Se treatment on the volatile compounds in broccoli. *Food Chemistry*, *216*, 225–233. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.08.005>
- Mandimika, T., Paturi, G., De Guzman, C. E., Butts, C. A., Nones, K., Monro, J. A., ... Ansell, J. (2012). Effects of dietary broccoli fibre and corn oil on serum lipids, faecal bile acid excretion and hepatic gene expression in rats. *Food Chemistry*, *131*(4), 1272–1278. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.09.117>
- Ministerio De Agricultura y desarrollo Rural. (2012). ANUARIO ESTADÍSTICO DE FRUTAS Y HORTALIZAS 2007-2011 Y SUS CALENDARIOS DE SIEMBRAS Y

COSECHAS Resultados Evaluaciones Agropecuarias Municipales 2011.

- Moreno, D. A., Carvajal, M., López-Berenguer, C., & García-Viguera, C. (2006). Chemical and biological characterisation of nutraceutical compounds of broccoli. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *41*(5), 1508–1522. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2006.04.003>
- Oniszczyk, A., & Olech, M. (2016). Optimization of ultrasound-assisted extraction and LC-ESI-MS/MS analysis of phenolic acids from *Brassica oleracea* L. var. *sabellica*. *Industrial Crops and Products*, *83*, 359–363. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.01.015>
- Pongmalai, P., Devahastin, S., Chiewchan, N., & Soponronnarit, S. (2015). Enhancement of microwave-assisted extraction of bioactive compounds from cabbage outer leaves via the application of ultrasonic pretreatment. *Separation and Purification Technology*, *144*, 37–45. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2015.02.010>
- Pongmalai, P., Devahastin, S., Chiewchan, N., & Soponronnarit, S. (2016). Enhancing the recovery of cabbage glucoraphanin through the monitoring of sulforaphane content and myrosinase activity during extraction by different methods. *Separation and Purification Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2016.11.003>
- Quek, S. Y., Chok, N. K., & Swedlund, P. (2007). The physicochemical properties of spray-dried watermelon powders. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, *46*(5), 386–392. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2006.06.020>
- Rajabi, H., Ghorbani, M., Mahdi, S., Sadeghi, A., & Rajabzadeh, G. (2015). Food Hydrocolloids Retention of saffron bioactive components by spray drying encapsulation using maltodextrin , gum Arabic and gelatin as wall materials. *Food Hydrocolloids*, *51*, 327–337. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.05.033>
- Rangkadilok, N., Tomkins, B., Nicolas, M. E., Premier, R. R., Bennett, R. N., Eagling, D. R., & Taylor, P. W. J. (2002). The effect of post-harvest and packaging treatments on glucoraphanin concentration in broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*(25), 7386–7391. <https://doi.org/10.1021/jf0203592>
- Rice-Evans, C., Miller, N., & Paganga, G. (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science*, *2*(4), 152–159. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(97\)01018-2](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(97)01018-2)
- Robert, P., Gorena, T., Romero, N., Sepulveda, E., Chavez, J., & Saenz, C. (2010). Encapsulation of polyphenols and anthocyanins from pomegranate (*Punica granatum*) by spray drying. *International Journal of Food Science and Technology*, *45*(7), 1386–1394. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2010.02270.x>
- Rodríguez Hernández, M. D. C. (2013). Respuestas Fisiológicas, moleculares y fitoquímicas de variedades de *Brassica Oleracea* (Grupo *Italica*) sometidas a estres abiotico. *Tesis Doctoral*, 247. Retrieved from <http://nadir.uc3m.es/alejandro/phd/thesisFinal.pdf>

- Rose, P., Huang, Q., Ong, C. N., & Whiteman, M. (2005). Broccoli and watercress suppress matrix metalloproteinase-9 activity and invasiveness of human MDA-MB-231 breast cancer cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, *209*(2), 105–113. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2005.04.010>
- Rybarczyk-Plonska, A., Hagen, S. F., Borge, G. I. A., Bengtsson, G. B., Hansen, M. K., & Wold, A. B. (2016). Glucosinolates in broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*) as affected by postharvest temperature and radiation treatments. *Postharvest Biology and Technology*, *116*, 16–25. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2015.12.010>
- Sakihama, Y., Cohen, M. F., Grace, S. C., & Yamasaki, H. (2002). Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: Phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants. *Toxicology*, *177*(1), 67–80. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(02\)00196-8](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(02)00196-8)
- Sanchez, C., Nigen, M., Mejia Tamayo, V., Doco, T., Williams, P., Amine, C., & Renard, D. (2017). Acacia gum: History of the future. *Food Hydrocolloids*. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.04.008>
- Sánchez, F. M., García, F., Calvo, P., Bernalte, M. J., & González-Gómez, D. (2016). Optimization of broccoli microencapsulation process by complex coacervation using response surface methodology. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, *34*, 243–249. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2016.02.008>
- Sandoval Yoval, Luciano. Montellano Palacios, Leticia. Piña Soberanis, Martín. Sánchez Guzmán, L. O. (2012). POTENCIAL ZETA COMO UNA HERRAMIENTA PARA DETERMINAR LA AGLOMERACIÓN DE LAS PARTÍCULAS EN LA REDUCCIÓN DEL VOLUMEN DEL LODO A DISPONER. *Instituto Mexicano de Tecnología Del Agua*.
- Schonhof, I., Krumbein, A., & Brückner, B. (2004). Genotypic effects on glucosinolates and sensory properties of broccoli and cauliflower. *Nahrung - Food*, *48*(1), 25–33. <https://doi.org/10.1002/food.200300329>
- Serna-cock, L., & Ayala-aponte, C. T. A. (2015). Evaluación de Polvos Alimentarios obtenidos de Cáscaras de Mango (*Mangifera indica*) como fuente de Ingredientes Funcionales Evaluation of food powders obtained from peels of mango (*Mangifera indica*) as sources of functional ingredients, *26*(2), 41–50. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642015000200006>
- Shiva, R. B., & Jung-Ho, K. (2014). Seasonal variation in phytochemicals and antioxidant activities in different tissues of various Broccoli cultivars. *African Journal of Biotechnology*, *13*(4), 604–615. <https://doi.org/10.5897/AJB2013.13432>
- Shu, B., Yu, W., Zhao, Y., & Liu, X. (2006). Study on microencapsulation of lycopene by spray-drying. *Journal of Food Engineering*, *76*(4), 664–669. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.05.062>
- Soria, A. C., & Villamiel, M. (2010). Effect of ultrasound on the technological properties and bioactivity of food : a review. *Trends in Food Science & Technology*, *21*(7),

323–331. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2010.04.003>

- Talalay, P., Fahey, J. W., Healy, Z. R., Wehage, S. L., Benedict, A. L., Min, C., & Dinkova-Kostova, A. T. (2007). Sulforaphane mobilizes cellular defenses that protect skin against damage by UV radiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(44), 17500–5. <https://doi.org/10.1073/pnas.0708710104>
- Tian, G., Li, Y., Yuan, Q., Cheng, L., Kuang, P., & Tang, P. (2015). The stability and degradation kinetics of Sulforaphane in microcapsules based on several biopolymers via spray drying. *Carbohydrate Polymers*, *122*, 5–10. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.01.003>
- Tontul, I., & Topuz, A. (2017). Spray-drying of fruit and vegetable juices: Effect of drying conditions on the product yield and physical properties. *Trends in Food Science and Technology*, *63*, 91–102. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.03.009>
- Vallejo, F., Gil-Izquierdo, A., Pérez-Vicente, A., & García-Viguera, C. (2004). In Vitro Gastrointestinal Digestion Study of Broccoli Inflorescence Phenolic Compounds, Glucosinolates, and Vitamin C. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *52*(1), 135–138. <https://doi.org/10.1021/jf0305128>
- Van Eylen, D., Bellostas, N., Strobel, B. W., Oey, I., Hendrickx, M., Van Loey, A., ... Sørensen, J. C. (2009). Influence of pressure/temperature treatments on glucosinolate conversion in broccoli (*Brassica oleraceae* L. cv *Italica*) heads. *Food Chemistry*, *112*(3), 646–653. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.06.025>
- Verbeken, D., Dierckx, S., & Dewettinck, K. (2003). Exudate gums: Occurrence, production, and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *63*(1), 10–21. <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1354-z>
- 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*(SUPPL. 2), 219–265. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200800065>
- Verma, A., & Singh, S. V. (2015). Spray Drying of Fruit and Vegetable Juices—A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *55*(5), 701–719. <https://doi.org/10.1080/10408398.2012.672939>
- Vig, A. P., Rampal, G., Thind, T. S., & Arora, S. (2009). Bio-protective effects of glucosinolates - A review. *LWT - Food Science and Technology*, *42*(10), 1561–1572. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2009.05.023>
- Westergaard, V. (2004). Tecnología de la leche en polvo, evaporación y secado por atomización. (Niro, Ed.) (Quinta). Copenhagen: Niro. Retrieved from <http://es.scribd.com/doc/171580783/Es-Tecnologia-de-La-Leche-en-Polvo-Todo#scrib>
- Wu, Y., Zou, L., Mao, J., Huang, J., & Liu, S. (2014). Stability and encapsulation

efficiency of sulforaphane microencapsulated by spray drying. *Carbohydrate Polymers*, 102(1), 497–503. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.11.057>

- Yousefi, S., Emam-djomeh, Z., Mousavi, M., Kobarfard, F., & Zbicinski, I. (2015). Developing spray-dried powders containing anthocyanins of black raspberry juice encapsulated based on fenugreek gum. *Advanced Powder Technology*, 26(2), 462–469. <https://doi.org/10.1016/j.appt.2014.11.019>
- Zhu, F. (2017). Encapsulation and delivery of food ingredients using starch based systems. *Food Chemistry*, 229, 542–552. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.02.101>
- Zoric, Z., Pelaic, Z., Pedisic, S., Elez Garofulic, I., Bursac Kovacevic, D., & Dragovic Uzelac, V. (2017). Effect of storage conditions on phenolic content and antioxidant capacity of spray dried sour cherry powder. *LWT - Food Science and Technology*, 79, 251–259. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.01.049>