



UNIVERSIDAD DE MURCIA
ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO
TESIS DOCTORAL

Aprovechamiento de los subproductos del brócoli como fuente de
compuestos bioactivos.

D.^a María Borja Martínez
2023



UNIVERSIDAD DE MURCIA
ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO
TESIS DOCTORAL

Aprovechamiento de los subproductos del brócoli como fuente de
compuestos bioactivos

Autor: D.^a María Borja Martínez

Director/es: D.^a M^a Ángeles Pedreño García
D.^a Ana Belén Sabater Jara



**DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD
DE LA TESIS PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR**

Aprobado por la Comisión General de Doctorado el 19-10-2022

D./Dña. María Borja Martínez

doctorando del Programa de Doctorado en

Biología Vegetal

de la Escuela Internacional de Doctorado de la Universidad Murcia, como autor/a de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor y titulada:

Aprovechamientos de los subproductos de brócoli como fuente de compuestos bioactivos.

y dirigida por,

D./Dña. María Ángeles Pedreño García

D./Dña. Ana Belén Sabater Jara

D./Dña.

DECLARO QUE:

La tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la Ley de Propiedad Intelectual (R.D. legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Si la tesis hubiera sido autorizada como tesis por compendio de publicaciones o incluyese 1 o 2 publicaciones (como prevé el artículo 29.8 del reglamento), declarar que cuenta con:

- La aceptación por escrito de los coautores de las publicaciones de que el doctorando las presente como parte de la tesis.*
- En su caso, la renuncia por escrito de los coautores no doctores de dichos trabajos a presentarlos como parte de otras tesis doctorales en la Universidad de Murcia o en cualquier otra universidad.*

Del mismo modo, asumo ante la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad del contenido de la tesis presentada, en caso de plagio, de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

En Murcia, a 15 de marzo de 2023

Fdo.: María Borja Martínez

BORJA MARTINEZ Firmado digitalmente por
MARIA - BORJA MARTINEZ MARIA -
48739292S 48739292S
Fecha: 2023.03.15 23:04:50
+01'00'

Esta DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD debe ser insertada en la primera página de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor.

Información básica sobre protección de sus datos personales aportados	
Responsable:	Universidad de Murcia. Avenida teniente Flomesta, 5. Edificio de la Convalecencia. 30003; Murcia. Delegado de Protección de Datos: dpd@um.es
Legitimación:	La Universidad de Murcia se encuentra legitimada para el tratamiento de sus datos por ser necesario para el cumplimiento de una obligación legal aplicable al responsable del tratamiento. art. 6.1.c) del Reglamento General de Protección de Datos
Finalidad:	Gestionar su declaración de autoría y originalidad
Destinatarios:	No se prevén comunicaciones de datos
Derechos:	Los interesados pueden ejercer sus derechos de acceso, rectificación, cancelación, oposición, limitación del tratamiento, olvido y portabilidad a través del procedimiento establecido a tal efecto en el Registro Electrónico o mediante la presentación de la correspondiente solicitud en las Oficinas de Asistencia en Materia de Registro de la Universidad de Murcia

El presente trabajo de investigación ha sido realizado conjuntamente entre la empresa Agrícola Santa Eulalia S.L. y el Departamento de Biología Vegetal (Área de Fisiología Vegetal) de la Facultad de Biología de la Universidad de Murcia bajo la dirección de la Dra. M^a Ángeles Pedreño García y la codirección de la Dra. Ana Belén Sabater Jara.

Este trabajo de investigación ha sido financiado por el proyecto “**Desarrollo de procesos de obtención de ingredientes bioactivos a partir de subproductos vegetales**” concedido por la Consejería de Desarrollo, Turismo y Empleo, destinado a impulsar la cooperación público privada y la transferencia de tecnología en los ámbitos de especialización de la Estrategia de Investigación e Innovación para la especialización Inteligente de la Región de Murcia (Proyectos RIS3MUR, de referencia 2I16SA000043) así como con la ayuda de un contrato concedido por el Ministerio de Economía y Competitividad (PEJ-2018-004841-A).

PEDREÑO GARCIA
MARIA ANGELES -
22947266M

Firmado digitalmente por
PEDREÑO GARCIA MARIA
ANGELES - 22947266M
Fecha: 2023.02.27
12:32:27 +01'00'

Fdo: M^a Ángeles Pedreño García

SABATER JARA
ANA BELEN -
48400482H

Firmado digitalmente
por SABATER JARA ANA
BELEN - 48400482H
Fecha: 2023.02.27
10:58:20 +01'00'

Fdo: Ana Belén Sabater Jara

BORJA
MARTINEZ
MARIA -
48739292S

Firmado
digitalmente por
BORJA MARTINEZ
MARIA - 48739292S
Fecha: 2023.02.27
17:08:53 +01'00'

Fdo: María Borja Martínez

Murcia, 27 de febrero de 2023

Agradecimientos

En primer lugar, y no podía ser de otra forma, quiero dar las gracias a mis directoras de tesis, M^a Ángeles Pedreño y Ana Belén Sabater. A M^a Ángeles por darme la oportunidad de entrar en el grupo de plantas biofactoría e iniciarme y guiarme en el mundo de la investigación y de los cultivos vegetales. Y gracias especialmente a Ana, por estar siempre, tanto como directora como compañera y amiga, para dar consejos y soluciones, por ser vecina tanto de casa como de mesa del despacho, por todos los viajes a la universidad juntas (que han sido muchos todos estos años) y por sacar tiempo de donde había para resolver dudas, ya sea en Barcelona o en Murcia. A las dos, gracias por la oportunidad de llevar a cabo esta tesis.

Por supuesto agradecer la oportunidad de realizar esta tesis a la empresa Agrícola Santa Eulalia S.L., así como al Centro Tecnológico Nacional de la Conserva y Alimentación y al Centro de Investigación y Desarrollo del Alimento Funcional en Granada.

También agradecer al resto de compañeros del laboratorio, los que siguen y los que se fueron, de todos me llevo algo. Gracias a Esther, mi primera mentora, quien me enseñó sobre todo lo importante que es la organización y ser metódica, por sus largas charlas y risas y por sentar las bases del trabajo en laboratorio en mí. A Fran por iniciarme en el mundo del cultivo de *Arabidopsis* y las peroxidases y por hacer que todo parezca fácil a base de bromas y risas. A PJ, porque lo sigo teniendo presente cada vez que suena Madonna en la radio o que Leticia Sabater saca un nuevo villancico. Siempre te llevaré en mi *Cuore*.

A Bego, por haber sido una gran compañera de laboratorio. A Sarai, por compartir gustos frikis (en el buen sentido siempre) y musicales (yo no podría salir sola en el karaoke a cantar *System of a Down*), has hecho que esta etapa sea mucho más llevadera. A Lorena, la vicedecana de festejos, por estar siempre para echar una mano en lo que sea, tanto en el laboratorio como fuera de él. El paseo en taxi por Barcelona y los Baca piñonet estarán siempre en mi memoria. A Pepita, la auténtica jefa del laboratorio, le preguntes a quien le preguntes. Por ser amiga y prácticamente la madre de todos y por estar siempre para echar una mano en los momentos de caos y obviamente por sus sesiones musicales que alegran cualquier trabajo. A Edu y a Joseco, por las charlas sobre juegos en los que perder tiempo y dinero y las recomendaciones de libros fantasiosos. A todos ellos, el equipo San Pulpo, porque cerrar el chiringuito algo más pronto los viernes para un combo hacía que el estrés de la semana valiera la pena (aunque sea viendo como sube de precio de los trozos de pulpo).

También quiero agradecer esta tesis a todo el equipo del servicio de cultivo de tejidos del ACTI, en especial a Juana, Toñi y M^a Jesús, porque han sido muchas horas encerradas en esas cabinas

y siempre han estado para todas las preguntas y dudas que he tenido (que no han sido pocas). También a Pilar, Silvia y Rosario, a las que he ido persiguiendo cada dos por tres para ver cómo funciona un equipo y porque necesito material, gracias por la paciencia. También al equipo de Instrumentación Científica y de Biología Molecular del ACTI por estar para resolver dudas cuando los he necesitado. También quiero expresar mi gratitud al grupo de Calidad Alimentaria del IMIDA, especialmente a Pilar Hellín, por su colaboración y por aguantar constantes mensajes y correos para pinchar glucosinolatos

A Irene y Virginia porque, a pesar del tiempo, seguimos siendo las mismas tres pencas y sé que puedo contar con ellas para cualquier cosa.

A mis winsan de la universidad: Penélope, Paco, Javi (tú no eres de la universidad, pero por tiempo como si lo fueras), Antonio, M^a José y Alba, por tantos años de amistad, risas, viajes, batas y paellas (y más cosas que no se pueden contar en público), por preocuparse de como llevo la tesis en cada quedada (aunque realmente les interesara la fiesta de después) y por haber estado en los momentos buenos y los malos.

A los amigos del pueblo o los digitales, que diría alguno: Chicano, Fidel, Fran Sparrow, Alberto, Bea, Lara, Rubén, Álvaro (una copia de la tesis va para ti), Jota e incluso Yeipi, ¿por qué no? Gracias por el apoyo, por la preocupación de cómo estaba en todo momento, por las quedadas, los juegos de mesa y las escape rooms. Y por supuesto a Juanjo, gracias por creer en mí incluso más que yo misma y darme un empujoncito cuando lo he necesitado.

Gracias Nintendo, por darme horas (quizá demasiadas) de entretenimiento, que han hecho más llevaderos momentos de estrés y a la vez han causado otros tantos e igualmente gracias a Yako y a Tundra por obligarme a parar, pasear y a tomar el aire y despejar la mente un rato cada tarde.

Y, por último, a mi padre, mi madre y mi hermana. Gracias por poder contar con vosotros absolutamente siempre, por animarme siempre a llegar lo más lejos posible, por vuestro apoyo y vuestra preocupación.

A mis padres

*“A veces la ciencia es más un arte que una ciencia, Morty,
muchos no la entienden.”*

-Rick Sánchez

Artículos originales de investigación

1. Autores: **Borja-Martínez M**, Lozano-Sánchez J, Borrás-Linares I, Pedreño MA, Sabater-Jara AB. 2020.
Título: Revalorization of broccoli by-products for cosmetic uses using supercritical fluid extraction.
Revista: *Antioxidants*.
Fecha: 2020
9:1-17. Impact factor: 5.014 Position: 10/139 (Q1).
2. Autores: Pedro Joaquín Sánchez Pujante; **María Borja Martínez**; María Ángeles Pedreño García; Lorena Almagro Romero.
Título: Biosynthesis and bioactivity of glucosinolates and their production in plant *in vitro* cultures.
Revista: *Planta*.
Fecha: 2017
246, pp. 19 - 32. Springer. Impact Factor: 3.361 Position: 30/212 (Q1).

Comunicaciones a congresos

1. Autores/as: Pedreño, MA, Belchí-Navarro, S, Sabater-Jara, AB, **Borja-Martínez, M**, Almagro, L.
Título: Cultivos celulares vegetales como fuente de producción de compuestos bioactivos
Congreso: V Congreso Internacional de Biotecnología y Biodiversidad (V CIBB)
Tipo de participación: Conferencia oral invitada.
Ámbito geográfico: Internacional
Lugar de celebración: *On line*.
Fecha: octubre 2020
2. Autores/as: S. Belchí-Navarro, L. Almagro, A.B. Sabater-Jara, **M. Borja-Martínez**, M.A. Pedreño
Título: Changes in the secretome of *Vitis vinifera* cv. Monastrell cell cultures treated with cyclodextrins and methyl jasmonate
Congreso: FESPB 21
Tipo de participación: Póster

Ámbito geográfico: Internacional

Lugar de celebración: *On line*.

Fecha: 28 junio - 1 Julio 2021

3. Autores/as: M.A. Pedreño, L. Almagro, S. Belchí-Navarro, **M. Borja-Martínez**, A.B.

Sabater-Jara

Título: Strategies to produce bioactive compounds from plant cell cultures

Congreso: XXIV Reunión de la Sociedad Española de Biología de Plantas y el XVII

Congreso Hispano-Luso de Biología de Plantas.

Tipo de participación: Ponencia oral

Ámbito geográfico: Internacional

Lugar de celebración: *On line*.

Fecha: 7-9 julio 2021

4. Autores/as **María Borja Martínez**; María Jesús Marín Marín; María Ángeles Pedreño

García; Ana Belén Sabater Jara

Título: Análisis del perfil génico y su relación con la producción de compuestos terpénicos en cultivos celulares de *Solanum lycopersicum* cv Micro Tom sometidos a elicitación

Congreso: XIII Reunión de la Sociedad Española de Cultivo In Vitro de Tejidos Vegetales

Tipo de participación: Póster

Ámbito geográfico: Nacional

Lugar de celebración: Vitoria, País Vasco, España

Fecha: 11-13 septiembre 2019

5. Autores/as: Pedro Joaquín Sánchez Pujante; Karla Daniela Pavón Ramón; Sarai Belchí

Navarro; Lorena Almagro Romero; Ana Belén Sabater Jara; **María Borja Martínez**; María Ángeles Pedreño García.

Título: Eventos de señalización en suspensiones celulares de brócoli elicidadas con coronatina

Congreso: XIII Reunión de la Sociedad Española de Cultivo In Vitro de Tejidos Vegetales

Tipo de participación: Póster

Ámbito geográfico: Nacional

Lugar de celebración: Vitoria, País Vasco, España

Fecha de celebración: 11-13 septiembre 2019

6. Autores/as: **María Borja Martínez**; María Ángeles Pedreño García; Ana Belén Sabater Jara.

Título: Estudio de la citotoxicidad de extractos de subproductos de la industria del brócoli

Congreso: V Jornadas Doctorales

Tipo de participación: Ponencia oral

Ámbito geográfico: Nacional

Lugar de celebración: Murcia, Región de Murcia, España

Fecha: 29-31 mayo 2019

7. Autores/as: Pedro Joaquín Sánchez Pujante; Matteo Gionfriddo; Cecilia Pugliese; Sarai Belchí Navarro; Ana Belén Sabater Jara; **María Borja Martínez**; Lorena Almagro Romero; Pedro Díaz Vivancos; María Ángeles Pedreño García.

Título: Producción de compuestos bioactivos y análisis del estrés oxidativo en cultivos celulares de brócoli elicitados

Congreso: V Jornadas Doctorales

Tipo de participación: Ponencia oral

Ámbito geográfico: Nacional

Lugar de celebración: Murcia, Región de Murcia, España

Fecha: 29-31 mayo 2019

8. Autores/as: **María Borja Martínez**; Pedro Joaquín Sánchez Pujante; María Ángeles Pedreño García; Ana Belén Sabater Jara.

Título: Nuevos métodos de extracción de compuestos bioactivos a partir de subproductos del brócoli

Congreso: I Congreso de jóvenes investigadores en ciencias agroalimentarias

Tipo de participación: Póster

Ámbito geográfico: Nacional

Lugar de celebración: Almería, Andalucía, España

Fecha: 20 diciembre 2018

9. Autores/as: Pedro Joaquín Sánchez Pujante; Matteo Gionfriddo; Sarai Belchí Navarro; Ana Belén Sabater Jara; **María Borja Martínez**; Lorena Almagro Romero; Pedro Díaz Vivancos; María Ángeles Pedreño García.

Título: Análisis de la producción de compuestos bioactivos en cultivos celulares de brócoli

Congreso: I Congreso de Jóvenes Invetigadores en ciencias agroalimentarias

Tipo de participación: Póster

Ámbito geográfico: Nacional

Lugar de celebración: Almería, Andalucía, España

Fecha: 20 diciembre 2018

- 10.** Autores/as: **María Borja Martínez**; Pedro Joaquín Sánchez Pujante; María Ángeles Pedreño García; Ana Belén Sabater Jara.

Título: Characterization of bioactive compounds in broccoli industry byproducts

Congreso: ANQUE International Congress of Chemistry "foods and beverages"

Tipo de participación: Ponencia oral

Ámbito geográfico: Nacional

Lugar de celebración: San Pedro del Pinatar, Región de Murcia, España

Fecha: 17-20 junio 2018

- 11.** Autores/as: **María Borja Martínez**; Pedro Joaquín Sánchez Pujante; María Ángeles Pedreño; Ana Belén Sabater Jara.

Título: Caracterización de compuestos bioactivos en subproductos de la industria del brócoli

Congreso: IV Jornadas Doctorales

Tipo de participación: Ponencia oral

Ámbito geográfico: Nacional

Lugar de celebración: Murcia, Región de Murcia, España

Fecha: 29-31 mayo 2018

- 12.** Autores/as: Pedro Joaquín Sánchez Pujante; Jorge Cerón Hernández; Sarai Belchí Navarro; Ana Belén Sabater Jara; **María Borja Martínez**; María Isabel Navarro Mendoza; Pilar Hellín; Pilar Flores; Lorena Almagro; María Ángeles Pedreño.

Título: Producción de compuestos bioactivos y análisis de la expresión génica en cultivos celulares de brócoli

Congreso: IV Jornadas Doctorales

Tipo de participación: Ponencia oral

Ámbito geográfico: Nacional

Ciudad de celebración: Murcia, Región de Murcia, España

Fecha: 29-31 mayo 2018

- 13.** Autores/as: Pedro Joaquín Sánchez Pujante; Jorge Cerón Hernández; Ana Belén Sabater Jara; Sarai Belchí Navarro; **María Borja Martínez**; María Ángeles Pedreño García; Lorena Almagro.

Título: Effect of coronatine on glucosinolate production and the gene expression involved in their biosynthesis pathway in *Brassica oleracea* var. italica cell cultures.

Congreso: XIII Simposio Internacional de Biotecnología Vegetal

Tipo de participación: Póster

Ámbito geográfico: Internacional

Lugar de celebración: La Habana, Cuba

Fecha: 08-11 mayo 2018

- 14.** Autores/as: Lorena Almagro Romero; Carlos Cerón; Ana Belén Sabater Jara; Begoña Miras Moreno; Pedro Joaquín Sánchez Pujante; **María Borja Martínez**; María Isabel González Sánchez; Edelmira Valero Ruiz; María Ángeles Pedreño García.

Título: Effect of elicitors on the antioxidant activity of different plant cell cultures

Congreso: 18th Biotechnology Congress

Tipo de participación: Póster

Ámbito geográfico: Internacional

Lugar de celebración: Nueva York, Estados Unidos de América

Fecha: 19-20 octubre 2017

- 15.** Autores/as: Begoña Miras Moreno; Ana B. Sabater Jara; Pedro J. Sánchez Pujante; Sarai Belchí Navarro; Lorena Almagro; **María Borja Martínez**; María A. Pedreño.

Título: Elicitation of carrot cell cultures to increase a-tocopherol and phenolic compounds

Congreso: 3rd International Conference on natural products utilization: from plants to pharmacy shelf

Tipo de participación: Póster

Lugar de celebración: Bansko, Bulgaria

Fecha: 18-21 octubre 2017

- 16.** Autores/as: Ana B. Sabater Jara; Pedro J. Sánchez Pujante; Sarai Belchí Navarro; Lorena Almagro; Begoña Miras Moreno; **María Borja Martínez**; Laura Di Patria; María A. Pedreño.
- Título: Enhancement of triterpenoid compounds in *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom elicited cell cultures
- Congreso: 3rd International Conference on natural products utilization: from plants to pharmacy shelf
- Tipo de participación: Póster
- Ámbito geográfico: Internacional
- Lugar de celebración: Bansko, Bulgaria
- Fecha: 18-21 octubre 2017
-
- 17.** Autores/as: Begoña Miras Moreno; **María Borja Martínez**; Lorena Almagro Romero; María Ángeles Pedreño García; Ana Belén Sabater Jara.
- Título: Enhanced accumulation of phytosterols and phenolic compounds in cyclodextrin-elicited cell suspension cultures of *Daucus carota*
- Congreso: Biotec 2017
- Tipo de participación: Póster
- Ámbito geográfico: Nacional
- Lugar de celebración: Murcia, Región de Murcia, España
- Fecha de celebración: 18-21 junio 2017
-
- 18.** Autores/as: Carmen Irene Mendoza Cabezas; **María Borja Martínez**; Begoña Miras Moreno; Rosa Cruz Ruiz; Ana Belén Sabater Jara; María Ángeles Pedreño García.
- Título: Production of bioactive compounds in elicited cell suspension cultures of *Punica granatum*.
- Congreso: Biotec 2017
- Tipo de participación: Póster
- Ámbito geográfico: Nacional
- Lugar de celebración: Murcia, Región de Murcia, España
- Fecha de celebración: 18-21 junio 2017
-
- 19.** Autores/as: Pedro Joaquín Sánchez Pujante; Sarai Belchí Navarro; Ana Belén Sabater Jara; **María Borja Martínez**; Pilar Hellín; Pilar Flores; Lorena Almagro Romero; María Ángeles Pedreño García.

Título: Producción de compuestos bioactivos en cultivos celulares de *Brassica oleracea* var. Italica

Congreso: III Jornadas Doctorales

Tipo de participación: Ponencia oral

Ámbito geográfico: Nacional

Lugar de celebración: Murcia, Región de Murcia, España

Fecha: 30 mayo-1 junio 2017

- 20.** Autores/as: Pedro Joaquín Sánchez Pujante; **María Borja Martínez**; Sarai Belchí Navarro; Juan Francisco Sánchez López; M^aÁngeles Pedreño; Lorena Almagro.

Título: Bioproduction of bioactive compounds obtained from elicited broccoli cell cultures

Congreso: 2nd International Conference on Nutraceuticals and Nutrition Supplements

Tipo de participación: Póster

Ámbito geográfico: Internacional

Lugar de celebración: Bangkok, Tailandia

Fecha: 18-20 julio 2016

- 21.** Autores/as: Pedro Joaquín Sánchez Pujante; Lorena Almagro; **María Borja Martínez**; Sarai Belchí Navarro; Ana Jiménez; Francisca Sevilla; M^a Ángeles Pedreño.

Título: Effect of elicitors on the production of antioxidant compounds and redox proteins in broccoli cell cultures

Congreso: 2nd International Conference on Nutraceuticals and Nutrition Supplements

Tipo de participación: Póster

Ámbito geográfico: Internacional

Lugar de celebración: Bangkok, Tailandia

Fecha: 18-20 julio 2016

- 22.** Autores/as: M^a Ángeles Pedreño; **María Borja Martínez**; Lorena Almagro; María Victoria Alarcón; Esther Novo Uzal.

Título: Effect of irrigation and crop level on skin peroxidases from *Vitis vinifera* L. cv Tempranillo

Congreso: XIV Congreso Hispano Luso de Fisiología Vegetal

Tipo de participación: Póster

Ámbito geográfico: Internacional

Lugar de celebración: Toledo, Castilla-La Mancha, España

Fecha: 14-17 junio 2015

23. Autores/as: Francisco Fernández-Pérez, María **Borja Martínez**, Herrero J, Pomar F,

Pedreño MA, Novo-Uzal E

Título: Characterizing syringyl peroxidases using Arabidopsis mutants

Congreso: Oxizymes Vienna

Tipo de participación: Ponencia oral

Ámbito geográfico: Internacional

Lugar de celebración: Viena, Austria

Fecha de celebración: 1-4 julio 2014

Patentes

1. Autores: Ana Belén Sabater Jara; Pedro Joaquín Sánchez Pujante; María Borja Martínez;

María Ángeles Pedreño García

Título de la propiedad industrial registrada: Procedimiento para incrementar la producción de glucosinolatos en cultivos celulares

Entidad titular de derechos: Agrícola Santa Eulalia S.L. y Universidad de Murcia

N.º de solicitud: 201730836

País de inscripción: España, Región de Murcia

Fecha de registro: 23/06/20

Índice

Abreviaturas	i
Introducción	1
1. Subproductos vegetales y economía circular	3
1.1 Subproductos y residuos.....	3
1.2 Problemática actual	4
2. Economía circular como estrategia de valorización de subproductos	8
2.1 Importancia de los subproductos	8
2.2 Economía circular y nuevas estrategias de valorización de subproductos vegetales.....	9
3. El brócoli.	12
3.1 Distribución y producción de cultivos de brócoli	15
3.2 Compuestos bioactivos e importancia del brócoli	17
3.3 Uso de subproductos del brócoli como fuente de compuestos bioactivos	25
4. Tecnologías de extracción verde para la obtención de compuestos bioactivos a partir de subproductos de la industria agroalimentaria.....	28
4.1 Técnicas de extracción convencionales	29
4.2 Técnicas de extracción “verdes”	30
5. Revalorización de los subproductos del brócoli.....	34
5.1 Alimentación	34
5.2 Industria farmacéutica	38
5.3 Cosmética.....	40
Objetivos	43
Material y métodos	47
1. Material vegetal	49
1.1 Optimización del secado de los subproductos	49
2. Técnicas extractivas de compuestos bioactivos.....	51
2.1 Extracción convencional (EC)	51
2.2 Extracción de compuestos hidrosolubles sin el uso de disolventes orgánicos	51
2.3 Extracción mediante fluidos supercríticos (SFE).....	52
2.4 Extracción mediante fluidos presurizados (PLE).....	52
3. Cuantificación de compuestos bioactivos	53
3.1 Fitoesteroles y α -tocoferol	53
3.2 Clorofilas y carotenoides.....	54
3.3 Compuestos fenólicos.....	54
3.4 Glucosinolatos	54
4. Determinación de la capacidad antioxidante de los extractos	55

Índice

5.	Ensayos de bioactividad de los extractos en cultivos celulares humanos.....	55
5.1	Líneas celulares y condiciones de cultivo.....	55
5.2	Caracterización del crecimiento de las líneas celulares.....	57
5.3	Ensayos de viabilidad celular.....	58
5.4	Ensayo de migración celular.....	62
5.5	Determinación de la producción intracelular de especies reactivas de oxígeno	63
5.6	Determinación de la expresión de genes relacionados con la inflamación	64
6.	Análisis estadístico	66
	Resultados y discusión	67
	Capítulo 1: Optimización de la extracción de compuestos bioactivos a partir de subproductos del brócoli	69
1.	Antecedentes y objetivos	71
2.	Preparación y acondicionamiento de los subproductos de brócoli para la extracción de sus compuestos bioactivos	73
2.1	Recolección de muestras	73
2.2	Optimización del proceso de secado de las muestras	73
3.	Caracterización del contenido en compuestos bioactivos de los subproductos de brócoli.....	75
3.1	Cuantificación de los compuestos obtenidos por extracción convencional	75
3.2	Extracción y cuantificación de los compuestos bioactivos hidrosolubles sin el uso de disolventes orgánicos	82
3.3	Cuantificación de los compuestos obtenidos por extracción mediante fluidos supercríticos.....	85
3.4	Cuantificación de los compuestos obtenidos por extracción mediante fluidos presurizados.....	94
	Capítulo 2. Aplicación de los extractos obtenidos de subproductos de brócoli en la industria cosmética	101
1.	Antecedentes y objetivos	103
2.	Caracterización del crecimiento de la línea celular de queratinocitos HaCaT.....	106
2.1	Curva de crecimiento de HaCaT	107
3.	Estudios de citotoxicidad de los extractos y de la luz UV-B.....	109
3.1	Citotoxicidad de los disolventes	109
3.2	Citotoxicidad de los extractos de Naxos obtenidos mediante fluidos supercríticos.....	110
3.3	Citotoxicidad de la luz UV-B	112

3.4	Citotoxicidad de la luz UV-B en queratinocitos pretratados con extractos optimizados obtenidos mediante fluidos supercríticos a partir de subproductos de brócoli.....	113
4.	Aplicaciones cosméticas de los extractos en células de queratinocitos.....	115
4.1	Efecto de los extractos de subproductos de brócoli sobre la producción intracelular de ROS en queratinocitos HaCaT expuestos a UV-B.....	115
4.2	Efecto de los extractos de subproductos de brócoli sobre la expresión de genes relacionados con la inflamación en queratinocitos HaCaT expuestos a luz UV-B	117
4.3	Reparación de heridas piel.....	123
Capítulo 3: Revalorización de los subproductos del brócoli como ingredientes de la industria nutracéutica		131
1.	Antecedentes y objetivos	133
2.	Estudios de citotoxicidad de los extractos y del LPS	136
2.1	Citotoxicidad del extracto enriquecido en glucosinolatos sobre la línea celular CCD-18Co.....	136
2.2	Citotoxicidad del LPS.....	137
3.	Aplicaciones nutracéuticas de los extractos enriquecidos en glucosinolatos en células de colon.....	139
3.1	Efecto de los extractos de subproductos de brócoli sobre la producción intracelular de ROS en miofibroblastos CCD-18Co estimulados con lipopolisacárido.....	139
3.2	Efecto de los extractos de subproductos de brócoli sobre la expresión de genes relacionados con la inflamación en miofibroblastos de colon CCD-18Co estimulados con lipopolisacárido.....	141
Conclusiones		149
Bibliografía		153
Anexo		183
1.	Aplicación de los extractos en el sector de la alimentación	185
2.	Extracción y cuantificación de los compuestos bioactivos hidrosolubles sin el uso de disolventes orgánicos.....	187
2.1	Análisis nutricional del extracto obtenido mediante extracción sin el uso de disolventes orgánicos	188
3.	Incorporación de los extractos procedentes de la extracción sin el uso de disolventes orgánicos de los subproductos de brócoli en alimentos.....	189
3.1	Elaboración de un humus con extracto de subproductos de brócoli	189
3.2	Elaboración de una crema de verduras con subproductos de brócoli	191
Bibliografía Anexo.....		193

Abreviaturas

ABTS: 2,2'-azino-bis [3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico]-sal de diamonio

ACC: acetil-CoA carboxilasa

AGE: productos finales de glicación avanzada

AMPK: proteína quinasa activada por AMP

ARE: elementos de respuesta antioxidante

ASE: extracción acelerada con solventes

ATCC: Colección de Cultivos Americana

CCD: diseño compuesto central

COVID-19: enfermedad por coronavirus de 2019

COX: ciclooxigenasa

CTC: Centro Tecnológico Nacional de la Conserva y Alimentación

CV: coeficiente de variación

DCF-DA: 3',6'- diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína

DE: desviación estándar

DMEM: medio esencial de Eagle modificado de Dubelcco

DMSO: dimetilsulfóxido

DT: tiempo de duplicación

EAE: extracción asistida por enzimas

EC: extracción convencional

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

EFSA: Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria

EII: enfermedad inflamatoria intestinal

EMEM: medio mínimo esencial de Eagle

ESI: ionización por electrospray

FAE: equivalentes de ácido ferúlico

FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura

FDA: Administración de Alimentos y Medicamentos

FRAP: poder de reducción antioxidante del ión férrico

GAE: equivalentes de ácido gálico

GAPDH: gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa

Abreviaturas

GRAS: generalmente reconocidos como seguros

GSH: glutatión reducido

GSL: glucosinolatos

GtCO₂ eq: gigatoneladas de equivalentes de CO₂

HO-1: hemo-oxigenasa 1

HRP VI: peroxidasa de rábano VI

ICAM-1: molécula de adhesión intercelular 1

IL: interleuquina

ILE: extracción con líquidos iónicos

iNOS: óxido nítrico sintasa inducible

Keap1: proteína 1 asociada a ECH similar a Kelch

LBP: proteína de unión al LPS

LDL: lipoproteína de baja densidad

LPS: lipopolisacárido

MAE: extracción asistida por microondas

MCP-1: proteína quimioatrayente de monocitos-1

MMP-9: metaloproteasa de matriz-9

MTT: bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio

NAD(P)H: nicotina adenina dinucleótido (fosfato) reducido

NF-κB: factor nuclear potenciados de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas

NIST: Instituto Nacional de Estándares y Tecnología

NO: óxido nítrico

NQO1: quinona oxidoreductasa 1

Nrf2: factor nuclear eritroide-2 relacionado con el factor 2

NX: Naxos

PBS: tampón fosfato salino

Pc: Presión crítica

PEF: extracción de campos eléctricos pulsados

PF: peso fresco

PGE2: prostaglandina E2

PLE: extracción mediante fluidos presurizados

PS: peso seco

PT: Parthenon

QE: equivalentes de quercetina

RE: rendimiento de extracción

RFU: unidades relativas de fluorescencia

ROS: especies reactivas de oxígeno

RSLDE: extracción dinámica de líquido sólido rápido

RSM: metodología de superficie de respuesta

SBF: suero bovino fetal

SFE: extracción mediante fluidos supercríticos

SFN: sulforafano

Tc: temperatura crítica

TEAC: capacidad antioxidante en equivalentes de Trolox

TEER: resistencia eléctrica transepitelial

TLR-4: receptor de tipo Toll 4

TNF- α : Factor de necrosis tumoral α

UAE: extracción asistida por ultrasonidos

UV: Ultravioleta

VCAM-1: molécula de adhesión celular vascular 1

Introducción

1. Subproductos vegetales y economía circular

De acuerdo con las Naciones Unidas, se calcula que la población mundial aumentará en los próximos años hasta alcanzar la cifra de 9.700 millones de personas en el año 2050. Esta perspectiva de futuro plantea serias preocupaciones sobre el consumo mundial de biomasa, combustibles fósiles, metales y minerales, lo que llevará a un incremento de la producción de residuos, que siguiendo la tendencia actual, aumentará un 70 % en los próximos 40 años (Chiocchio et al., 2021). La demanda del aumento de producción de alimentos ha venido promoviendo un incremento en la generación de residuos agroindustriales (Freitas et al., 2021). Dentro de la producción de residuos, se conoce que la industria agrícola es la principal productora de residuos cada año. Esta industria es la responsable de la producción de residuos como cáscaras procedentes de las industrias de cereales, pulpa de café procedente de las empresas de café, pieles de frutas y verduras, entre otros muchos ejemplos (Yaashikaa et al., 2022). En este marco, la evaluación de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) de 2011 sobre las pérdidas y el desperdicio de alimentos a nivel mundial estimó que cada año, un tercio de todos los alimentos producidos en el mundo para el consumo humano nunca llegan a la mesa del consumidor (FAO, 2015).

1.1 Subproductos y residuos

Antes de continuar, para la comprensión de este trabajo, es importante distinguir entre el significado de subproducto y de residuo y sus diferencias ya que, aunque ambos términos pueden resultar sinónimos, en realidad hacen referencia a dos conceptos diferentes.

Según el artículo 4 de la ley 22/2011 del Boletín Oficial del Estado (BOE) del país (España) del 28 de julio, de residuos y suelos contaminados, se define un subproducto como “una sustancia u objeto, resultante de un proceso de producción, cuya finalidad primaria no sea la producción de esa sustancia u objeto”. En cambio, en el artículo 3 del mismo, se define residuo como “cualquier sustancia u objeto que su poseedor deseché o tenga la intención o la obligación de desechar”. En cuanto al término residuo también se diferencian entre diferentes tipos, siendo la definición de residuo industrial aquellos “residuos resultantes de los procesos de fabricación, de transformación, de utilización, de consumo, de limpieza o de mantenimiento generados por la actividad industrial, excluidas las emisiones a la atmósfera reguladas en la Ley 34/2007, de 15 de noviembre”. Es decir, se podría hablar de subproducto como la parte restante de la producción de un producto principal obtenido después de haber sometido a este último a un

Introducción

procesamiento, sin ser la parte que se quiere obtener. Si, finalmente, después de este paso, hay una parte que no se quiere o no se puede reutilizar, se consideraría residuo.

Así, teniendo en cuenta estas diferencias, también se estipulan en la misma Ley las condiciones para que tras el proceso de valorización de los residuos, incluido el reciclado, estos pasen a ser considerados como subproductos. A los efectos de lo dispuesto en esta Ley deben cumplirse las siguientes condiciones:

- a) que la sustancia u objeto tenga una utilidad posterior,
- b) que la sustancia u objeto se pueda utilizar directamente sin que sea necesario someterlo a una transformación posterior diferente a la de la práctica industrial habitual,
- c) que la sustancia u objeto se obtenga como parte integrante de un proceso de producción, y
- d) que su uso cumpla todos los requisitos pertinentes relativos a los productos, así como a la protección de la salud humana y del medio ambiente, sin que produzca impactos generales adversos para la salud humana o el medio ambiente.

En este sentido, los desechos agrícolas se pueden definir como los subproductos producidos durante el cultivo y procesamiento de productos agrícolas como frutas, verduras, etc. (Senthilkumar et al., 2020). Por lo tanto, según el contexto al que nos refiramos, en una industria, una determinada materia puede ser considerada como un subproducto y para otra, una materia prima.

1.2 Problemática actual

La generación y acumulación de desperdicios de la industria de la alimentación (Figura 1) implica un impacto significativo en la biodiversidad, la salud humana y el cambio climático (Osorio et al., 2021). Es por esta razón que los subproductos y desechos de las industrias agroalimentarias están acaparando la atención internacional, principalmente, por estos temas relacionados con la contaminación. El hecho del aumento de la generación de estos subproductos implica también un aumento en la explotación innecesaria del medio ambiente y de recursos naturales como el agua y la tierra. La FAO en su informe del 2013 sobre la huella del desperdicio alimentario y el impacto en los recursos naturales determinó que casi el 30 % de las tierras agrícolas del mundo se utilizan para producir alimentos que finalmente se pierden o desperdician, lo que conlleva una contaminación adicional y la emisión de gases de efecto invernadero, emisiones sin un propósito real (Mateos-Aparicio, 2020; Chiocchio et al., 2021).

Las pérdidas y desperdicios de la industria agrícola y del procesamiento y fabricación de alimentos se producen a lo largo de toda la cadena de producción. En concreto, en las fases de procesamiento de los cultivos, la separación de las partes comestibles de las partes no comestibles genera una enorme cantidad de desrío, entre los que se incluyen principalmente desechos orgánicos como bagazo, peladuras de frutas y verduras, frutas o vegetales de baja calidad, producciones rechazadas y abandonadas en el campo, productos con escaso o nulo valor comercial y otras partes no comestibles/comercializables (Senthilkumar et al., 2020). También se generan estos subproductos debido a daños durante el transporte o a causa de sistemas de transporte inadecuados, problemas durante el almacenamiento, pérdidas o contaminaciones durante el procesamiento, embalaje inapropiado, etc. (Giroto et al., 2015; Mateos-Aparicio, 2020).



Figura 1. Ejemplo de vertedero donde se acumulan desperdicios de los sectores de la agricultura y la alimentación.

A nivel global, existe un patrón claramente visible; en las regiones de altos ingresos o países desarrollados, donde las preferencias estéticas y las fechas de caducidad arbitrarias son factores que contribuyen al desperdicio de alimentos, los volúmenes de alimentos desperdiciados son mayores en las etapas de procesamiento, distribución y consumo. Sin embargo, en los países de bajos ingresos o en vías de desarrollo, las pérdidas de alimentos ocurren mayoritariamente en las etapas de producción y postcosecha debido a la falta de infraestructura y de conocimiento sobre el almacenamiento y manejo adecuado de los alimentos, lo cual, combinado con condiciones climáticas desfavorables, favorece el deterioro de los alimentos. Estos subproductos representan un importante problema de eliminación (FAO, 2015; Gupta, et al.,

Introducción

2015). Asia, Europa y América del Norte resultaron ser los mayores contribuyentes en la producción y acumulación de estos subproductos (Banerjee et al., 2017).

En conclusión, la generación de subproductos a nivel mundial es mucho mayor en los países desarrollados en los que cada año se producen alrededor de 198,9 kg per cápita de desperdicios en la industria alimentaria. Por ejemplo, en los Estados Unidos, las pérdidas y desechos de alimentos englobaron el 40 % de toda la cadena de producción de alimentos mientras que el conjunto del norte de África y Asia occidental y central representaron el 32 % del volumen mundial de estos desechos. En tercer lugar se encuentra el continente europeo que sumó un 20 % de las pérdidas y desechos de alimentos generados a nivel mundial, mientras que el desperdicio de alimentos en América Latina se estimó en un 6 % del total mundial (Osorio et al., 2021).

En cuanto a las formas que tiene la industria de deshacerse de estos subproductos, actualmente se estila de forma generalizada su uso como alimento para ganado, ya que de esta forma se reduce la dependencia externa de los alimentos, minimizando así el uso de la tierra, el agua y los suministros asociados a la alimentación del ganado, además de reducir los costes de alimentación de los animales, que normalmente superan el 60 % de los costes totales de una finca. En caso de no usarse para alimentación de ganado se suelen eliminar incinerándolos o llevándolos a vertederos (Gupta et al., 2015; Monllor et al., 2020). La incineración es uno de los métodos más utilizados para deshacerse de los residuos en países en vías de desarrollo (que carecen de alternativas viables para la recuperación y reutilización de estos desechos), sin embargo, debido al contenido de humedad de las frutas y hortalizas, esta no es considerada una manera viable ni eficiente para su eliminación (Freitas et al., 2021). De esta forma surge también el vertido como una forma estándar de eliminación de residuos, aunque se considere la manera menos económica de abordar el problema. Es más, el vertido también se encuentra asociado a riesgos de emisiones de gases de efecto invernadero (FAO, 2015). En este aspecto, según los cálculos realizados por la FAO, se cuantificó la huella de carbono del desperdicio de alimentos en los recursos naturales en 3,3 gigatoneladas de equivalentes de CO₂ (GtCO₂ eq) en 2007, cifra que aumentó hasta las 3,6 GtCO₂ eq en el año 2011. Si a esta cifra se le sumaran las 0,8 GtCO₂ eq de la deforestación asociada al desperdicio de alimentos, obtendríamos que la huella de carbono total del desperdicio de alimentos, incluido el cambio de uso de la tierra, es de alrededor de 4,4 GtCO₂ eq por año. Teniendo en cuenta estos datos, se puede decir que si el desperdicio de alimentos fuera un país, se encontraría en tercer lugar en la producción anual de CO₂, por detrás de China y Estados Unidos, respectivamente (FAO, 2015). Parte de estos gases

de efecto invernadero generados se deben, en parte, al metano y al óxido nitroso producidos por la descomposición de los desechos dentro de los vertederos (Banerjee et al., 2017). Este hecho se considera muy perjudicial para el medio ambiente y para la conservación del planeta. De la acumulación de estos residuos en los vertederos surgen serios problemas como la contaminación del agua, malos olores, combustión, daños a la vegetación ubicada en los alrededores y las ya comentadas emisiones de gases de efecto invernadero. Por lo tanto, el problema de eliminar los desechos de alimentos se está volviendo cada vez más grave a nivel global (Gupta et al., 2015).

Otro de los impactos negativos de la sobreproducción de alimentos y la mala gestión de los residuos es en la economía, ya que produce pérdidas de dinero en los diferentes niveles de la cadena de suministro. Por ello, una reducción en la generación de desechos tiene el potencial de generar un valor económico considerable (Chiocchio et al., 2021). En este sentido, la generación de desechos a lo largo de la cadena de suministro mundial, en 2019 se cuantificó en aproximadamente 1.300 millones de toneladas con un costo de más de 1 billón de dólares, lo que supone un gasto de dinero enorme a nivel mundial para su eliminación (Esposito et al., 2020). En Europa, para eliminar 1 tonelada de residuos sólidos es necesario un gasto de entre 28 y 60 euros (Banerjee et al., 2017). Esto no solo significa una oportunidad desperdiciada para la economía y la seguridad alimentaria, sino también un malgasto de todos los recursos naturales utilizados para cultivar, procesar, envasar, transportar y comercializar alimentos.

Actualmente, los patrones de consumo insostenibles, como es el modelo económico basado en la economía lineal, concretamente el paradigma de comprar-usar-tirar, es ampliamente criticado por su insostenibilidad puesto que ejerce efectos negativos sobre el equilibrio del ecosistema. Así, la gestión de los subproductos, considerados como un problema en diversos ámbitos, ha pasado a considerarse una nueva diana para la creación de estrategias novedosas en el desarrollo de procesos industriales sostenibles (Freitas et al., 2021).

Por todo ello, se debe incidir en la importancia del aprovechamiento de una parte que aún sirve y que nos llevaría a la generación de una menor cantidad de residuos; los cuales hoy en día suponen un grave problema debido a su acumulación, generando altos costes para su eliminación y un impacto negativo elevado por la contaminación del medio ambiente.

2. Economía circular como estrategia de valorización de subproductos

2.1 Importancia de los subproductos

La gestión adecuada de los desechos es un cambio necesario para la economía actual y decisivo para lograr un sistema agroalimentario sostenible. Aunque no existe mucha información acerca de los subproductos como fuentes de compuestos de interés que podrían ser usados en la industria alimentaria (Moreno et al., 2006), las investigaciones llevadas a cabo hasta la fecha demuestran que los subproductos de la industria agroalimentaria son fuentes prometedoras de compuestos que pueden utilizarse en otros sectores debido a sus propiedades nutricionales y medicinales. Por ello, la economía circular -en la que el objetivo es reintroducir los subproductos y desechos a la línea de producción como materia prima para la obtención de nuevos productos con altos beneficios para la salud y valor añadido- ofrece un elevado potencial ya que supone una opción eficiente a medio y largo plazo para reducir, reutilizar o recuperar los recursos naturales y los subproductos derivados de la cadena de alimentación. Además, la implementación de la economía circular en el aprovechamiento de estos subproductos podría considerarse una de las claves para reducir la contaminación ambiental. Para ello, se deben diseñar estrategias y tecnologías sostenibles para la extracción de los compuestos aprovechables por su interés nutricional (Gupta et al., 2015; Osorio et al., 2021; Scarano et al., 2022).

Gran parte de los subproductos generados en la industria alimentaria está constituida por las porciones vegetales que se eliminan porque carecen de interés comercial, aunque poseen una composición nutricional de gran potencial para otras industrias o para la elaboración de otros productos (Giroto et al., 2015). Dependiendo del tipo de materia prima que se procese, el tipo de producto que se elabore y la técnica de producción utilizada, se obtienen desechos y subproductos diferentes entre sí en parámetros como la cantidad generada o la composición química (Mateos-Aparicio, 2020). Por ejemplo, en cuanto a su composición, los desechos agrícolas consisten principalmente en polisacáridos y compuestos fenólicos, entre otros (Senthilkumar et al., 2020). Algunas investigaciones han demostrado una fuerte correlación entre las propiedades terapéuticas de estos compuestos y sus efectos beneficiosos para la salud o para la prevención de enfermedades, debido a la amplia gama de acciones farmacológicas entre las que se incluyen actividades antitumorales, antivirales, antibacterianas, cardioprotectoras y antimutagénicas que presentan dependiendo de los compuestos presentes en ellos (Gupta et al., 2015). En este marco, podemos enfocarnos en el procesado de las industrias de frutas y hortalizas que generan residuos con altas concentraciones de fibras

dietéticas y metabolitos secundarios como los polifenoles, que pueden ser utilizados para desarrollar suplementos dietéticos y diseñar nuevos alimentos funcionales. La producción de ingredientes bioactivos y/o aditivos alimentarios novedosos a partir de desechos y subproductos alimentarios puede generar beneficios económicos principalmente para la industria alimentaria y contribuir a reducir algunos problemas nutricionales de la población (Mateos-Aparicio, 2020).

Si bien la materia orgánica presente en los subproductos agroindustriales es una fuente interesante de componentes valiosos, hasta la fecha no existen muchas tecnologías capaces de extraer, purificar y concentrar estos compuestos y que lo hagan de manera escalable y eficiente para abarcar las grandes cantidades de subproductos que se generan (Freitas et al., 2021).

2.2 Economía circular y nuevas estrategias de valorización de subproductos vegetales

El modelo actual de economía es lineal y se basa en un modelo heredado de la revolución industrial que, bajo la premisa de la oferta constante de productos con una vida útil corta, ha obligado a la realización de una producción continua para satisfacer las necesidades constantes de los consumidores. Este tipo de economía incrementa el uso indiscriminado de recursos naturales, que son limitados, lo que podría dar paso a una importante crisis ambiental y económica (Osorio et al., 2021). Es por este motivo, por lo que se plantea el rediseño del tradicional camino económico lineal de producción y consumo y sustituirlo por un sistema de economía circular que se perfila como una posible estrategia para superar estos problemas derivados del sistema lineal (Figura 2).

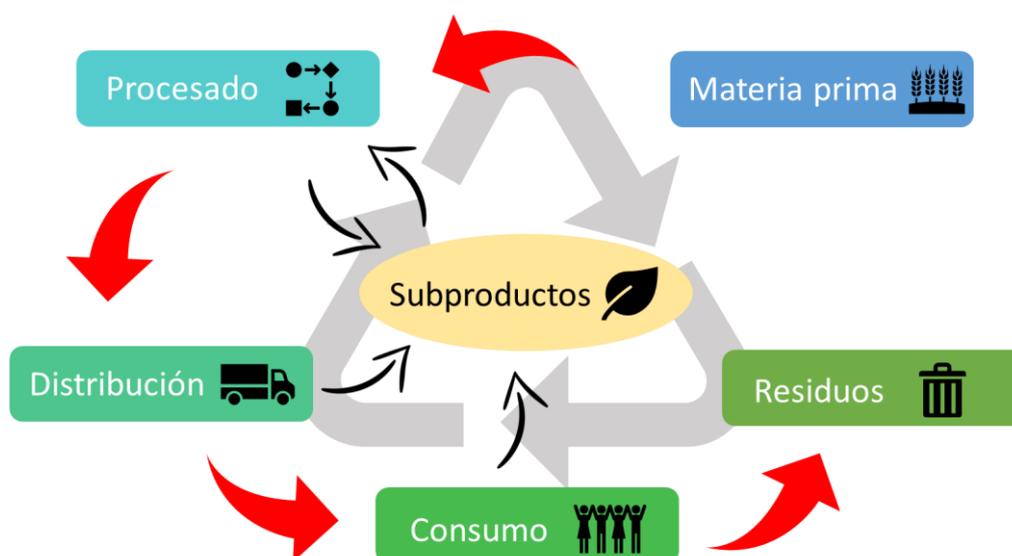


Figura 2. Esquema del modelo de economía lineal actual (flechas rojas) y el rediseño circular propuesto para la recuperación de los subproductos como nuevas fuentes de materia prima (flechas negras).

Introducción

Es decir, la finalidad de la economía circular se centra en generar un crecimiento sostenible en todo el mundo, que permita transformar los residuos generados en la cadena de producción de la industria agroalimentaria en nuevos productos con valor añadido. Esto se traduciría en una mejora tanto de la empleabilidad en el sector, como en la sostenibilidad del sistema agroalimentario, proponiendo la reutilización y reciclaje de residuos y subproductos para devolverlos a la cadena productiva (Mateos-Aparicio, 2020).

La creciente atención que prestan responsables políticos, organizaciones no gubernamentales, académicos y los propios consumidores a una economía circular y de residuo cero ha llevado a las empresas agroalimentarias a incorporar sistemas cada vez más sostenibles e innovadores a sus estrategias de producción y eliminación de residuos. Este hecho, además de resolver el problema de la eliminación de los desechos de la industria, genera nuevas oportunidades para la investigación y el desarrollo tecnológico (Esposito et al., 2020; Freitas et al., 2021). Así, para resolver los problemas de generación de desperdicios y pérdida de alimentos que resultan en una producción elevada de residuos, sería interesante la aplicación de las bases de la economía circular en las industrias agrícolas y alimentarias (Esposito et al., 2020). Algunos de los procesos de valorización de los subproductos de la industria agroalimentaria se dirigen hacia la generación de biocombustibles, producción de compost para el abono de los campos de cultivo o la extracción de los compuestos de alto valor añadido, entre otros (Figura 3) (Giroto et al., 2015).

La valorización de los subproductos como aditivos para la mejora del suelo es ampliamente usado en muchos países. El compostaje y el uso de carbón vegetal se han utilizado para mejorar la productividad de los campos durante siglos, aunque las técnicas se han ido modernizando, por ejemplo, mediante pirólisis, que produce el llamado biocarbón. Este elemento es capaz de proporcionar beneficios al suelo al que se aplica como el secuestro de carbono, mejorar la calidad del suelo ácido al aumentar su pH o del hábitat de los microorganismos. Algunas ventajas que presenta esta técnica de economía circular partiendo de subproductos de la industria agroalimentaria, en comparación con el compostaje, es que reduce de manera significativa la emisión de gases de efecto invernadero (Banerjee et al., 2017).

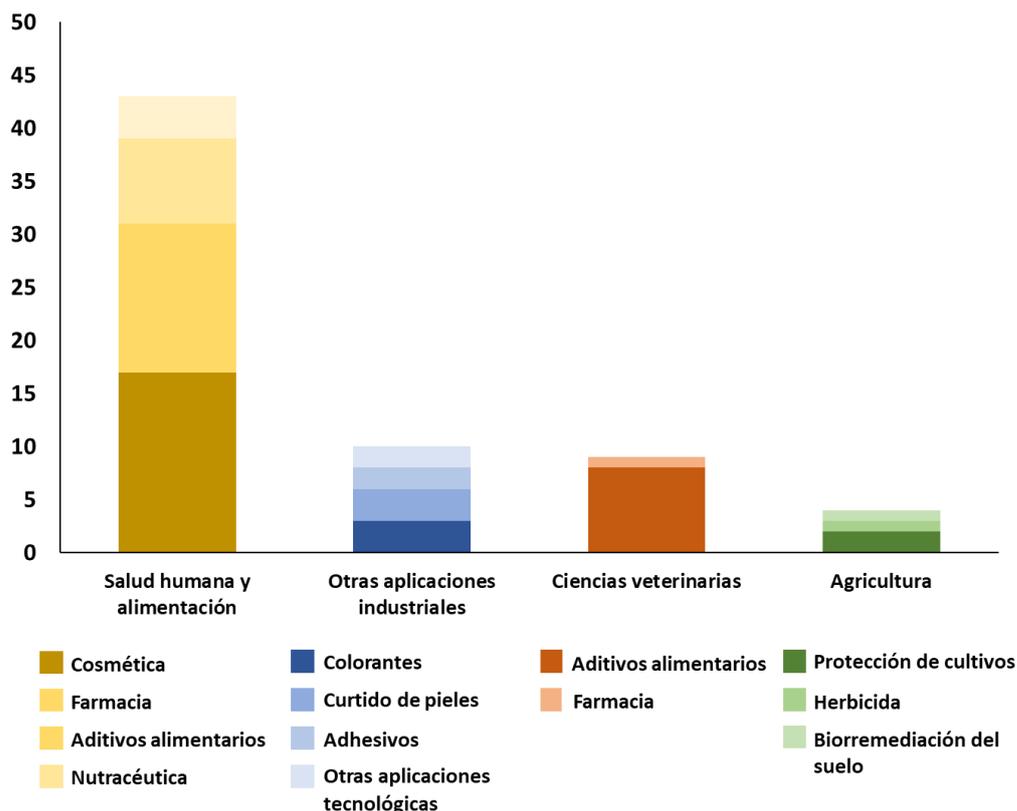


Figura 3. Número de matrices vegetales investigadas para aplicaciones potenciales en cuatro áreas diferentes: salud humana y alimentación, otras aplicaciones industriales, ciencias veterinarias y agricultura (de 2006 a 2020). (Adaptado de Chiocchio et al., 2021)

También se ha investigado el uso de los compuestos lignocelulósicos procedentes de la biomasa de residuos agroindustriales para ser utilizados en la síntesis de biomateriales como bioaerogeles, biopelículas, bio-nanocomposites e hidrogeles, aplicables en diferentes sectores como la biomedicina, la ingeniería y la farmacia. Estos biomateriales nanocelulósicos se pueden utilizar como matrices en ingeniería de tejidos o en la administración controlada de fármacos, entre otros (Freitas et al., 2021).

En cuanto a los subproductos vegetales como fuente de compuestos bioactivos, que ejercen un efecto beneficioso sobre la salud humana, se han estudiado diversas técnicas de extracción que encajan en las llamadas tecnologías verdes, amparadas en el marco de la economía circular. Algunos de los ejemplos son la extracción mediante fluidos supercríticos (SFE), la extracción mediante líquidos presurizados (PLE), la extracción asistida por microondas (MAE) y la extracción asistida por ultrasonidos (UAE) que son capaces de obtener productos de alto valor añadido de forma sostenible para las industrias química, farmacéutica y alimentaria. Estas tecnologías de extracción verdes, respetuosas con el medio ambiente debido al menor consumo de energía, reducción del uso de solventes orgánicos y tiempos cortos de procesamiento, han venido destacando como una excelente alternativa para extraer compuestos de alto valor añadido de los residuos

Introducción

agroindustriales, ya que producen un extracto final de alta calidad y pureza elevada (Azmir et al., 2013; Ameer et al., 2017; Freitas et al., 2021).

El uso de extractos vegetales enriquecidos en compuestos biológicos obtenidos a partir de subproductos de la industria agrícola como nuevos ingredientes podría considerarse una estrategia a tener en cuenta para el desarrollo de nuevos productos de diversas industrias como la alimentaria, farmacéutica o cosmética y a la vez contribuiría a la valorización de estos subproductos (Gupta et al., 2015). Teniendo en cuenta el interés reciente demostrado sobre estos subproductos y su valorización para diferentes sectores, no es de extrañar que el número de publicaciones científicas que tratan sobre la valorización de residuos derivados de plantas haya aumentado notablemente en los últimos años (Figura 4).

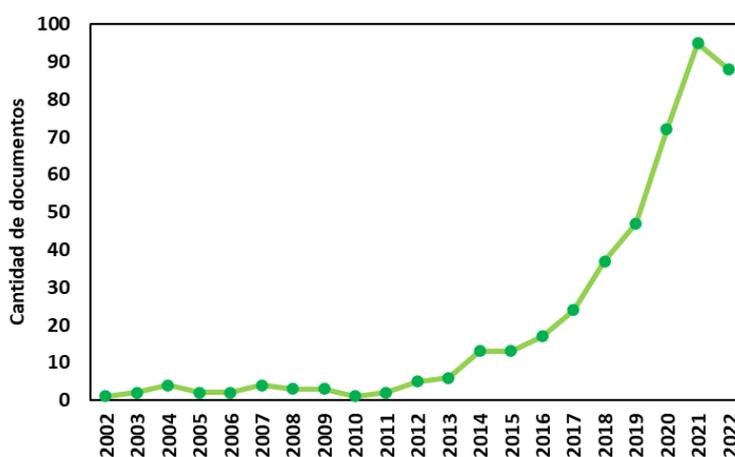


Figura 4. Tendencia en la cantidad de publicaciones sobre la revalorización de subproductos vegetales desde 2002 a 2022 obtenidos de Pubmed usando los buscadores: Plant + Byproduct + Valorization.

Por todas estas razones, en las últimas décadas, la demanda de productos e ingredientes naturales ha aumentado considerablemente. Los consumidores prefieren esta opción puesto que ofrecen una mayor seguridad, son ecológicas y presentan muchos beneficios para la salud (Fraga-Corral et al., 2021).

3. El brócoli.

Brassica oleracea L. var. *italica* (Figura 5), conocido comúnmente como brócoli, brécol o bróculi, es una planta comestible y representa uno de los cultivos hortícolas más importantes de la familia *Brassicaceae*, a la que también pertenecen otras especies de interés en la agricultura como la col, las coles de Bruselas, la coliflor, el rábano, el repollo y la rúcula, entre otras.

La familia *Brassicaceae* es una extensa familia de plantas angiospermas dicotiledóneas del orden de las *Brassicales* formada por aproximadamente 338 géneros y 3709 especies. La estructura en cruz de los cuatro pétalos que forman la flor de este grupo de plantas recuerda, vista desde arriba, la forma de una cruz griega, de ahí el antiguo nombre de la familia *Cruciferae* (Franzke et al., 2011; Anjum et al., 2012). Se trata de una familia de gran importancia ya que en ella se incluyen plantas de cultivo (*B. oleracea*, *B. napus*, *Armoracia rusticana*), ornamentales (*Aubrieta*, *Iberis*, *Lunaria*, *Arabis*, *Draba*) así como plantas modelo usadas en investigación (*Arabidopsis thaliana*, *A. lyrata*, *A. halleri*, *B. napus*, *Capsella rubella*, *Thellungiella halophila*, *Arabis alpina*).



Figura 5. Detalle de una planta de brócoli.

Parte de su notoriedad se debe también a su presencia en prácticamente la totalidad del mundo, a excepción de la Antártida (Lysak et al., 2010; Anjum et al., 2012; Vargas-Rincón et al., 2014). Muchas de las especies que pertenecen a esta familia, representan una parte esencial de la dieta humana a nivel mundial (Figura 6). Cuando se consumen regularmente, ejercen un efecto beneficioso sobre la salud, como la reducción del riesgo de enfermedades crónicas, principalmente enfermedades cardiovasculares y varios tipos de cáncer (Sanlier & Guler, 2018; Le et al., 2020a). Estos efectos se han asociado con la presencia de fenoles, glucosinolatos, carotenoides, tocoferoles y ácido ascórbico en estas plantas, compuestos bien conocidos por sus propiedades antioxidantes (Ramirez et al., 2020).

El brócoli presenta numerosos floretes carnosos, dispuestos en forma de árbol, sobre ramas que nacen de un tallo grueso también comestible (Figura 7). Su porte alcanza normalmente entre 55 y 65 cm sobre el terreno de cultivo y la masa de cabezuelas está rodeada de grandes hojas erguidas de color verde grisáceo. Éstas presentan una silueta ondulada con peciolo alargados, limbos profundamente lobulados y marcadas nervaduras de color blanco. En cuanto a las pellas, son claras y ligeramente de menor tamaño que en la coliflor y con una superficie más granulada.

Introducción

Forman conglomerados parciales de forma cónica en el ápice que puede llegar a medir 20 cm de diámetro y alcanzar 2 kg de peso, existiendo colores distintos según la variedad: morada, rojiza, blanquecina o amarillenta, siendo la más común la que presenta un color verde oscuro en el tallo y verde azulado en el extremo de la flor.



Figura 6. Algunas de las especies usadas en alimentación más representativas del género *Brassica*.

También cabe destacar que uno de los rasgos principales de los diferentes tipos de brócoli reside en el tiempo necesario para su desarrollo completo, pudiendo ser precoces o tempranos (que son recogidos en 90 días desde su siembra), intermedios (entre 90 y 100 días) y tardíos (más de 110 días). Una vez superado el periodo de recolección de las pellas, si éstas se dejan madurar, las yemas florales se elongan y se terminan desarrollando inflorescencias de color amarillo, de cuyos tallos surgen vainas de las que finalmente se obtienen las semillas redondeadas. Además, posee una raíz pivotante de la que parten de manera superficial una cabellera ramificada de raíces (Owis, 2015; Baixauli & Maroto, 2017).

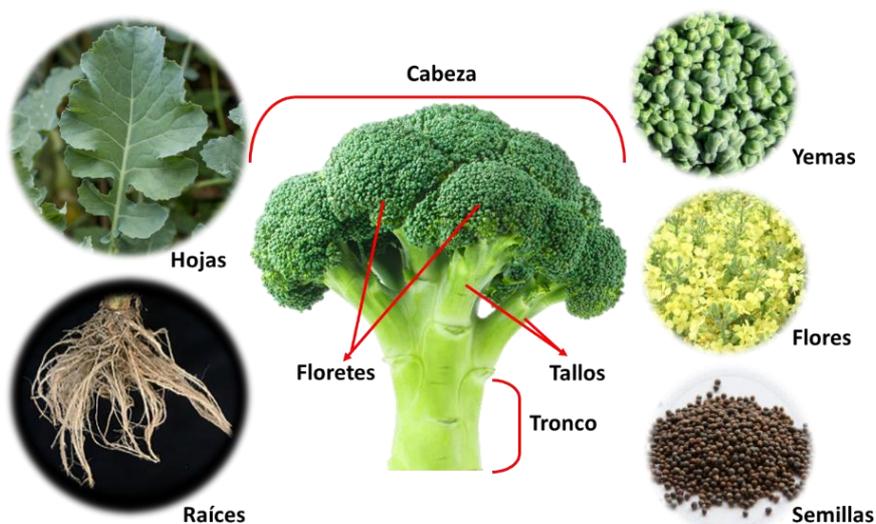


Figura 7. Esquema de un ramillete de brócoli y algunas de las partes de la planta.

3.1 Distribución y producción de cultivos de brócoli

El brócoli es una hortaliza cada vez más popular que se consume bajo muchas variaciones de cultivares diferentes en todo el mundo. En 2019, la producción mundial combinada de coliflor y brócoli alcanzó los 26 millones de toneladas, 0,46 millones de toneladas más que en 2018 y 0,58 millones de toneladas más que en 2017 (*Food and agriculture organization corporate statistical database* [FAOSTAT], s.f.). Según datos de la FAO, la mayor proporción a nivel mundial de la producción de brócoli se centra en Asia, continente que alberga el 79 % de la producción de este vegetal, siendo China, la principal nación productora de brócoli a nivel mundial, llegando a producir de media unos 9 millones de toneladas al año. Le sigue como segundo mayor productor del mismo continente la India, con una media anual de 8 millones de toneladas. El mayor contribuyente a la producción de brócoli y coliflor en América es Estados Unidos, con una producción en el año 2020 de 1 millón de toneladas de este grupo de verduras. El mismo puesto de Europa lo ocupa España con una producción anual en 2020 de 746 mil toneladas de estos vegetales (Figura 8).

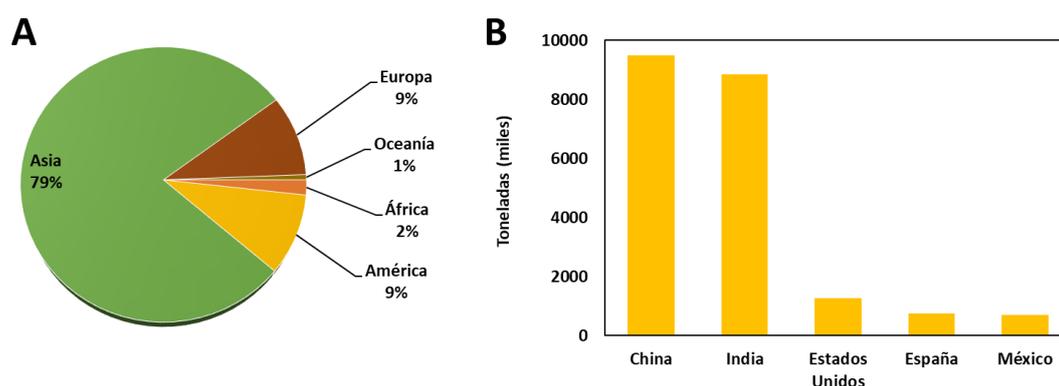


Figura 8. Distribución de la producción por continentes (A) y principales países productores de brócoli y coliflor en 2020 (B). Fuente: FAOSTAT, s.f.

Si nos centramos en la producción de brócoli a nivel europeo, podemos observar la superioridad de producción de España en comparación con el resto de los países del continente (Figura 9). Así, en el continente europeo se destina a la producción de estos vegetales unas 156.575 hectáreas, con una producción de alrededor de 2.755.886 toneladas de este cultivo. En cuanto a España, el cultivo de brócoli representa el 26 % del terreno europeo y el 27 % de la producción total del continente, es decir, en total, se destinan unas 30.000 hectáreas al cultivo de brócoli con una producción de 550.000 toneladas de las cuales se exportan unas 397.000, lo que genera

Introducción

unos beneficios de unos 500 millones de euros, siendo España líder del comercio exterior del brócoli tanto en países comunitarios como a nivel mundial.

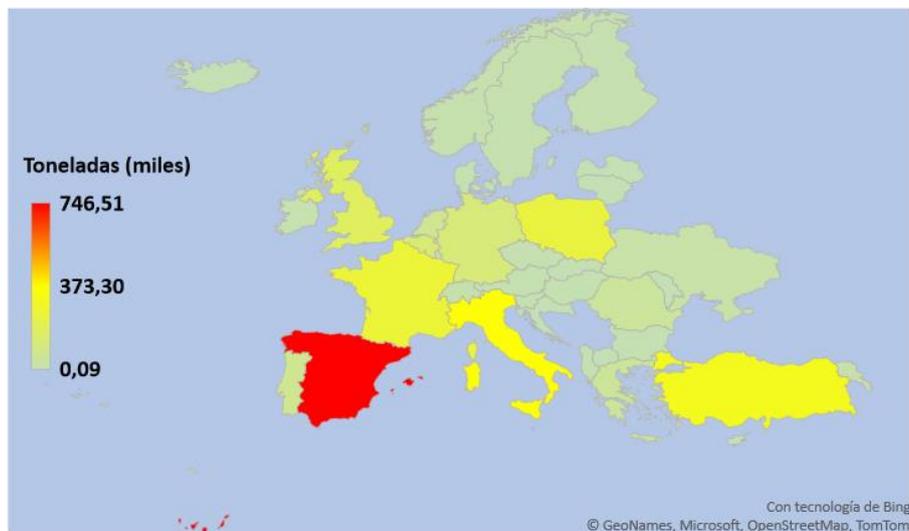


Figura 9. Producción de brócoli y coliflor a nivel europeo en 2020. Fuente: FAOSTAT, s.f.

3.1.1 España y Región de Murcia

Con respecto a la península ibérica, aunque las primeras anotaciones sobre el brócoli se realizaron en el siglo XVIII (Valcárcel, 1767), no es hasta principios de 1970 cuando se desarrolla este cultivo a mayor escala. Comenzando por la Comunidad Valenciana y Cataluña, donde se encontraban las principales empresas hortofrutícolas y exportadoras de la época, más adelante el cultivo de brócoli se fue extendiendo por España hasta zonas como Navarra o la Región de Murcia, principales productoras y exportadoras de este vegetal en la actualidad (Baixauli & Maroto, 2017). La superficie destinada en el país al cultivo de esta hortaliza ha aumentado alrededor de un 42 % en los últimos 10 años, pasando de 23.000 hectáreas en 2010 a 32.000 en 2021. Así mismo, también aumentó la producción de brócoli en un 54 % desde 2010 (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación [MAPA], s.f.) Centrándonos más en la Región de Murcia, los primeros cultivos de brócoli se remontan a la década de 1980, con un total de 878 hectáreas cultivadas. A principios del siglo XXI, la producción de brócoli en la Región alcanzó las 100.000 toneladas anuales, llegando a superar las 150.000 toneladas durante los años 2003-2004 (Región de Murcia Digital, s.f.). En 2021, el cultivo de brócoli en la Región de Murcia representó un 45,56 % de la producción total en España, seguida de la Comunidad Valenciana (12,25 %) y de Navarra (10,80 %), lo que supuso el 11 % de la producción de la Unión Europea y el 0,9 % de la producción mundial. Actualmente, el cultivo de brócoli en la Región ocupa 13.344 hectáreas con un rendimiento de 18.830 Kg Ha⁻¹ (MAPA, s.f.). Este cultivo ha ido en aumento en estos últimos años debido, en parte, a la producción intensiva desarrollada a partir del Trasvase Tajo-Segura y la potencia económica de este producto en los mercados europeos. Las áreas de mayor

densidad de cultivo dentro de la Región de Murcia son: el Valle del Guadalentín, con Lorca y Totana a la cabeza, el Campo de Cartagena, así como Lobosillo de Murcia, El Mojón de Beniel o Archivel de Caravaca de la Cruz (Figura 10).



Figura 10. Cultivo del brócoli en la Región de Murcia. (Región de Murcia Digital, s.f.)

A pesar de la gran producción de este cultivo, tanto en la Región de Murcia como en España, la gran mayoría de los brócolis cosechados se destinan a la exportación hacia otros países. De la producción estimada de 250.000 toneladas en el año 2021, la Región exportó cerca de 200.000, representando casi el 75 % del total de la exportación nacional. Respecto a la exportación, el grupo de coles (brócoli, coliflor y otras) aportó a la Región alrededor de 336,3 millones euros en 2018, un 3 % menos que el año anterior mientras que el volumen exportado ascendió a 489.730 toneladas, un 7,7 % más que en 2017 (Proexport, s.f.). Todos estos datos nos indican que el brócoli es un cultivo de enorme valor económico, tanto para el país como para la Región de Murcia.

3.2 Compuestos bioactivos e importancia del brócoli

Durante las últimas décadas, se ha prestado especial atención a los compuestos bioactivos naturales, presentes en frutas y hortalizas, con potencial para el tratamiento y la prevención de enfermedades humanas. En general, estos compuestos bioactivos derivados del metabolismo secundario de las plantas, son sintetizados en cantidades pequeñas, con respecto a otros macronutrientes, pero contribuyen significativamente a la regulación de los mecanismos de protección frente a estreses bióticos y abióticos y proporcionan a los humanos que los consumen importantes propiedades biológicas para la prevención de algunas enfermedades (Hooper & Cassidy, 2006; Hwang & Lim, 2015). Además, favorecen al mantenimiento de los tejidos corporales, aumentan la resistencia a infecciones, regulan el desarrollo del sistema

Introducción

nervioso y actúan durante el crecimiento además de ser beneficiosos para la síntesis de enzimas en el hígado (Moreno & García-Viguera, 2008; Jeffery & Araya., 2009). En ese sentido, varios estudios epidemiológicos, han asociado el consumo de alimentos de origen vegetal, característicos de la dieta mediterránea, con un menor riesgo de enfermedades cardiovasculares y mortalidad (Martinez-Gonzalez & Martín-Calvo, 2016).

En los últimos años, varios estudios, tanto *in vitro* como *in vivo*, se han centrado en los compuestos bioactivos de las brassicáceas y su potencial para mitigar enfermedades crónicas (Raiola et al., 2018; De La Fuente et al., 2020). Así, numerosos estudios han relacionado su riqueza en compuestos bioactivos con las propiedades asociadas al brócoli como anticancerígeno (Ares et al., 2013), antioxidante (Jang et al., 2015), antimicrobiano (Owis, 2015), antiinflamatorio (Dang et al., 2019) y antihipertensivo (Jeffery & Araya, 2009). Además, debido a su composición rica en compuestos beneficiosos para la salud (Tabla 1), también permite su uso para tratar otros problemas como son la hipercolesterolemia, las enfermedades cardiovasculares, la diabetes o los trastornos de fotosensibilidad (Bahadoran et al., 2012; Porter, 2012; Ares et al., 2013). Recientemente, ensayos clínicos han sugerido que el brócoli puede contribuir a la prevención de los síntomas graves de COVID-19 (Bousquet et al., 2021).

Tabla 1. Composición nutricional del brócoli por 100 g de producto. (Modificado de Nagraj et al., 2020 con datos de *United States Department of Agriculture [USDA]*, s.f.).

Valor nutricional	(g 100 g⁻¹)	Minerales	(mg 100 g⁻¹)
Energía	32,5	Potasio(K)	309,5
Carbohidratos	6,455	Fósforo (P)	66
Proteínas	2,695	Calcio (Ca)	46,5
Lípidos	0,355	Sodio (Na)	34,5
Fibra	2,5	Magnesio (Mg)	21
Agua	90	Hierro (Fe)	0,71
		Zinc (Zn)	0,415
		Manganeso (Mn)	0,204
		Cobre (Cu)	0,054
		Selenio (Se)	2,05 µg
		Aminoácidos	(g 100 g⁻¹)
Vitaminas	(mg 100 g⁻¹)	No esenciales	1,56
Vitamina A (RAE)	31 µg	Esenciales	0,803
Vitaminas del grupo B	1,64		
Vitamina C	90,25		
Vitamina E	0,126		
Vitamina K	0,136		

Entre los compuestos bioactivos del brócoli cabe destacar los glucosinolatos (y sus productos de hidrólisis, los isotiocianatos) y los compuestos fenólicos (flavonoides y ácidos hidroxicinámicos) que han demostrado ser antioxidantes que podrían disminuir el riesgo de sufrir ciertos tipos de cáncer (Moreno et al., 2006). Además, en estas plantas se encuentran presentes otros

nutrientes como carotenoides, esteroides vegetales, vitaminas (A, B6, B12, C, D, E, K, tiamina, riboflavina, niacina, ácido fólico), fibra (que le proporciona cierto poder laxante) y elementos minerales esenciales para la salud (calcio, potasio, sodio, fósforo y pequeñas cantidades de zinc, selenio, hierro, magnesio y manganeso) (Martínez-Ballesta et al., 2010; Baixauli & Maroto, 2017; Liu et al., 2018) lo que la hace ser una de las verduras más nutritivas y su consumo es recomendado a diario por todas las autoridades alimentarias del mundo.

3.2.1 Glucosinolatos

Los vegetales de la familia de las brasicáceas son consideradas de gran importancia con respecto a la salud humana puesto que poseen compuestos de significativa actividad biológica, como son los glucosinolatos y sus productos de hidrólisis, los isotiocianatos (Tumer et al., 2015). Además, se ha determinado que la mayoría de las propiedades bioactivas de esta planta son debidas a la presencia de estos compuestos (Guzmán-Pérez et al., 2016). Los glucosinolatos, también llamados tioglucósidos, son metabolitos secundarios aniónicos nitrógeno-azufrados que se encuentran casi exclusivamente en plantas de la familia *Brassicaceae*, entre ellas el brócoli, donde alcanzan la mayor concentración, es decir, son los compuestos bioactivos por excelencia del brócoli. El esqueleto básico de los glucosinolatos (β -D-tioglucósido-*N*-hidroxisulfato) está formado por un grupo β -D-tioglucosa, una oxima sulfonada y una cadena lateral variable procedente de los aminoácidos metionina, fenilalanina, o triptófano (Sánchez-Pujante et al., 2017).

En la planta, aunque el papel de los glucosinolatos no está claro, es probable que se encuentre ligado a la defensa vegetal, puesto que confieren un sabor amargo y un olor fuerte que podría repeler el ataque de los herbívoros (Finley, 2005). El grupo sulfato de los glucosinolatos es fuertemente ácido y las plantas los acumulan secuestrándolos en forma de sales de potasio en las vacuolas (Keck & Finley, 2004). Además, los glucosinolatos no son activos biológicamente hasta que son hidrolizados a isotiocianatos mediante la acción de la enzima mirosinasa que se libera de la pared celular por la acción de la masticación, la cosecha o el procesado de la planta (Moreno et al., 2006). Sin embargo, aunque los seres humanos no somos capaces de transformar los glucosinolatos en isotiocianatos (debido a la falta de la enzima mirosinasa en los tejidos humanos), nuestra flora intestinal, como algunas especies del género *Bifidobacterium*, sí que poseen esa capacidad, que es llevada a cabo unas 2 o 3 horas tras la ingesta de vegetales de la familia de las brásicas (Cartea et al., 2008).

Introducción

En cuanto a la salud humana, estos compuestos han sido objeto de investigación desde hace más de medio siglo (Dinkova-Kostova & Kostov, 2012). De hecho, los isotiocianatos son capaces de actuar como antioxidantes tanto directa como indirectamente a través de la inducción de enzimas de la fase II, modulando la señalización celular, induciendo apoptosis, controlando el ciclo celular, reduciendo infecciones por *Helicobacter* y actuando, por tanto, como agentes preventivos del cáncer (Mi et al., 2007). Los isotiocianatos más caracterizados son el sulforafano (SFN), isotiocianato de fenetilo, isotiocianato de alilo y el indol-3-carbinol (provenientes de los glucosinolatos glucorafanina, gluconasturtina, sinigrina y glucobrasicina, respectivamente) (Figura 11) aunque existen muchos otros que también contribuyen a las propiedades anticarcinogénicas de las brasicáceas (Fahey et al., 2002; Moreno et al., 2006; Vasanthi et al., 2009; Ishida et al., 2014). Como ya se ha mencionado anteriormente, los glucosinolatos son compuestos beneficiosos para la salud humana ya que en algunos casos pueden ofrecer protección frente a algunos tipos de cáncer como el de pulmón, mama, colon y próstata (Jeffery & Araya, 2009). También, recientemente se ha descrito el tratamiento con SFN en varios tipos de autismo con resultados positivos, observándose una mejoría significativa en pacientes que consumían brócoli de manera regular frente a aquellos que no lo consumían (Singh et al., 2014).

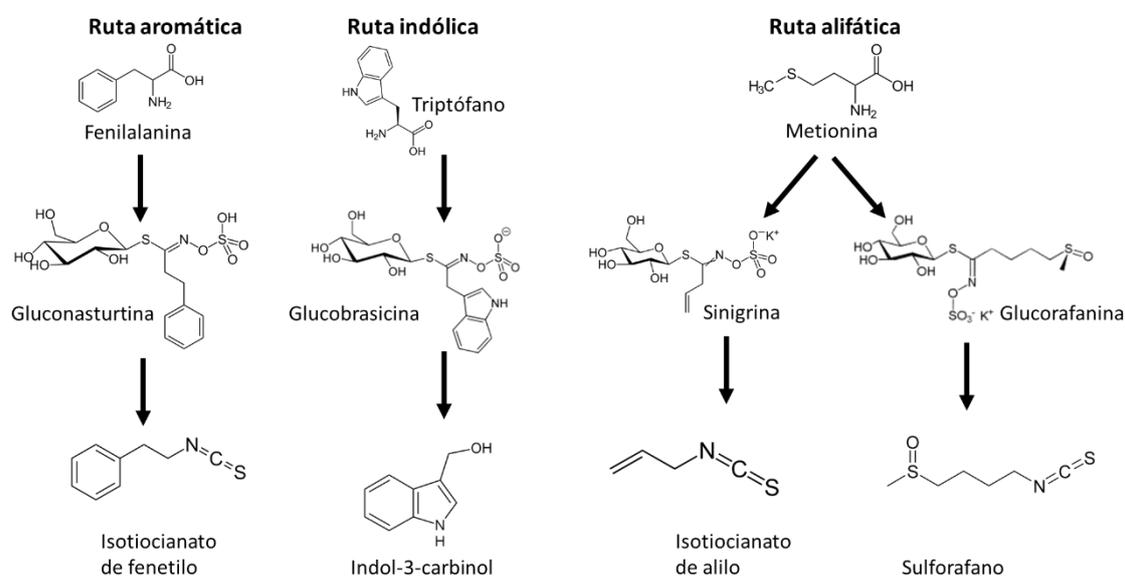


Figura 11. Ejemplos más representativos de los glucosinolatos más caracterizados y sus derivados isotiocianatos y los aminoácidos de los que derivan.

Existen muchos estudios que ponen de manifiesto que la ingesta de brasicáceas se encuentra directamente relacionada con un menor riesgo de padecer cáncer en numerosos órganos, incluyendo el tracto digestivo, el cual es el más expuesto a los glucosinolatos (Mithen et al., 2000). Sin embargo, no solo la disminución del riesgo de padecer cáncer está ligado al consumo de estas hortalizas, también la disminución del riesgo de otros tipos de enfermedades o

alteraciones como, diabetes, alteraciones cardiovasculares, infecciones bacterianas y otros tipos de enfermedades debidas al estrés oxidativo (Vallejo et al., 2002; Vasanthi et al., 2009; Ares et al., 2013). Por ejemplo, el indol-3-carbinol, el isotiocianato de bencilo y el isotiocianato de fenetilo podrían ser responsables de la inducción selectiva de apoptosis en células cancerígenas, lo que apoyaría el potencial terapéutico/preventivo de los productos de hidrólisis de los glucosinolatos frente a diferentes tipos de cáncer (Vasanthi et al., 2009).

3.2.2 *Compuestos fenólicos*

Los compuestos fenólicos constituyen un amplio grupo de moléculas que están presentes en todas las partes de la planta, incluidas frutas, verduras, semillas, hojas, raíces y cortezas. En las plantas, los compuestos fenólicos son esenciales para la fisiología y el metabolismo celular. Están involucrados en muchas funciones en las plantas, confiriéndoles propiedades sensoriales (color, aroma, sabor y astringencia), estructurales, ayudan a la polinización, resistencia a plagas y depredadores, procesos germinativos de la semilla después de la cosecha, así como en el crecimiento, desarrollo y reproducción, entre otros (Giada, 2013). La principal actividad ligada a los compuestos fenólicos es la antioxidante ya que protegen a la célula del daño causado por los radicales libres, aunque también están asociados a otros efectos beneficiosos para la salud por sus propiedades como anti-carcinogénicos, antiinflamatorios, antitrombóticos y antienvjecimiento (Ares et al., 2013).

Existen más de 4.000 compuestos fenólicos y muchos de ellos se encuentran en el brócoli. La estructura de los fenoles es muy variada, desde simples o compuestos con bajo peso molecular, hasta complejos como los taninos y polifenoles. Se pueden clasificar dependiendo del número y del tipo de unión de sus átomos de carbono en flavonoides (flavonoles, flavonas, antocianinas, flavanoles, isoflavonas...) y en no flavonoides (ácidos fenólicos, hidroxicinámicos, estilbenos etc.) y normalmente se encuentran conjugados con azúcares o ácidos orgánicos (Cartea et al., 2011).

El brócoli es una especie rica en compuestos fenólicos, por lo que se trata de una hortaliza con propiedades beneficiosas para la salud. Se ha demostrado la presencia de dos principales compuestos de esta familia de fenoles en las pellas de brócoli: la quercetina y el kaempferol, además de un gran número de ésteres de estos compuestos (Koh et al., 2009; Wu et al., 2019a). Vallejo et al. (2002) analizaron el contenido en compuestos fenólicos en pellas de 14 cultivares diferentes de brócoli. Entre las variedades estudiadas se encontraban tanto comerciales (Marathon y Lord) como experimentales (Monterey, Pentathlon, Vencedor y Furia entre otras líneas híbridas, de polinización abierta o razas locales). Entre ellas se encontraron diferencias

Introducción

significativas en la concentración de flavonoides, derivados del ácido cafeico y derivados del ácido sinápico (12,3-65,4 mg kg⁻¹ peso fresco (PF); 7,6-38,2 mg kg⁻¹ PF y 25,4-72,6 mg kg⁻¹ PF, respectivamente), siendo además las variedades comerciales las que mayores concentraciones presentaron de estos compuestos. A pesar de estas diferencias, en todos los cultivares analizados, el kaempferol 3-O-soforosido representó casi el 90 % del contenido total de flavonoides.

Otros datos obtenidos por Koh et al. (2009) mostraron que 80 muestras de variedades comerciales de brócoli contenían compuestos fenólicos totales en concentraciones comprendidas entre 15,18 y 121,38 mg 100 g⁻¹ PF. Además, los flavonoides mayoritarios fueron el kaempferol y la quercetina, con valores promedio de 3,14 y 2,27 mg 100 g⁻¹ PF, respectivamente.

3.2.3 *Fitoesteroles*

Los esteroides vegetales, conocidos generalmente como fitoesteroides, son componentes esenciales de la bicapa lipídica de la membrana y se encuentran en todos los tejidos vegetales y especialmente en semillas, verduras y cereales. Realizan funciones en plantas similares a las del colesterol en los animales y actúan como precursores de biomoléculas importantes, tales como hormonas sexuales y vitaminas. En particular, los fitoesteroides han recibido mucha atención debido a su capacidad para disminuir los niveles de colesterol en suero en seres humanos, resultando en una reducción significativa en el riesgo de padecer enfermedades del corazón. Por otra parte, los fitoesteroides tienen propiedades antiinflamatorias, antibacterianas, antiulcerosas y antitumorales, y por tanto proporcionan una gran contribución al valor de los productos naturales como nutracéuticos medicinalmente activos (Miras-Moreno et al., 2016). Estudios realizados por Lee et al. (2018) en 6 variedades de bráxicas mostraron que el campesterol y el β -sitosterol fueron los principales fitoesteroides encontrados en esta familia, especialmente en el brócoli, con valores que oscilaban entre 542,89–1.182,18 y 638,76–1.900,15 $\mu\text{g g}^{-1}$ de peso seco (PS) de campesterol y β -sitosterol, respectivamente.

3.2.4 *Carotenoides y clorofilas*

Los carotenoides y las clorofilas son pigmentos fotosintéticos. Los carotenoides constituyen una amplia gama de pigmentos amarillos, anaranjados y rojos en las plantas y actúan como pigmentos accesorios de las clorofilas en la fotosíntesis. La presencia de carotenoides, totales o individuales (luteína, licopeno, caroteno, etc.) y clorofilas ha sido determinada en varias partes del brócoli como las pellas, el tronco o los brotes (Ares et al., 2013). De hecho, las verduras de

la especie *B. oleracea* como la col rizada, el repollo y el brócoli son reconocidas como excelentes fuentes de carotenoides en la dieta. En ese sentido, estudios realizados por Guzman et al. (2012) evaluaron el contenido en carotenoides y clorofilas en cuatro variedades de brócoli (VI-158, BNC [Brocolette Neri E. Cespuoglio], Pirate y Violet Queen). Los resultados obtenidos mostraron que en general, la variedad con la mayor cantidad de carotenoides totales fue BNC con $367,6 \pm 15,7 \mu\text{g g}^{-1}$ PS. La cantidad más alta del carotenoide con actividad provitamina A, el β -caroteno, fue de $73,5 \pm 3,6 \mu\text{g g}^{-1}$ PS también en BNC, mientras que la cantidad más baja se encontró en el brócoli morado Violet Queen con $44,5 \pm 4,3 \mu\text{g g}^{-1}$ PS. Además, en todas las variedades de brócoli, el carotenoide predominante fue la luteína, que varió al doble entre las variedades de brócoli en este estudio, acumulándose la mayor cantidad de luteína en la variedad BNC ($120,5 \pm 7,7 \mu\text{g g}^{-1}$ PS). En cuanto al contenido en clorofilas, las cuatro variedades de brócoli analizadas contenían niveles de clorofila a 4 veces mayores que los de clorofila b que oscilaron entre $322,0 \pm 19,2$ y $1145,3 \pm 42 \mu\text{g g}^{-1}$ PS en brócoli morado Violet Queen y BNC, respectivamente. Farnham & Kopsell, (2009) analizaron el contenido de carotenoides y clorofilas en nueve líneas homocigóticas endogámicas (haploides dobles) de brócoli. Los resultados mostraron que la luteína resultó ser el carotenoide más abundante en las pellas de brócoli, con un rango de 65,3 a $139,6 \mu\text{g g}^{-1}$ PS entre las nueve líneas analizadas. Asimismo, Liu et al. (2018) describieron la presencia de carotenoides (β -caroteno, violaxantina, neoxantina y luteína) y clorofilas (a y b) en diferentes tejidos del brócoli. Sus estudios revelaron que los tejidos del tallo no tenían β -caroteno ni violaxantina, mientras que el tejido foliar contenía las concentraciones más altas de β -caroteno ($248 \mu\text{g g}^{-1}$ PS), violaxantina ($206 \mu\text{g g}^{-1}$ PS), neoxantina ($156 \mu\text{g g}^{-1}$ PS) y luteína ($484 \mu\text{g g}^{-1}$ PS). Así, la luteína representó la mayor proporción de la reserva total de carotenoides, representando el 47,2, 69,2 y 44,2 % en floretes, tallos y hojas, respectivamente. El tejido de la hoja contenía una mayor concentración total de carotenoides ($1.095 \mu\text{g g}^{-1}$ PS) que los floretes ($181 \mu\text{g g}^{-1}$ PS) y los tallos ($15,6 \mu\text{g g}^{-1}$ PS). En cuanto al contenido en clorofilas, las concentraciones de clorofila a en floretes, tallos y hojas fueron 852, 144 y $4478 \mu\text{g g}^{-1}$ PS, mientras que la concentración de clorofila b fue 135, 23 y $781 \mu\text{g g}^{-1}$ PS, respectivamente. En este estudio, los tejidos de la hoja y el florete del brócoli contenían entre 5 y 7 veces más clorofila a que clorofila b.

Los carotenoides tienen una variedad de funciones en la salud humana. Sin embargo, los humanos no pueden sintetizar carotenoides y deben ingerirlos en los alimentos o mediante suplementos. Los carotenoides han mostrado una potente actividad antioxidante en estudios *in vivo* e *in vitro*. En concreto, el β -caroteno tiene una amplia gama de aplicaciones biológicas y se puede encontrar en los formulados de cosméticos, productos de higiene y suplementos

Introducción

nutricionales. Es un ingrediente clave de los protectores solares que se utilizan para proteger la piel de los efectos nocivos de la radiación solar, incluido el desarrollo de carcinomas (Eggersdorfer & Wyss, 2018). Como precursor de la vitamina A, el β -caroteno se utiliza en tratamientos dietéticos para cubrir los requerimientos metabólicos. Además, tiene propiedades anticancerígenas, sobre todo contra el cáncer oral, de colon y de próstata (Zare et al., 2020).

Las dos clorofilas principales (a y b) son pigmentos verdes fotorreceptores presentes en todos los organismos fotosintéticos. La clorofila y sus derivados han sido ampliamente utilizados en la medicina tradicional desde hace tiempo. Entre los usos terapéuticos se incluyen la cicatrización de heridas, su uso como agente antiinflamatorio o para combatir los malos olores, el mal aliento y olor corporal, entre otros. Sin embargo, actualmente los trabajos de investigación se centran más en su papel como potente antimutagénico y anticancerígeno y también como fotosensibilizador en terapia fotodinámica (Lanfer-Marquez et al., 2005; Ferruzzi & Blakeslee, 2007; Mishra et al., 2011). Además, tienen un papel importante en la interrupción de diversas enfermedades como el cáncer, las enfermedades cardiovasculares y otras enfermedades crónicas (Sangeetha & Baskaran, 2010).

3.2.5 Vitaminas

Las verduras de la familia de las brasicáceas como el brócoli no solo son fuentes importantes de fitonutrientes como el SFN, sino que también son fuentes dietéticas importantes de muchos nutrientes esenciales como las vitaminas A, C y E. La interacción entre SFN y las vitaminas A, C y E puede desempeñar un importante papel protector dietético en épocas de estrés oxidativo (Boddupalli et al., 2012). La vitamina C incluye ácido ascórbico y su producto de oxidación, el ácido dehidroascórbico, y tiene varias actividades biológicas en el cuerpo humano entre las que destacan las capacidades protectoras contra el cáncer (Bakker et al., 2016). La vitamina C es abundante en el brócoli y se usa como biomarcador para cuantificar la calidad nutricional de este vegetal (Jahangir et al., 2009). Sin embargo, la variación de los niveles de esta vitamina varía mucho entre las diferentes variedades de brócoli. Esta variación puede ser debida a diversos factores como el genotipo, el estrés ambiental al que están sometidos, las condiciones de cultivo, el almacenamiento y el procesamiento de la verdura (Vasanthi et al., 2009). Así, estudios realizados por Wunderlich et al. (2008) demostraron que los cambios estacionales fueron los que más influenciaron en el contenido de vitamina C como biomarcador de calidad nutricional, tanto en brócoli con etiqueta orgánica como el cultivado convencionalmente, sugiriendo además, que los consumidores que buscan calidad nutricional deberían poner más énfasis en la compra de frutas y verduras cuando están de temporada y cultivados localmente y no

diferenciar entre productos ecológicos o de cultivo tradicional. Asimismo, Vallejo et al. (2002) evaluaron el contenido en vitamina C en las porciones comestibles de 14 genotipos de brócoli recién cosechado y cultivado bajo prácticas agrícolas tradicionales. Tal y como indican estos autores, los resultados mostraron diferencias significativas en la concentración de vitamina C en la mayoría de los cultivares. Sin embargo, los niveles también fueron irregulares, variando desde 43,1 mg 100 g⁻¹ PF, en la variedad Lord (cultivar comercial) hasta 146,3 mg 100 g⁻¹ PF en SG-4515 (cultivar experimental). Por otro lado, Le et al. (2020b) determinaron el contenido de vitamina C en floretes, hojas y semillas de brócoli. En este caso, las hojas de brócoli parecían acumular más vitamina C (2,92 mg de ácido ascórbico g⁻¹ PS) que los floretes (2,54 mg de ácido ascórbico g⁻¹ PS) y semillas (2,69 mg de ácido ascórbico g⁻¹ PS). En cuanto a la vitamina E, su función principal es ayudar como un potente antioxidante con beneficios potenciales contra las enfermedades cardiovasculares, la inflamación, la diabetes, el cáncer de próstata y la enfermedad de Alzheimer (Rizvi et al., 2014). La vitamina E consta de cuatro tocoferoles y cuatro tocotrienoles, de los cuales los α - y γ -tocóferoles son los compuestos predominantes en el brócoli, el pimiento rojo, la zanahoria y los aceites vegetales. Liu et al. (2018) compararon la concentración de vitamina E en floretes, tallos y hojas de brócoli. Los resultados mostraron que la concentración de tocoferoles totales fue de 1,57, 1,97 y 155 $\mu\text{g g}^{-1}$ PS en floretes, tallo y hoja, respectivamente, y el α -tocóferol representó el 0,1 y 90,4 % de los tocoferoles totales de cada tejido, siendo la hoja la que mayor contenido presentó tanto de α - como de γ -tocóferol.

Las crucíferas también son una fuente importante de vitaminas como la B1 y la B2 y la vitamina K. Dentro de esta última, se incluye la filoquinona (vitamina K1), considerada la forma dominante de vitamina K en la dieta (> 90 %); es una vitamina liposoluble que funciona como coenzima y está implicada en la coagulación de la sangre, en el metabolismo óseo y en la reducción del riesgo de calcificación vascular y enfermedades cardiovasculares. En el caso del brócoli, tanto crudo como cocinado se ha descrito más de 100 μg de vitamina K 100 g⁻¹ PF en floretes mientras que, en hojas, el contenido de esta vitamina es del orden de 2,8 veces más altas que el tejido de la pella (Liu et al., 2018; Halder et al., 2019).

3.3 Uso de subproductos del brócoli como fuente de compuestos bioactivos

En general, el brócoli se puede recolectar una vez que la inflorescencia ha alcanzado su tamaño máximo sin abrirse. Una cosecha tardía significa un producto sobre maduro, por lo que no es apto para la venta y posterior consumo. Esto implica un aumento de los subproductos que, junto con el resto de las partes descartadas, representan una gran cantidad de material vegetal no aprovechado. De toda la biomasa generada por los cultivos de brócoli, solo una proporción

Introducción

menor al 25 % se utiliza en alimentación (pella de brócoli); el resto de las partes, incluidas hojas, tallos, raíces e inflorescencias (Figura 12), se consideran subproductos que en su mayoría se utilizan para compostaje o se incorporan al suelo (Zhang et al., 2017). Este descarte supone no sólo la pérdida de producto por parte de los agricultores sino también un aumento de los residuos, generando problemas medioambientales. Considerando los beneficios para la salud que brinda el brócoli más allá de la nutrición esencial, debido a su extraordinaria riqueza en fitoquímicos, los subproductos generados a partir de su cultivo también pueden ser ricos en compuestos bioactivos y presentar propiedades beneficiosas (Ferreira et al., 2018; Shi et al., 2019; Castelão-Baptista et al., 2021). Por tanto, el uso de estos subproductos parece ser una forma inteligente de mitigar los problemas ambientales y brindar una nueva vía de ganancias y rentabilidad económica para empresas y agricultores. El uso de subproductos también puede ayudar a reducir el precio de los alimentos saludables, aumentando el acceso a ellos en los hogares de bajos ingresos.

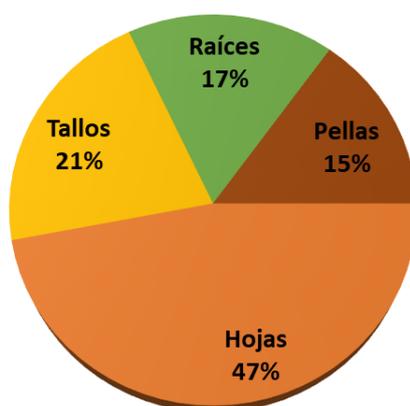


Figura 12. Porcentajes que representan las diferentes partes de una planta del brócoli. Modificado de Liu et al. (2018).

En los últimos años, la investigación de la funcionalidad de los subproductos del brócoli, como hojas y tallos, ha proporcionado una información valiosa acerca del uso de estos materiales de desecho como componentes útiles en diferentes industrias: nutracéutica, cosmética o farmacéutica, entre otras. Sin embargo, la concentración de compuestos bioactivos puede variar según la parte de la planta que se esté estudiando, el tipo de cultivo, la temporada de cosecha, entre otros factores. En ese sentido, Gudiño et al. (2022) llevaron a cabo la caracterización y cuantificación de los compuestos bioactivos presentes en las diferentes partes del brócoli (hoja, inflorescencia y tallo) con el fin de estudiar la dependencia de su variación con el estado de maduración (botones florales y comercial) en cinco cultivares diferentes (TSX 007, Monaco, BRO 2047, Parthenon y Summer purple). Los resultados obtenidos mostraron una mayor concentración de fenoles totales en hojas de brócoli (2.435 mg GAE 100 g⁻¹ de extracto), llegando

a ser más del doble de los valores detectados en las inflorescencias (1.074 mg GAE 100 g⁻¹ de extracto) y tallos (939 mg GAE 100 g⁻¹ de extracto). Además, los extractos de hojas del cultivar Summer Purple mostraron una actividad antioxidante más alta y fueron las mejores fuentes de fitoquímicos, no solo de compuestos fenólicos (principalmente glucósidos de kaempferol y quercetina), sino también de clorofilas. Sin embargo, el mayor contenido en glucosinolatos (principalmente glucobrasicina, glucorafanina y varios derivados) se encontró en los extractos de la inflorescencia, principalmente en el botón floral. Por otro lado, los extractos de tallo e inflorescencia, principalmente de la variedad TSX 007, mostraron un fuerte efecto antibacteriano que se relacionó con una mayor concentración de derivados de ácidos grasos, fundamentalmente ácido palmítico y linoleico. Así mismo, Hwang & Lim (2015) determinaron el contenido total de fenoles y de SFN en hojas, peciolo y tallos de brócoli en diferentes estado de maduración: temprana (Kyoyoshi), media (Myeongil 96) y tardía (SK3-085). En este caso, el mayor contenido en compuestos fenólicos se encontró en las hojas procedentes de brócoli de maduración temprana (Kyoyoshi), siendo éstos del orden de entre 1,8 y 12,1 veces más altos que los de todos los demás cultivares y partes analizadas. Además, en esta misma variedad, el contenido de SFN fue 2,8 veces mayor en los tallos que en las flores. La caracterización de los compuestos presentes en las diferentes partes de los subproductos de brócoli (florete, tallo y una mezcla de ellos) y en semillas de diferentes cultivares también ha sido descrita por Thomas et al. (2018). En este estudio, los subproductos de brócoli eran ricos en glucosinolatos (0,2-2 % de la muestra en PS), predominantemente glucorafanina (32-64 % del total de glucosinolatos), mientras que el contenido de polifenoles resultó ser inferior al 0,02 % de las muestras en PS. Así, el contenido total de polifenoles y flavonoides entre los diferentes subproductos del brócoli varió entre 3,8 ± 0,2 y 6,1 ± 0,3 mg GAE g⁻¹ PS para fenoles totales y de 2,4 ± 0,1 a 5,4 ± 0,6 mg QE g⁻¹ PS para flavonoides totales, encontrándose el contenido más elevado de fenoles y flavonoides totales en los floretes en comparación con el tallo y la mezcla de ellos en un 63 % y un 13 %, respectivamente.

Como ha quedado demostrado, el uso de los subproductos del brócoli como fuente de compuestos bioactivos representa el interés más significativo en la valorización. Sin embargo, un aspecto importante para tener en cuenta a la hora de valorizar estos subproductos es la presencia de plaguicidas cuando se han utilizado métodos de cultivo convencionales. En ese sentido, el uso de subproductos procedentes de cultivos ecológicos podría tener más ventajas más allá de la concentración de compuestos. Los métodos convencionales emplean pesticidas químicos y otros productos no utilizados en cultivos ecológicos. Aunque no se han realizado estudios específicos sobre residuos de plaguicidas en cultivos de brócoli, en otras especies

Introducción

vegetales se ha visto que el 30 % de las partes destinadas al consumo contenían plaguicidas cuando se utilizaban métodos de cultivo convencionales. Por ello, además de la caracterización de fitonutrientes también se debe incluir una evaluación de los niveles de plaguicidas presentes en los subproductos con el fin de garantizar la salud del consumidor.

4. Tecnologías de extracción verde para la obtención de compuestos bioactivos a partir de subproductos de la industria agroalimentaria

La extracción de compuestos de origen natural a partir de los subproductos agroindustriales es un procedimiento bien establecido para varias cadenas productivas, como aceites, zumos y vinos. Todas estas técnicas extractivas se actualizan constantemente para superar los problemas de rendimiento de recuperación y separación de los compuestos de interés a partir de estos desechos agroindustriales. De ahí que, en los últimos diez años, los procesos de extracción se hayan centrado en la búsqueda de solventes respetuosos con el medio ambiente y en el desarrollo de técnicas cada vez más ecológicas y sostenibles. De hecho, la idea de la química verde tiene una importancia inmensa en los procesos de fabricación para disminuir o eliminar la generación y el uso de sustancias peligrosas, así como para ayudar a desarrollar un enfoque verde mediante el uso de los denominados disolventes GRAS (por sus siglas en inglés de *Generally Recognized As Safe* o generalmente reconocidos como seguros) o *Safer Choice Standard* con el fin de garantizar procesos respetuosos con el medio ambiente. Por lo tanto, un desafío crucial en la explotación de los subproductos agroindustriales es el desarrollo de tecnologías de extracción sostenibles y verdes (Gil & Tuberoso, 2021) mediante el empleo de solventes orgánicos GRAS, que requieran menos tiempo para extraer lo que implicaría un menor uso de energía, por lo que tendría una influencia positiva en el medio ambiente.

La extracción efectiva de compuestos bioactivos depende de varios factores, como la temperatura, la presión, el tiempo de extracción, el pH y la elección del solvente. El paso desde la recolección de los subproductos vegetales hasta la recuperación de sus compuestos bioactivos también supone un gran desafío, principalmente debido a la naturaleza selectiva de los métodos de extracción. Además, debido a la naturaleza perecedera y a la gran cantidad de compuestos presentes en los subproductos vegetales, la mayoría de los procesos de extracción convencionales, basados en disolventes orgánicos, son difíciles de escalar. En general, la elección de los métodos y técnicas para realizar la extracción y/o aislamiento de principios activos de un material vegetal dependen de varios factores como son: naturaleza (agua, etanol, mezclas hidroalcohólicas, disolventes orgánicos...) y cantidad del disolvente (el agotamiento de los principios activos es más elevado cuanto mayor sea la cantidad de disolvente), temperatura (las

altas temperaturas favorecen y aceleran la extracción en detrimento de la estabilidad de los principios activos), tiempo de extracción (depende de dureza y/o el grado de división de la materia prima) y naturaleza de los principios activos (volátiles, hidrolizables, oxidables, etc.). Por lo tanto, estos factores deben tenerse en cuenta al seleccionar un método para extraer los compuestos bioactivos, a fin de obtener altos rendimientos de extracción manteniendo la integridad estructural del compuesto deseado (Zhou et al., 2021).

4.1 Técnicas de extracción convencionales

Los productos naturales se caracterizan por una gran diversidad, lo que implica la necesidad de desarrollar métodos de extracción específicos según la materia prima de partida y de los compuestos bioactivos seleccionados. Generalmente, la matriz vegetal cruda se somete a un proceso de secado al aire, normalmente en una estufa o en un horno, o se liofiliza y, posteriormente, se muele para crear una muestra particulada homogénea antes de la extracción (Aizpurua-Olaizola et al., 2015). Los métodos convencionales para la extracción de compuestos bioactivos a partir de fuentes naturales incluyen la maceración, extracción a contracorriente, destilación, extracción a través de Soxhlet, percolación, entre otros, siendo el proceso convencional más común para la extracción de compuestos bioactivos, la extracción líquida utilizando disolventes orgánicos (Ares et al., 2013; Manna et al., 2015; Banerjee et al., 2017). Sin embargo, la eficiencia de la extracción de compuestos bioactivos por cualquier método convencional depende principalmente de la elección del disolvente, lo cual está estrechamente relacionado con la polaridad de los compuestos de interés. Otros factores para tener en cuenta a la hora de seleccionar el disolvente para la extracción de compuestos bioactivos son: la afinidad molecular entre disolvente y soluto, la transferencia de masa, el uso de un co-solvente, la seguridad ambiental, la toxicidad y la viabilidad económica del proceso. Sin embargo, a pesar de que la extracción convencional se ha utilizado durante muchos años, presenta numerosos inconvenientes: requieren el uso de altas cantidades de solventes de alta pureza y en ocasiones costosos, ya que durante el proceso se consumen en gran cantidad; tienen una selectividad de extracción relativamente baja y una alta tasa de evaporación de solventes durante el proceso y generalmente, se caracterizan por tiempos de extracción prolongados y por la descomposición térmica de compuestos termolábiles (Azmir et al., 2013; Banerjee et al., 2017; Nastić et al., 2020).

Introducción

4.2 Técnicas de extracción “verdes”

Hoy día, el uso de disolventes orgánicos en alimentación constituye una de las mayores preocupaciones de la sociedad por estar relacionado con la salud pública, el medio ambiente y la seguridad alimentaria. La posibilidad de que existan residuos de estos solventes orgánicos en el producto final ha preocupado mucho a los consumidores. Por tanto, se han elaborado regulaciones medioambientales muy estrictas a este respecto. Así, la demanda de productos de elevado valor añadido y ultrapuros está redireccionando los esfuerzos de las industrias alimentarias hacia el desarrollo de nuevas tecnologías limpias para estos productos. Actualmente, se han investigado métodos de separación adecuados y tecnologías para promover la calidad del producto y la cantidad de productos naturales activos sin generar problemas ambientales.

En el caso de tener que utilizar disolventes orgánicos para la extracción de compuestos, se deben tener en cuenta factores como los métodos de eliminación, el coste de fabricación y la seguridad. Actualmente, el etanol es el disolvente preferido entre los alcoholes debido a su punto de ebullición más bajo, su rápida recuperación y el estatus de GRAS según lo define la FDA de EE. UU. (*United States Food and Drug Administration* [FDA], 2004). Sin embargo, este disolvente no siempre es efectivo ya que muchos de los compuestos como los carotenoides son más solubles en disolventes polares apróticos (Banerjee et al., 2017). Por este motivo, cada vez más, la mayoría de los estudios han ido evolucionando hacia la utilización de métodos más respetuosos con el medio ambiente, por lo que se han ido introduciendo técnicas de extracción nuevas y prometedoras. Estas técnicas se conocen como técnicas de extracción no convencionales o “verdes” (Rodríguez & Raghavan, 2022). La consideración de “técnicas verdes” se les atribuye puesto que cumplen con los 12 principios de la química verde establecidos por la Agencia de Protección Ambiental de EE. UU. (*United States Environmental Protection Agency* [EPA], s.f.) Algunos de los puntos que incluyen son: prevenir el desperdicio, maximizar la economía atómica, diseñar síntesis químicas menos peligrosas, promover el uso de productos y sustancias químicas más seguras así como el uso de disolventes y condiciones más seguros, el aumento de la eficiencia energética, utilización de materias primas renovables, minimizar la posibilidad de accidentes y prevenir la contaminación (Chemat et al., 2012; Azmir et al., 2013). Entre las técnicas de extracción verdes más comunes para la extracción de compuestos bioactivos a partir de subproductos de la industria agroalimentaria se encuentran la extracción asistida por ultrasonido (UAE) (Reche et al., 2021; Fernandes et al., 2022), extracción asistida por microondas (MAE) (Ferreira et al., 2018; Rodríguez & Raghavan, 2022), extracción con fluido

supercrítico (SFE) (Gustinelli et al., 2018; Pellicanò et al., 2019) y extracción con líquido presurizado (PLE, incluida la extracción acelerada con solventes, ASE) (Cea et al., 2019; García et al., 2021). Otros métodos de extracción ecológica menos comunes también han sido utilizados en la última década para extraer compuestos bioactivos a partir de subproductos agroindustriales como son la extracción dinámica de líquido sólido rápido (RSLDE), extracción por campos eléctricos pulsados (PEF), extracción asistida por enzimas (EAE), y extracción con líquidos iónicos (ILE) (Díaz-Reinoso & Domínguez, 2022). En general, todas estas tecnologías de extracción verdes son baratas, rápidas y ecológicas, siendo las ventajas más comunes el reducido consumo de energía, la obtención de productos seguros y renovables así como de extractos de alta calidad, un bajo impacto ambiental, una mayor selectividad y un mejor aislamiento.

4.2.1 Extracción mediante Fluidos Supercríticos (SFE)

Actualmente, esta tecnología se ha convertido en una de las técnicas de extracción verde más populares ya que representa una alternativa eficaz a la utilización de disolventes orgánicos para la extracción de componentes funcionales y nutracéuticos de fuentes naturales (Cano-Lamadrid & Artés-Hernández, 2022; Nastić et al., 2020) y se ha utilizado ampliamente para agregar valor a los subproductos vegetales generados durante su procesamiento (Agulló-Chazarra et al., 2020). La SFE se basa en el uso del punto crítico del solvente durante la extracción (Figura 13). Cualquier sustancia puede presentarse en tres estados: sólido, líquido y gaseoso. Cuando nos referimos al estado supercrítico, hablamos del estado de un fluido que se encuentra en una fase que posee características de líquido y de gas a la misma vez, ya que se encuentra por encima de su temperatura y presión críticas. Este estado se consigue cuando una sustancia se somete a una temperatura y a una presión más allá de su punto crítico. Así, el punto crítico de una sustancia se define como la temperatura crítica (T_c) y la presión crítica (P_c) características por encima de las cuales no existe distinción entre las fases líquida y sólida (Ameer et al., 2017; Azmir et al., 2013). Por tanto, los fluidos supercríticos son fluidos que están sujetos a condiciones de presión y temperatura por encima de sus puntos críticos y esta situación otorga diferentes propiedades a los solventes en términos de difusividad y viscosidad, haciendo que los fluidos supercríticos tengan características tanto de líquidos como de gases mejorando la penetración del solvente en la muestra y logrando una mejor extracción de los compuestos de interés.

En general, el solvente más utilizado es el dióxido de carbono (CO_2), ya que es un solvente económico con puntos críticos de presión y temperatura bajos (74,8 bar y 31,1 °C, respectivamente) y es fácil de eliminar del extracto debido a que, en condiciones atmosféricas, es gaseoso. Además, el CO_2 está clasificado como GRAS tanto por la Autoridad Europea de

Introducción

Seguridad Alimentaria (EFSA) como por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) de los Estados Unidos (Cano-Lamadrid & Artés-Hernández, 2022). El único inconveniente del CO₂ es su baja polaridad, lo que lo hace ideal para la extracción de lípidos, grasas y sustancias no polares. Sin embargo, la limitación de la baja polaridad del CO₂ se ha superado con éxito mediante el uso de co-solventes o modificadores para obtener compuestos polares como los compuestos fenólicos, siendo el etanol, el co-solvente más utilizado en la SFE ya que actúa como modificador de la polaridad, permitiendo obtener un mayor rendimiento en el proceso (Leyva-Jiménez et al., 2022). Por ello, los resultados obtenidos mediante esta técnica van a depender directamente de la presión, la temperatura y del co-solvente utilizado ya que pueden ser modificados dentro de unos rangos para optimizar el proceso de extracción dependiendo del tipo de compuesto de interés y aumentar así su eficiencia y selectividad. Otros factores que también influyen en el éxito de la extracción son las características de la muestra como el tamaño de partícula y el contenido de humedad del material vegetal. Las principales ventajas que ofrece esta nueva tecnología con respecto a los métodos convencionales de extracción son la ausencia de residuos orgánicos y de degradación térmica, por lo que los extractos se consideran de gran calidad, además de que favorece la penetración en la muestra vegetal debido a las propiedades combinadas de estado supercrítico y todo esto, en menores tiempos de extracción (Azmir et al., 2013; Nastić et al., 2020).

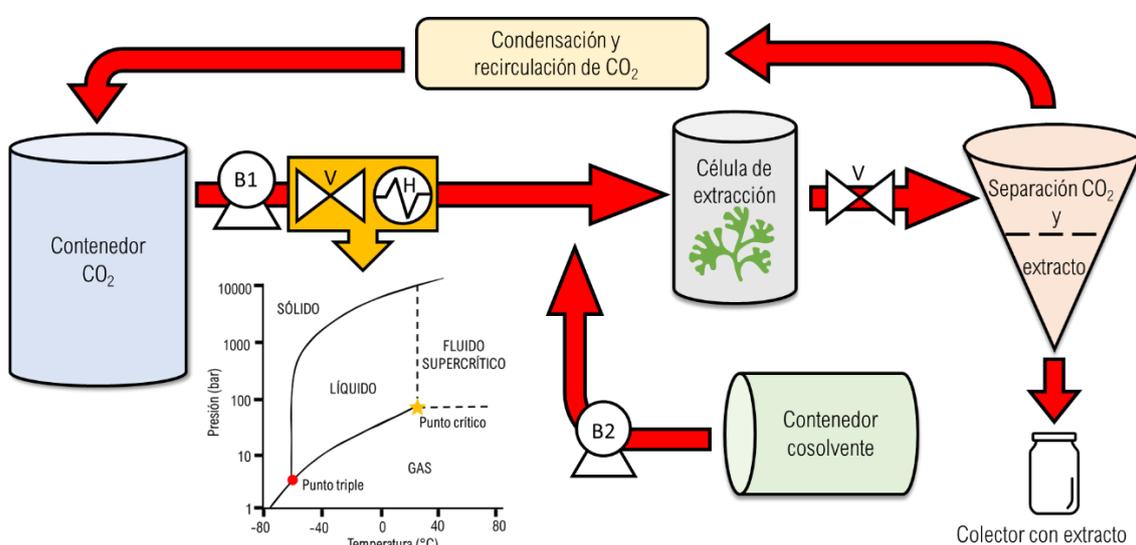


Figura 13. Esquema del proceso de extracción mediante la técnica de fluidos supercríticos. B1, bomba de CO₂; B2, bomba del cosolvente; V, válvula y H, calentador.

4.2.2 Extracción mediante Líquidos Presurizados (PLE)

Este método de extracción ha ido emergiendo como una tecnología de extracción alternativa debido a que es más eficiente en términos de tiempo, uso de solventes y recuperación de

compuestos, siendo una técnica segura y rápida frente a las técnicas de extracción convencionales. La PLE (Figura 14) consiste en un proceso extractivo que emplea como disolvente el agua y otros disolventes hidro-alcohólicos y que combina dos elementos principales: (1) aumento de temperatura y presión, y (2) interacción entre el solvente y los compuestos de la matriz.

El fundamento en que se basa la PLE es la aplicación de alta presión al solvente para que permanezca líquido más allá de su punto de ebullición normal. Se trata de un método que puede ser automatizado fácilmente, que además requiere de tiempos reducidos para la extracción y bajo suministro de disolventes puesto que las altas presiones y temperaturas se traducen en una extracción más rápida. Teniendo en cuenta el rendimiento, la reproducibilidad, el tiempo de extracción y el consumo de disolvente, el PLE se ha considerado como una alternativa a los métodos convencionales debido a que es un proceso más rápido y con un menor uso de disolvente. Gracias a la combinación de la interacción del solvente con las moléculas de la matriz vegetal y las elevadas temperaturas y presiones para una extracción más eficiente de los compuestos bioactivos, la velocidad de extracción en la PLE es bastante más rápida. Las altas temperaturas (hasta 200 °C) y presiones (> 70 bar) a las que se lleva a cabo esta extracción facilitan mucho la penetración del solvente en la matriz vegetal y el aumento de la temperatura del solvente por encima de su punto de ebullición aumenta la solubilidad de los compuestos a extraer. Además, disminuyen la viscosidad y la tensión superficial del solvente, lo que facilita su penetración en los poros de la matriz vegetal y provoca su disrupción, por lo tanto, mejora la transferencia de masa del analito de la muestra al solvente, hecho que mejora la eficiencia de la extracción. Otra característica de este proceso de extracción es que las muestras y extractos se encuentran protegidos del oxígeno y la luz, por lo que no sufren procesos de oxidación (Azmir et al., 2013; Ameer et al., 2017; Nastić et al., 2020; Sánchez-Mesa et al., 2020).

Introducción

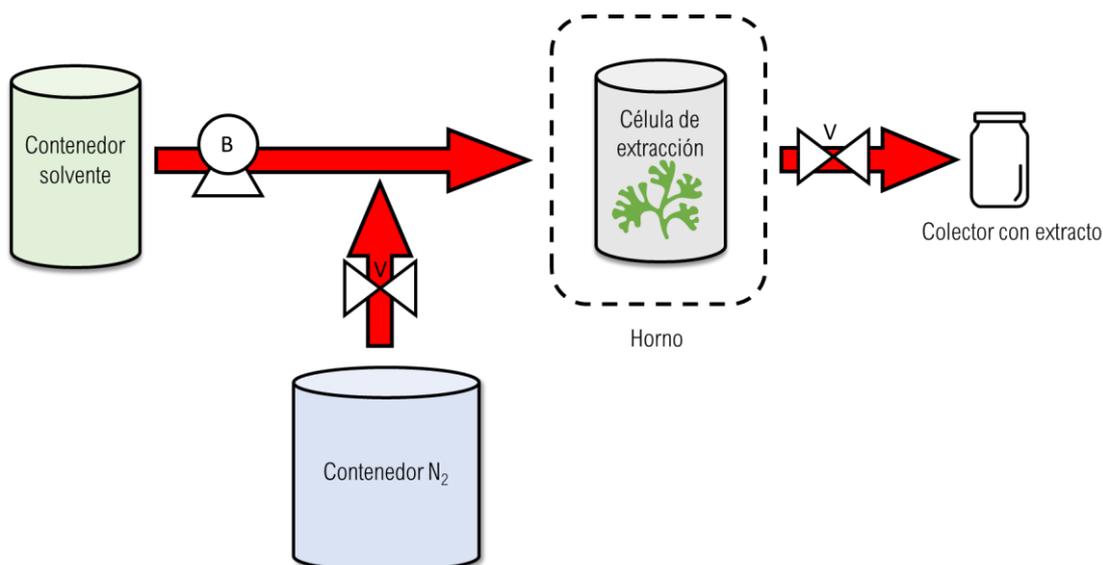


Figura 14. Esquema del proceso de extracción mediante la técnica de fluidos presurizados. B, bomba y V, válvula.

5. Revalorización de los subproductos del brócoli

En los últimos años, las investigaciones sobre la valorización de los subproductos de la industria agroalimentaria han aumentado considerablemente dado que las estrategias de revalorización pueden suponer un cambio de modelo productivo del sector y evolucionar hacia una economía circular más diversificada y sostenible, dando más valor añadido y competitividad. Estas estrategias pueden estar enfocadas en la obtención de nuevos ingredientes para la industria alimentaria, cosmética y/o farmacéutica. Además, hoy en día, los fabricantes se centran en la reducción del impacto ambiental de los subproductos industriales (residuo cero y economía circular) y en la recuperación de compuestos bioactivos de los subproductos agrícolas mediante el uso de recursos renovables, ofreciendo no solo beneficios ambientales sino también económicos y mejorando la eficiencia en la industria alimentaria.

5.1 Alimentación

La incorporación de subproductos de frutas y hortalizas, sus compuestos y/o sus extractos/polvos puede ser una estrategia relevante para la reformulación de ingredientes y productos de fortificación de “etiqueta limpia”. Los componentes bioactivos con alto valor nutritivo, como polisacáridos, proteínas, fibras, saborizantes y fitoquímicos obtenidos a partir de los subproductos y desechos de la industria agroalimentaria pueden utilizarse como ingredientes para el desarrollo de alimentos funcionales. Se denominan alimentos funcionales a los alimentos que por su contenido en compuestos bioactivos, fisiológicamente, proveen de beneficios a la salud del consumidor (Moreno et al., 2006). Por ello, cada día se le da más

importancia al uso de compuestos bioactivos derivados de subproductos de la industria agrícola como nuevos ingredientes que cumplen diversas funciones.

Recientemente, varios estudios han descrito la utilidad de los subproductos del brócoli en la producción de alimentos funcionales enriquecidos con compuestos bioactivos, como bebidas, bocadillos, pan o pasteles (Castelão-Baptista et al., 2021). Las harinas de brócoli han demostrado ser una buena fuente de fitoquímicos como suplementos dietéticos, ya que estas mantienen una adecuada composición nutricional y propiedades fisicoquímicas. Sin embargo, rara vez se agregan hojas o tallos de brócoli a los productos alimenticios, una tendencia que debe cambiarse. Los tallos de brócoli y otros subproductos se caracterizan por contener compuestos fenólicos (principalmente derivados del ácido hidroxicinámico y flavonoles glicosilados) y glucosinolatos. Se ha demostrado que la aplicación de un proceso de estabilización de los compuestos bioactivos a baja temperatura es capaz de preservar una alta cantidad de SFN bioaccesible, al tiempo que minimiza la pérdida de compuestos fenólicos. Al analizar la bioaccesibilidad de estos compuestos, se encontró que esta estabilización de las muestras de la parte central de los tallos proporcionó el material con mayor contenido de bioactivos, incluidos los antioxidantes fenólicos (13,6 y 33,9 g kg⁻¹ PS de ácidos feruloilquínico y sinapilquínico, respectivamente) y SFN (4,1 g kg⁻¹ PS, en promedio). Estas opciones de procesamiento permitieron obtener un nuevo producto o ingrediente rico en compuestos bioactivos y bioaccesibles a base de tallos de brócoli con potencial antioxidante y antiinflamatorio (Costa-Pérez et al., 2022).

En cuanto a los subproductos como posibles ingredientes para la industria de la alimentación, Shi et al., (2019) también demostraron el potencial de los subproductos de brócoli diferenciados por fracciones (hojas y tallos en polvo, jugo de hojas y tallos, pulpa resultante del jugo, el sedimento resultante del lavado de la pulpa y el sobrenadante del mismo) como materia prima para preparar una gama de nuevos ingredientes alimentarios con valor añadido. Los tallos y hojas de brócoli examinados demostraron ser ricos en proteínas (23,2 % PS), fibra (36,5 % PS) y polifenoles (11,4 mg GAE g⁻¹) siendo el ácido clorogénico, el ácido neoclorogénico y el ácido quínico los principales fenoles encontrados. Así, en base al PS, las fracciones de pulpa y la pulpa lavada mostraron estar enriquecidas en fibra en comparación con el jugo y el sobrenadante resultante del lavado de la pulpa, que resultaron más enriquecidos en proteínas. El jugo y el sobrenadante del lavado de la pulpa presentaron un mayor contenido de polifenoles y una mayor actividad antioxidante, lo que sugiere que los polifenoles fueron los principales contribuyentes a la actividad antioxidante. De esta forma los productos podrían suministrarse como ingredientes en polvo envasados, en el caso de tallos y hojas de brócoli y la pulpa restante

Introducción

del jugo, mientras que las fracciones del jugo y el sobrenadante del lavado de la pulpa podrían considerarse para ser concentradas y ofrecidas como un concentrado de nutrientes bebibles.

Liu et al. (2018) llevaron a cabo una evaluación integral de los nutrientes que se encuentran en los subproductos de brócoli para su aprovechamiento por los consumidores y productores, así como para la industria que emplee sus compuestos bioactivos. Según estos autores, aunque en los floretes del broccoli se determinó la mayor cantidad de glucorafanina y de aminoácidos en comparación con otras partes del brócoli estudiadas, las hojas presentaron mayor cantidad de nutrientes esenciales, entre los que se incluyen el β -caroteno (provitamina A), las vitaminas E y K, los minerales Mn y Ca, así como de contenido total de compuestos fenólicos y de actividad antioxidante; sugiriendo así, que las hojas de brócoli pueden ser una excelente fuente de nutrientes esenciales para la obtención de nuevos alimentos.

Algunos ejemplos sobre la incorporación de los subproductos de brócoli en la producción de alimentos funcionales es la realizada por Lafarga et al. (2019a) quienes introdujeron subproductos de brócoli a la formulación de *crackers* lo que incrementó su contenido en fibra alimentaria, compuestos fenólicos y glucosinolatos, así como la capacidad antioxidante en comparación con las tostas elaboradas solamente con harina. Los resultados obtenidos por estos autores sugieren que la cantidad de compuestos fenólicos y antioxidantes liberados durante la digestión puede ser mayor de lo que podría esperarse de los extractos obtenidos mediante fase acuosa-orgánica comunes. Estos mismos investigadores (Lafarga et al., 2019b) también probaron a introducir tallos y hojas de brócoli en polvo a las formulaciones de pan, lo que a concentraciones de 2 % (p/p) no afectó la aceptabilidad general, el aspecto o la textura. Es más, este hecho resultó no solo en una mayor calidad fisicoquímica sino también en una mayor calidad nutricional y propiedades bioactivas ya que la actividad antioxidante y los compuestos fenólicos derivados del brócoli fueron resistentes al proceso de elaboración del pan y a una digestión gastrointestinal simulada. Finalmente, también descubrieron que los compuestos fenólicos y la actividad antioxidante de los panes que contenían hojas en polvo fueron más altos tras 7 días desde el horneado, lo que sugiere que los compuestos fenólicos y demás antioxidantes que se encuentran en las hojas podrían ser más resistentes al procesamiento térmico y al almacenamiento que los que se encuentran en los tallos de brócoli.

También en este contexto de elaboración de productos horneados, los resultados de Drabińska et al. (2018) indicaron que el polvo de hojas de brócoli podría considerarse un buen suplemento para la elaboración de minibizcochos sin gluten. Los productos sin gluten a menudo tienen un valor nutricional bajo y la adición de hoja de brócoli en polvo puede compensar ese déficit. Esta

adición mejoró la actividad antioxidante de los minibizcochos sin gluten debido principalmente a su alto contenido en compuestos bioactivos. Curiosamente, la matriz de los minibizcochos sin gluten tuvo un efecto protector sobre la estabilidad de los glucosinolatos, los cuales tienen propiedades anticancerígenas. Por lo tanto, la suplementación de bizcochos sin gluten con hoja en polvo de brócoli podría ser una estrategia eficaz para administrar compuestos quimiopreventivos al cuerpo humano. En cuanto a la evaluación sensorial, estos autores indicaron que se debe agregar el polvo en cantidades moderadas para preservar los atributos sensoriales deseables de los minibizcochos sin gluten, incluidos el color, el aroma y el sabor. Además, la adición de hoja en polvo al 2,5 % como sustituto del almidón resultó en una mejora óptima del potencial nutracéutico de los bizcochos sin gluten sin comprometer su calidad sensorial. Asimismo, Krupa-Kozak et al. (2021) evaluaron el valor nutricional, la calidad tecnológica, las propiedades antioxidantes y la actividad inhibitoria contra la formación de productos finales de glicación avanzada (AGE) -unos factores implicados en el riesgo de padecer trastornos cardiovasculares- en pan sin gluten enriquecido con polvo de hoja de brócoli. Los resultados obtenidos demostraron que, en comparación con el control, el pan sin gluten que contenía este subproducto de brócoli se caracterizó por un contenido significativamente mayor de nutrientes (proteínas y minerales), así como por una mejora significativa en el volumen específico y su pérdida tras el horneado. Además, la adición de polvo de hojas de brócoli mejoró significativamente el potencial antioxidante y la actividad anti-AGE de este pan sin gluten. De esta forma, los autores destacaron que el polvo de hojas de brócoli se puede utilizar con éxito como componente de productos horneados sin gluten con propiedades tecnológicas y funcionales mejoradas. Por lo que su uso en productos de valor añadido de panadería podría proporcionar beneficios para la salud a los sujetos que siguen una dieta sin gluten.

También se han incorporado con éxito, subproductos de brócoli en otro tipo de alimentos, como los cárnicos. Banerjee et al. (2012) demostraron que la introducción de extractos de subproductos de brócoli en polvo al 0,1 y 0,2 % aumentó significativamente el contenido fenólico en *nuggets* de carne de cabra actuando como fuente de antioxidantes naturales. Además, tras la evaluación sensorial no se percibió ninguna diferencia en comparación con el control. Asimismo, el estudio de almacenamiento de los productos mostró que el extracto de brócoli en polvo redujo significativamente la peroxidación de lípidos, mejorando así la calidad y la estabilidad del producto.

Finalmente, se ha probado la incorporación de harina de subproducto de brócoli (entre otro tipo de subproductos) a la elaboración de queso Primosale. Los resultados destacaron que la adición

Introducción

de subproductos al queso Primosale mejoró las propiedades nutricionales y algunos atributos sensoriales como la friabilidad y la adhesividad (Costa et al., 2018). Asimismo, las harinas obtenidas a partir de tallos y hojas de brócoli fueron utilizadas por Lucera et al. (2018) para enriquecer un queso para untar. Los resultados mostraron que la inclusión del 5 % del subproducto en la formulación del queso aumentó el contenido fenólico total, el contenido total de flavonoides y la actividad antioxidante medida por los ensayos ABTS y FRAP en comparación con el control. Sin embargo, estos autores concluyeron que se deben evaluar otras opciones tecnológicas para obtener estas harinas vegetales con el fin de mejorar las propiedades del queso incrementando los compuestos antioxidantes sin comprometer las propiedades sensoriales.

5.2 Industria farmacéutica

Otro de los usos que se han propuesto para los subproductos de brócoli, debido a su contenido en compuestos de actividad biológica beneficiosa para la salud, están enfocados en la industria farmacéutica. En ese sentido, los efectos beneficiosos de los polifenoles y glucosinolatos sobre la salud humana han sido ampliamente descritos en la bibliografía, incluyendo la prevención de enfermedades cardiovasculares, diabetes tipo 2, algunos tipos de cáncer y enfermedades neurodegenerativas (Herr & Büchler, 2010; Avato & Argentieri, 2015; Castelão-Baptista et al., 2021; Gupta et al., 2022;).

En los últimos años, estudios *in vivo* e *in vitro* han demostrado el potencial efecto anti obesidad de los isotiocianatos presentes en las brásicas (Martins et al., 2018), potenciando los subproductos contra las disfunciones metabólicas relacionadas con la obesidad. Las propiedades antioxidantes de las brasicáceas se deben a la presencia de fitoquímicos antioxidantes, principalmente polifenoles y ácido ascórbico, y antioxidantes indirectos como el SFN. Se ha demostrado que el SFN aumenta la unión del factor nuclear eritroide-2 relacionado con el factor 2 (Nrf2) al ADN, más concretamente a los elementos de respuesta antioxidante (ARE), responsables de la regulación transcripcional de enzimas antioxidantes como catalasa, glutatión S-transferasa, glutatión-peroxidasa, peroxirredoxinas y hemoxigenasa (HO-1) (Kubo et al., 2017). Además, Lei et al. (2019) demostraron que el SFN modula el metabolismo de los lípidos en los hepatocitos, reduciendo los niveles de lípidos en casos de acumulación excesiva. Estas propiedades hacen del SFN un candidato idóneo contra una condición preocupante que arrasa principalmente en los países desarrollados como es la obesidad y sus complicaciones asociadas. Por otro lado, Ranaweera et al. (2022) evaluaron el efecto anti obesidad de extractos de hoja de brócoli (ricos en glucorafanina y SFN) en adipocitos 3T3-L1 y ratones ob/ob. Los resultados

mostraron que el extracto de hoja de brócoli desempeñaba un papel importante en la reducción de la acumulación de lípidos al aumentar la fosforilación de AMPK (considerada como una diana terapéutica importante en el tratamiento de la obesidad) y ACC (enzima metabólica clave en la síntesis de ácidos grasos) en los adipocitos 3T3-L1, donde también aumentan la captación de glucosa. Además, este extracto fue capaz de reducir la cantidad de lípidos séricos (triglicéridos, colesterol LDL y colesterol total), la glucosa en sangre y la acumulación de lípidos hepáticos en ratones ob/ob. Por tanto, los resultados obtenidos sugieren que el contenido de SFN en el extracto de hoja ejerce un efecto potencial contra la obesidad al normalizar la expresión de genes relacionados con el metabolismo de los lípidos, que están regulados al alza o a la baja en ratones ob/ob.

Con relación a la piel, se conoce que ésta es una capa protectora del cuerpo y que está en constante contacto con factores ambientales físicos y químicos lo que conduce a menudo al estrés oxidativo. Además, se ha observado que las células de la piel también están expuestas a especies reactivas de oxígeno (ROS) generadas durante el metabolismo celular (por ejemplo, con la síntesis de melanina o el metabolismo en las células del sistema inmunitario). Se ha demostrado que el SFN o extractos de hojas de brócoli, son capaces de producir una activación selectiva del factor de transcripción Nrf2 en queratinocitos, fibroblastos y melanocitos, sin llegar a producir efectos secundarios. Este factor es responsable de la transcripción de genes de proteínas antioxidantes como las interleucinas y su principal mecanismo de regulación es la unión a Keap1 que actúa como inhibidor de este factor. El mecanismo de acción del SFN en queratinocitos implica la reducción de los niveles de GSH, lo cual altera la conformación de Keap1 y sus propiedades inhibitoras y, en consecuencia, el Nrf2 activo se libera en el citoplasma y viaja al núcleo donde se une a ARE y aumenta la expresión de genes diana y de enzimas antioxidantes (NAD(P)H, NQO1, HO-1) (Ryšavá et al., 2020). Además, Dickinson et al. (2009) determinaron en su estudio que extractos de brócoli que contenían SFN fueron capaces de reducir el riesgo de carcinogénesis inducida por la radiación UV en ratones de la línea SKH-1. Este mismo extracto, también, redujo el tamaño de tumores de piel benignos en animales. Además, se han realizado estudios en voluntarios sometidos a luz ultravioleta y tratados con SFN y éstos mostraron una disminución en el desarrollo de eritema cutáneo hasta en un 90 %. Estos hallazgos podrían ser útiles en la búsqueda de nuevos medicamentos para personas con vitiligo o incluso melanoma (Gęgotek & Skrzydlewska, 2015). Por otro lado, péptidos hidrolizados provenientes de tallos de brócoli aplicados en queratinocitos humanos para el estudio de cicatrización de heridas tras su aplicación demostró una mayor proliferación de queratinocitos y una mayor reparación de la cicatrización de heridas. En la expresión génica y los niveles de

Introducción

proteína de los queratinocitos, se observó la regulación al alza del anti-oncogén p53, sobreexpresión de genes de respuesta antiinflamatoria y de factores de queratinización, lo que sugiere que las mezclas de péptidos obtenidas del brócoli aumentaron la proliferación celular y previnieron el crecimiento cancerígeno y descontrolado de las células. Esto alienta la apertura de nuevas líneas de investigación que involucren el uso de péptidos de brócoli para uso farmacéutico o cosmético (Nicolas-Espinosa et al., 2022).

Otras investigaciones han demostrado las propiedades anticancerígenas ligadas a la presencia de compuestos fenólicos de los extractos de hojas, tallos y floretes de diferentes cultivares (Kyoyoshi, Myeongil 96 y SK3-085) en diferentes líneas celulares tumorales, como NCI-H1299 (línea celular de carcinoma de pulmón) y HT-29 (línea celular de adenocarcinoma de colon de grado II). Los resultados obtenidos reflejaron que los extractos de hojas de Myeongil 96 demostraron tener el mayor efecto inhibitorio en la línea celular de carcinoma de pulmón, mostrando una reducción de la viabilidad de un $32,5 \pm 2,3$ %. Por otra parte, la mayor disminución de la viabilidad en la línea de carcinoma de colon se obtuvo con los extractos de hoja de la variedad Kyoyoshi con una reducción del $11,6 \pm 2,4$ % con respecto al control (Hwang & Lim, 2015). De igual forma, los compuestos fenólicos presentes en brotes de brócoli presentaron un efecto inhibitorio en la motilidad y el acoplamiento celular de dos líneas celulares de cáncer de próstata de potencial metastásico alto (MAT-LyLu) y bajo (AT-2). La adición a estas líneas de los extractos a una concentración de 1 mg ml^{-1} llegó a producir una disminución de la proliferación celular de forma dependiente de la dosis hasta alrededor de un 30 % en AT-2 y un 60 % en las MAT-LyLu (Gawlik-Dziki et al., 2012).

5.3 Cosmética

Con respecto al sector de la cosmética, actualmente los consumidores están más predispuestos a escoger productos de origen natural por lo que el aprovechamiento de los subproductos de la industria agroalimentaria supondría una gran fuente de compuestos bioactivos para estos productos. Es por esta razón, que cada vez más se busca incorporar estos elementos a la elaboración de nuevos productos cosméticos. En ese sentido, la industria cosmética puede representar una solución rentable sobre cómo reciclar los subproductos desechables, ya que la sostenibilidad y la seguridad humana también son los temas más relevantes para todos los productos cosméticos. Además, el mercado cosmético está en constante crecimiento y, a pesar de la crisis económica mundial de los últimos años, todavía se venden más de 5 mil millones de productos cosméticos cada año, siendo los más consumidos los destinados al cuidado de la piel (Barbulova et al., 2015).

Muchas alteraciones de la piel, como las quemaduras solares, la pigmentación, las arrugas, la dermatitis, la urticaria, el envejecimiento, los cánceres de piel y la inmunosupresión, se deben a la exposición extrema a las radiaciones nocivas del sol. El mero recubrimiento de la piel con gafas de sol, ropa u otros agentes externos no es un método de protección adecuado. Por lo tanto, la aplicación de protector solar se considera uno de los métodos más modernos para deshacerse del envejecimiento de la piel, las quemaduras solares y otros problemas relacionados que surgen debido a la exposición a las radiaciones ultravioleta (UV). Los agentes de protección solar bloquean los efectos nocivos del sol absorbiendo los rayos UV y los rayos solares visibles. Las plantas se han utilizado en medicina y cosmética desde hace siglos y es bien conocido su potencial para tratar diferentes enfermedades de la piel y para embellecer y mejorar el aspecto de la piel. En ese sentido, el retinol (vitamina A) y el ácido palmítico presentes en hojas de brócoli pueden servir como antioxidantes para mejorar el rendimiento del producto contra los efectos de envejecimiento por la exposición a los rayos UV o para mejorar las cualidades estéticas de los protectores solares. Además, el contenido en flavonoides y compuestos fenólicos, los cuales desempeñan un papel principal en la lucha contra los radicales libres que son la principal causa de numerosos cambios negativos en la piel, convertirían a estos extractos en potenciales agentes fotoprotectores (Mansuri et al., 2021). Ligęza et al., (2016) examinaron diferentes aceites extraídos en frío como potenciales ingredientes para el desarrollo de cosméticos, entre ellos escogieron aceite de semillas de brócoli. Los resultados que obtuvieron indicaron que los aceites naturales prensados en frío se pueden aplicar a la piel como cosméticos, y no presentaron efecto irritante, ya que sólo en raras ocasiones provocaron reacciones alérgicas, por lo que pueden ser susceptibles de su aplicación en nuevos productos cosméticos. Asimismo, Singu et al. (2019) elaboraron un lápiz labial que contenía un extracto etanólico de flor de brócoli como ingrediente. El extracto estaba enriquecido en compuestos como flavonoides, alcaloides, taninos, aceites volátiles, lignina, inulina, grasas, esteroides y triterpenoides y ceras. Estos compuestos confirieron al lápiz labial propiedades antioxidantes reduciendo el estrés oxidativo y previniendo el fotoenvejecimiento de los labios manteniéndolos nutridos y protegidos a largo plazo. Por otro lado, también se han probado los efectos antiinflamatorios de la fracción de hexano de la hoja de brócoli para confirmar la aplicabilidad como material funcional en alimentos y cosméticos. La producción de citoquinas proinflamatorias (TNF- α , IL-4, IL-6, IL-1 β), se vio inhibida en células RAW264.7 estimuladas con lipopolisacárido (LPS), así como la expresión de proteínas de iNOS y COX-2. Por tanto, se considera que la fracción de hexano de la hoja de brócoli tiene potencial para ser utilizada como un material antiinflamatorio natural en alimentos y cosméticos (Kim, 2022).

Objetivos

En base a los antecedentes descritos en la Introducción, el objetivo general de esta memoria se centra en desarrollar un sistema de producción sostenible de ingredientes bioactivos apostando por la valorización de los subproductos del brócoli (hojas y tallos) generados en grandes cantidades por la empresa Agrícola Santa Eulalia S.L, mediante el empleo de tecnologías limpias, para su incorporación a la fabricación de nuevos productos con aplicaciones cosméticas y nutraceuticas. Este objetivo general se desglosa en los siguientes objetivos concretos:

1. establecimiento de las condiciones óptimas de cultivo del brócoli en campo y de los subproductos originados tras la recolección del material cosechado.
2. optimización de las metodologías de extracción de los compuestos bioactivos que ejercen un efecto beneficioso para la salud humana.
3. estudio del efecto fotoprotector de los extractos procedentes de subproductos de brócoli sobre la línea celular HaCaT expuesta previamente a la radiación UV-B.
4. estudio de los mecanismos protectores desencadenados por los extractos enriquecidos en compuestos bioactivos procedentes de los subproductos de brócoli sobre la línea celular HaCaT expuesta previamente a la radiación UV-B.
5. análisis del efecto reparador de los extractos enriquecidos en compuestos bioactivos procedentes de los subproductos de brócoli sobre la barrera de queratinocitos de piel dañados por heridas superficiales.
6. evaluación de la actividad citotóxica del extracto enriquecido en glucosinolatos obtenido mediante extracción con fluidos presurizados sobre la línea celular CCD-18Co.
7. estudio de los mecanismos protectores desencadenados por los extractos enriquecidos en glucosinolatos procedentes de los subproductos de brócoli sobre la línea celular CCD-18Co expuesta al LPS.

Material y métodos

1. Material vegetal

Los subproductos (tallos y hojas) de brócoli (*B. oleracea* var. *italica*) cv Parthenon, Naxos y Bellaverde fueron proporcionados por la empresa Agrícola Santa Eulalia S.L (Murcia, España) dedicada a la producción y comercialización de alimentos hortofrutícolas estando considerada como una de las principales exportadoras de brócoli de la Región de Murcia. Así, una vez recolectados los floretes, es decir, la parte destinada a la alimentación, los subproductos generados (hojas y tallos) se utilizaron como material vegetal (Figura 15) para llevar a cabo la extracción de los compuestos bioactivos y su posterior uso como posible material con propiedades interesantes para la industria cosmética y/o alimentaria.

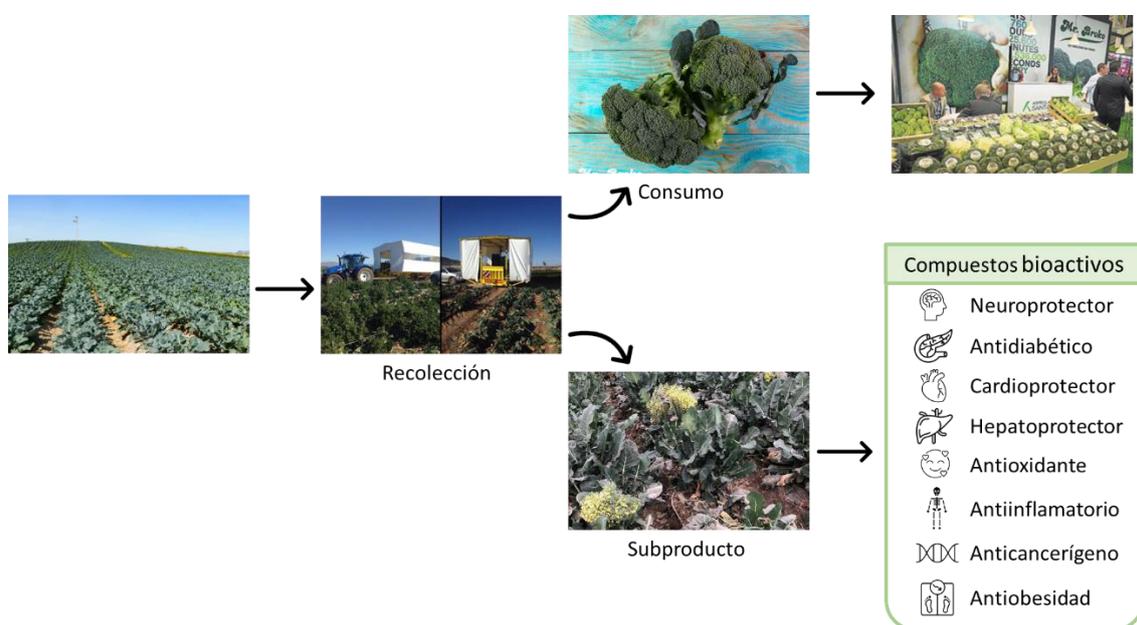


Figura 15. Procesado del cultivo del brócoli.

1.1 Optimización del secado de los subproductos

Para la obtención de los compuestos bioactivos de los subproductos, en primer lugar, se procedió a optimizar el proceso de deshidratación de los subproductos utilizando para ello los subproductos de la variedad de brócoli Parthenon (Figura 16). Todo este proceso de optimización se llevó a cabo en las instalaciones del Centro Tecnológico Nacional de la Conserva y Alimentación (en adelante CTC). Para ello, una vez recogidos por separado los subproductos (hojas y tallos) por parte de los operarios de la empresa Agrícola Santa Eulalia, estos se enviaron al CTC en vehículos refrigerados con el fin de mantener todas las propiedades del subproducto. Una vez en el CTC, se llevó a cabo un primer proceso de secado del material vegetal que consistió en la deshidratación de 15 kg de hojas y 15 kg de tallos de manera independiente (Figura 16A). Durante este proceso de deshidratación, las muestras se mantuvieron en una cámara climática

Material y métodos

a 70 °C durante 24 h hasta que alcanzaron una humedad relativa del 4 %. Posteriormente, se procedió a la molienda de los subproductos previamente deshidratados usando para ello un molino de cuchillas. Finalmente, el polvo obtenido se tamizó para obtener fracciones más representativas y homogéneas obteniendo así un polvo fino procedente de hojas secas y por otra parte el polvo seco de los tallos.

El segundo proceso de deshidratación de los subproductos consistió en realizar, primeramente, el triturado o molienda del material vegetal en estado fresco (Figura 16B). Para ello, las hojas y tallos de brócoli de la variedad Parthenon en proporción 3:1 (hoja/tallo) se cortaron previamente a un tamaño de 10 x 10 µm usando una cortadora Urschell® Modelo G-A y a continuación, se trituraron hasta obtener una masa fina con un procesador Comitrol® modelo 1700 Urschell. Posteriormente, se secaron en una cámara de secado a 55 °C durante 24 h hasta alcanzar una humedad final del 4 %. Tras el proceso de secado, los subproductos se sometieron a un proceso de molienda y tamizado con el fin de obtener fracciones representativas con un tamaño de partícula reducido para aumentar la superficie de contacto y con ello, la eficacia de los procesos de extracción de compuestos bioactivos. El proceso de molienda aplicado fue por impacto y cizalla con un molino ultracentrífugo, lo que garantizó la reducción rápida pero cuidadosa de la granulometría de la muestra. El molino estaba dotado de un rotor de 12 dientes, así como de una batería de tamices anulares de separación con diferente abertura de malla, adecuados para materiales termosensibles. Las velocidades de trabajo del rotor oscilaron entre 6.000 y 18.000 rpm. Las muestras tamizadas se almacenaron a -20 °C y en oscuridad hasta su uso.

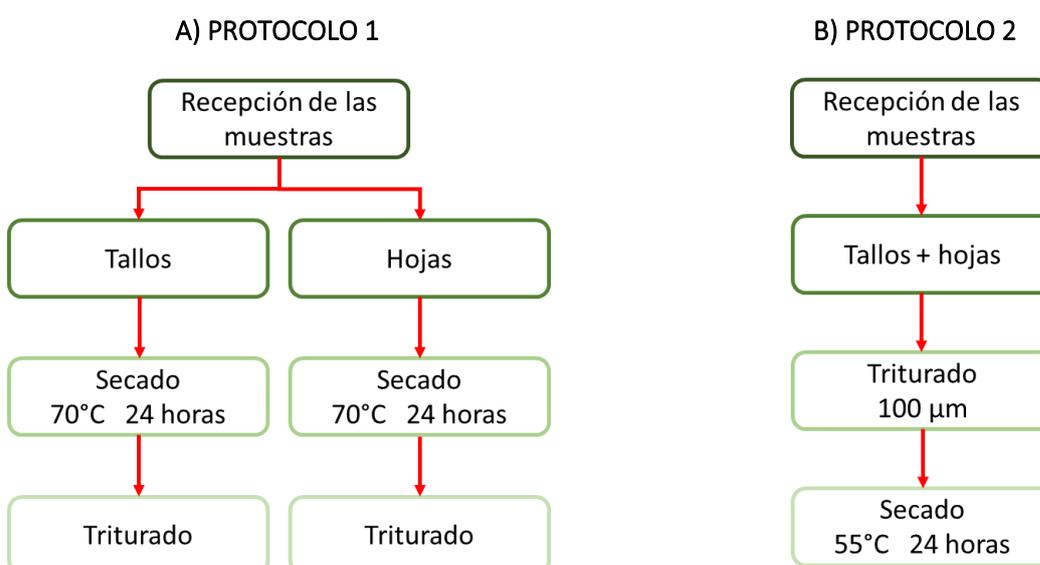


Figura 16. Organización de la primera prueba del proceso de secado de los subproductos de brócoli.

2. Técnicas extractivas de compuestos bioactivos

2.1 Extracción convencional (EC)

La extracción de los compuestos bioactivos a partir de los subproductos de brócoli previamente triturados y deshidratados se llevó a cabo utilizando hojas y tallos por separado o en combinación, utilizando diferentes proporciones de estos subproductos: 1:1, 1:3 y 3:1, (hoja/tallo; p/p). Para ello, 100 mg de las diferentes proporciones de los subproductos se incubaron con metanol:Tris-HCl (50 mM, pH 7,5) (1:1; v/v) en un baño de hielo y en la oscuridad durante 20 min. Luego, se añadió cloroformo (1:1, v/v) y las muestras se centrifugaron a 15.000 \times g durante 5 min. La fase orgánica se recogió y se evaporó a 40 °C en un rotavapor (Rotavapor®100, Buchi). Finalmente, los extractos secos se disolvieron en 500 μ L de etanol y se filtraron a través de filtros de jeringa de nylon de 0,2 μ m y se almacenaron a -20 °C hasta su posterior análisis. El rendimiento de extracción (RE) se calculó como el porcentaje de masa total de extractos secos por gramo de materia prima extraída utilizada en los procedimientos de extracción (RE = (cantidad de extracto seco/cantidad de materia prima) x100).

Los glucosinolatos se extrajeron siguiendo el protocolo de Hellin et al., 2016. Para ello, se utilizaron 200 mg de los subproductos homogeneizados y secos a los cuales se les adicionaron 4,5 ml de metanol al 70 % y se incubaron a 73 °C en un baño de agua durante 20 min, agitando vigorosamente en un vórtex cada 5 min. Este paso permitió desnaturalizar la enzima mirosinasa para evitar la degradación de los glucosinolatos. A continuación, las muestras se enfriaron en un baño de hielo durante 5 min y transcurrido ese tiempo, se centrifugaron durante 15 min en una centrífuga Sorvall RC5B plus a 10.000 \times g y a 4 °C. Este proceso se realizó dos veces y finalmente, la fase metanólica se evaporó utilizando un speed-vac Syncore polivap Büchi (Suiza) a 40 °C durante 1 h a 240 rpm, para obtener un extracto seco. Finalmente, el extracto seco se resuspendió en 2 ml de agua desionizada. Las muestras se almacenaron a -20 °C hasta su análisis.

2.2 Extracción de compuestos hidrosolubles sin el uso de disolventes orgánicos

La extracción de compuestos hidrosolubles sin el uso de disolventes orgánicos de los subproductos del brócoli se llevó a cabo a partir de 25 kg de subproducto de brócoli (hojas y tallos) en las instalaciones del CTC. Para ello, el material vegetal se homogeneizó con 100 litros de agua y posteriormente, la mezcla se calentó a 98 °C durante 1 h. Transcurrido ese tiempo, se realizó una separación sólido-líquido con un tamiz y se concentró el líquido a 60-65 °C y a -0,8 bares hasta eliminar el 90 % de agua. Finalmente, el extracto concentrado se liofilizó para obtener un extracto seco que se conservó a -20 °C hasta su uso.

Material y métodos

2.3 Extracción mediante fluidos supercríticos (SFE)

La SFE se llevó a cabo en un sistema Waters Prep Supercritical Fluid Extraction (SFE-100Waters®, TharSFC, Thar Technologies, Inc., Pittsburgh, PA, EE.UU.) equipado con dos bombas P-50 (CO₂ y co-solvente), dos intercambiadores de calor, un recipiente de extracción presurizado (100 ml), dos recipientes de recolección presurizados y tres reguladores de contrapresión automatizados, que permite trabajar con CO₂ como fluido supercrítico en un rango amplio de presiones y temperaturas, así como modificar su polaridad con diferentes tipos de co-solventes. El sistema de SFE estaba conectado a un enfriador Accel 500 LC de Thermo Scientific Scientific (TharSFC, Thar Technologies, Inc., Pittsburgh, PA, EE. UU.).

El subproducto de brócoli en polvo se cargó en el recipiente de extracción de la siguiente forma: se mezclaron 15 g de la muestra (hoja/tallo, 3:1) con arena de mar en una proporción 2:1, la válvula se taponó con lana de vidrio por la parte superior para prevenir la pérdida de muestra. Cada procedimiento se llevó a cabo en modo dinámico. Los extractos obtenidos se evaporaron en un rotavapor (Rotavapor®100, BÜCHI Labortechnik AG, Flawil, Suiza) a 35 °C y se mantuvieron a -20 °C. Los extractos secos se reconstituyeron en etanol a una concentración 1 mg ml⁻¹ y se filtraron usando filtros de nylon de jeringa de 0,2 µm y se guardaron a -20 °C hasta su posterior análisis. El RE se calculó como se describe en la sección de extracción convencional 2.1.

2.4 Extracción mediante fluidos presurizados (PLE)

Con la finalidad de extraer los glucosinolatos característicos de las brásicas, se llevó a cabo el proceso de extracción mediante PLE a partir de los subproductos de brócoli NX. Esta técnica consiste en un proceso extractivo que emplea agua y sus mezclas hidro-alcohólicas como disolventes que se encuentran a condiciones de presión y temperatura inferiores a las de su punto crítico.

Para ello, las extracciones se realizaron con un equipo extractor de líquidos presurizados Dionex ASE 350 (Dionex Corp., Sunnyvale, CA, EE. UU.). Las celdas de extracción se componen de cuerpo de extracción y tapas. Cada tapa está equipada con una frita de acero inoxidable. Para llevar a cabo la extracción, se mezclaron de manera homogénea 2 g de subproducto seco de brócoli NX (fracción hoja/tallo, 3:1) con 4 g de arena y las muestras se cargaron en las celdas de extracción de acero inoxidable de 33 ml. Previamente, se colocó un filtro de celulosa en cada una de las tapas para evitar el paso de partículas en suspensión al vial de recolección. A continuación, estas celdas fueron introducidas en un horno, selladas y sometida durante un tiempo determinado a la temperatura y presión establecidos para cada condición. Tras finalizar los ciclos de extracción,

los extractos obtenidos se enfriaron inmediatamente en hielo hasta alcanzar una temperatura de 20 a 25 °C. Posteriormente, los extractos se filtraron a través de un filtro de celulosa de 0,22 µm y se centrifugaron a 12.000 rpm durante 15 min a 4 °C en una centrífuga (Sorvall ST 16 R, Thermo Scientific, Leicestershire, Reino Unido). Finalmente, los sobrenadantes se evaporaron al vacío (13 kPa) a 35 °C hasta sequedad en un Speed-Vac Savant SC250EXP (Thermo Scientific, Leicestershire, Reino Unido). Los extractos resultantes se almacenaron a -20°C protegidos de la luz hasta su posterior análisis.

Las condiciones de extracción PLE para la recuperación de glucosinolatos se aplicaron mediante metodología RSM con un diseño experimental CCD 2³ (3 variables independientes y dos niveles) aplicado utilizando el software Statgraphics Centurion XVI. Como variables independientes, se fijaron temperatura (53 - 200 °C), porcentaje de etanol (5 -95 %) y tiempo de extracción (3 – 22 min). La variable respuesta fue el contenido en glucosinolatos (µg g⁻¹ de extracto). En total, se llevaron a cabo 16 experimentos en orden aleatorio. El RE se calculó como se describe en la sección 2.1 de Material y métodos.

3. Cuantificación de compuestos bioactivos

3.1 Fitoesteroles y α-tocoferol

La identificación y cuantificación de fitoesteroles y α-tocoferol se basó en los espectros de masas obtenidos por cromatografía de gases (GC), utilizando un sistema Agilent Technologies 6890 Network GS, equipado con un detector selectivo de masas (Agilent Technologies 5973) y una columna capilar de 30 m x 0,25 mm (Agilent 19091 S-433HP-5MS) como describe Sabater-Jara & Pedreño. (2013). La temperatura del horno se fijó inicialmente en 60 °C y se aumentó hasta 310 °C a razón de 10 °C min⁻¹. Se utilizó un caudal constante de 0,1 ml min⁻¹ usando helio como gas portador. El rango de masas se controló desde m/z 50–800, con una energía de ionización de 70 eV. El volumen de inyección fue de 1,0 µl. La identificación de los diferentes fitoesteroles (campesterol y β-sitosterol) y α-tocoferol se confirmó comparando los espectros de masas experimentales obtenidos con los proporcionados por la base de datos de la biblioteca de espectros del NIST (coincidencia > 90 %). La concentración se estimó en base a una curva estándar utilizando los patrones correspondientes. Los datos se adquirieron y procesaron con el software Chemstation.

Material y métodos

3.2 Clorofilas y carotenoides

Tanto las clorofilas a y b como los carotenoides totales se determinaron usando un espectrofotómetro Jasco V-730 (Easton, MD, EE. UU.). Para ello, se midieron las absorbancias a 664,2, 648,6 y 450 nm y se cuantificó el contenido de clorofilas a y b mediante las siguientes fórmulas indicadas en el protocolo de Sumanta et al. (2014):

$$\text{Clorofila a } (\mu\text{g ml}^{-1}) = 13,36 * A_{664,2} - 5,19 * A_{648,6}$$

$$\text{Clorofila b } (\mu\text{g ml}^{-1}) = 27,43 * A_{648,6} - 8,12 * A_{664,2}$$

Siendo A la absorbancia a las diferentes longitudes de onda que se indican en el subíndice.

La cuantificación de β -caroteno se llevó a cabo a partir de una recta de calibrado de este compuesto disuelto en etanol absoluto en un rango de concentración desde 1 hasta 80 $\mu\text{g ml}^{-1}$ y se midió la absorbancia a 450 nm. El contenido total de β -caroteno se calculó a partir de la regresión lineal de la recta de calibrado ($R^2 = 0,9992$).

3.3 Compuestos fenólicos

Para la cuantificación de los compuestos fenólicos se usó el método de Folin-Ciocalteu (Singleton et al., 1999). Para ello, se tomaron 50 μl de los extractos etanólicos y se transfirieron a tubos de ensayo que contenían 750 μl de agua destilada. A continuación, se añadieron 50 μl de reactivo de Folin-Ciocalteu y transcurridos 3 min de incubación, se adicionaron 150 μl Na_2CO_3 al 20 % (p/v). Después de 2 h de reacción a temperatura ambiente, se determinó la absorbancia a 760 nm usando un espectrofotómetro Jasco V-730 (Easton, MD, EE. UU.) y se comparó con una curva de calibrado realizada con ácido gálico con un rango de concentración de 0,01 a 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ ($y = 0,0819x + 0,0004$; $R^2 = 0,999$). El contenido de fenoles totales se expresó como equivalentes de ácido gálico (GAE) g^{-1} de extracto. Todos los análisis se llevaron a cabo por triplicado, frente a un blanco con etanol.

3.4 Glucosinolatos

La identificación y cuantificación de los glucosinolatos se llevó utilizando un sistema cromatográfico Agilent Series 1200 (Agilent Technologies) acoplado a un espectrómetro de masas triple cuadrupolo (MS/MS), con fuente de ionización por electrospray (ESI) operando en modo negativo, siguiendo la metodología descrita por Hellín et al (2016). Además, se utilizó N_2 como gas nebulizador a una presión de 60 psi y el flujo se ajustó a 13 l min^{-1} . La temperatura y el voltaje del capilar se mantuvieron a 350 $^\circ\text{C}$ y 4 kV, respectivamente. La separación

cromatográfica se realizó en una columna Luna C18 (250 mm × 46 mm, tamaño de partícula de 5 µm; Phenomenex, Macclesfield, Reino Unido) con una precolumna C18-ODS (4 mm × 30 mm) (Security Guard, Phenomenex, Macclesfield, Reino Unido). La fase móvil consistió en ácido trifluoroacético 0,1 % en agua (A) y ácido trifluoroacético 0,1 % en acetonitrilo (B) como disolventes. El flujo se mantuvo en 0,7 ml min⁻¹ y el volumen de inyección fue de 20 µl. Los glucosinolatos se identificaron utilizando 4-hidroxi-glucobrasicina, 4-metoxi-glucobrasicina y neoglucobrasicina extraídas de semillas de colza certificadas (ERM BC367, Sigma Aldrich, Steinheim, Alemania) y glucobrasicina suministrada por Phytoflan Diehm & und Neuberger GmbH (Heidelberg, Alemania). Las transiciones MRM utilizadas para la identificación de cada uno de los compuestos fueron m/z 463→97 para 4-hidroxi-glucobrasicina, 447→97 para glucobrasicina y 477→97 para 4-metoxi-glucobrasicina y neoglucobrasicina. Todos los compuestos se cuantificaron usando el estándar externo de glucobrasicina.

4. Determinación de la capacidad antioxidante de los extractos

La capacidad antioxidante de los extractos enriquecidos en compuestos bioactivos procedentes de los subproductos de brócoli se evaluó analizando el efecto de los diferentes extractos etanólicos sobre el radical libre ABTS* mediante método de la capacidad antioxidante en equivalentes de Trolox (TEAC, por sus siglas en inglés) o método del ABTS. La actividad de las muestras sobre el ABTS* se midió espectrofotométricamente a 414 nm usando un espectrofotómetro Jasco V-730 (Easton, MD, EE. UU.). El medio de reacción contenía 2 mM ABTS*, 45 µM H₂O₂, 330 ng ml⁻¹ de peroxidasa de rábano (HRP VI) y 12 mM tampón acetato sódico a pH 5,0. Tras la generación del radical ABTS* por el sistema H₂O₂/HRP, se añadieron 10 µl de extracto, siguiendo la reacción a 414 nm después de 24 h de incubación a 20 °C en oscuridad. Todos los experimentos se realizaron por triplicado. Los resultados se expresaron como mg equivalentes de Trolox g⁻¹ de extracto realizando para ello, una recta de calibrado con el antioxidante de referencia, Trolox.

5. Ensayos de bioactividad de los extractos en cultivos celulares humanos

5.1 Líneas celulares y condiciones de cultivo

Para la evaluación de las capacidades tecnológicas para su aplicación como ingrediente nutracéutico y cosmético, la eficacia de los extractos enriquecidos en compuestos bioactivos procedentes de los subproductos de brócoli se determinó sobre dos líneas celulares humanas:

Material y métodos

- **línea celular de queratinocitos humanos no cancerosos (HaCaT)** (CLS Cell Lines Service, 300493), una línea de queratinocitos inmortales aneuploides transformados espontáneamente que crecen en monocapa procedentes de piel de un varón caucásico de 62 años. Se trata de una línea no tumoral que posee una alta capacidad de proliferación *in vitro* por lo que se ha usado ampliamente como modelo celular para el estudio de diferentes patologías relacionadas con la piel (Colombo et al., 2017). Esta línea celular se mantuvo en medio DMEM (Medio de Eagle modificado por Dulbecco) suplementado con 4,5 g l⁻¹ de glucosa, 2 mM de L-glutamina, 10 % de suero bovino fetal (SBF) y rojo fenol como indicador de pH.

Para el subcultivo de esta línea celular primero se retiró el medio de cultivo viejo con las células muertas que pudiera contener y se lavó la capa de células con 5 ml de PBS (tampón fosfato salino) para eliminar cualquier célula muerta que hubiera quedado. A continuación, se retiró el PBS y se añadió 3 ml de EDTA 0,05 % al frasco y se mantuvo en incubación a 37 °C durante 10 min o hasta que las células comenzaron a redondearse. Tras ese tiempo, se retiró el EDTA y se sustituyó por 3 ml de Tripsina/EDTA al 0,05 %/0,025 % y tras 1-2 min las células comenzaron a desprenderse. Una vez despegadas la tripsinización se detuvo añadiendo 5 ml de medio completo (que contenía α_1 -antitripsina). Para el mantenimiento de la línea, el subcultivo se realizó a razón de 1:10, y para los ensayos, las células despegadas se recogieron en un tubo estéril para continuar con la centrifugación a 300 g durante 3 min.

- **línea celular de fibroblastos de colon humano no cancerosos (CCD-18Co)** (ATCC® CRL1459™), suministrada por el Servicio de Cultivos de tejidos del Área Científica y Técnica de Investigación (ACTI) de la Universidad de Murcia. Esta línea celular se aisló por primera vez de tejido sano de colon de una niña afroamericana de 2,5 meses. Se trata de una línea finita que crece de forma adherente hasta que las células alcanzan el nivel de duplicación de la población 42 o PDL 42 (por sus siglas en inglés *Population Doubling Level*), a partir del cual empieza a presentar senescencia. El PDL se determinó a partir de la siguiente fórmula:

$$PDL = 3,32(\log NF - \log NI) + X$$

siendo NF, número final de células, o células que se recogen; NI, número inicial de células que se siembran y X, el número de PDL del que se parte al realizar la siembra. La línea celular CCD-18Co se mantuvo en medio EMEM (Medio Esencial Mínimo de Eagle) suplementado con un 10% de SBF y rojo fenol.

Para el subcultivo de la línea celular de colon, una vez las células alcanzaron la confluencia adecuada (80-90 %) se les eliminó el medio viejo con las posibles células muertas que

estuvieran en suspensión y la monocapa de fibroblastos se lavó con unos 5 ml de PBS. A continuación, se retiró el PBS y se añadió 3 ml de Tripsina/EDTA 0,25 %/0,02 % y se incubaron las células durante unos 5 min hasta que las células se despegaron. En ese momento se detuvo la tripsinización con medio completo EMEM con suero (que contiene α_1 -antitripsina). Los subcultivos rutinarios para el mantenimiento de la línea se realizaban a razón de 1:2 o 1:3. Para la siembra de ensayos se recogieron las células y se centrifugaron a 125 g durante 5 min.

Ambas líneas celulares se mantuvieron en un incubador Thermo Scientific™ Forma™ Steri-Cult™ CO₂ Incubator (Thermo-Fischer Scientific, Wilmington, Delaware, EE. UU.) a 37 °C en frascos de cultivo de 75 cm² (Nunc, Roskilde, Dinamarca) adherentes y ventilados que permitían el paso CO₂ al interior y en una atmósfera que contenía el 5 % de CO₂ y 95 % de humedad relativa. El medio de cultivo, que contenía rojo fenol, se les renovaba cada 3-4 días, aproximadamente.

El subcultivo se realizó en el momento en el que las células alcanzaban entre un 80 y un 90 % de la confluencia, siguiendo para ello los pasos indicados por el distribuidor de cada una de las líneas. Una vez despegadas del frasco las células eran centrifugadas y resuspendidas posteriormente en medio sin rojo fenol y se contaban para determinar el número de células totales recogidas, así como el porcentaje de viabilidad. Para ello se preparó una dilución 1:1 de la suspensión celular y de colorante azul de tripano (que tiñe de color azul las células muertas). De esta mezcla se tomó una alícuota de 10 μ l para realizar el conteo en un contador celular automático TC10™ (Bio- Rad; Hercules, EE. UU.). Tras el recuento, la siembra se realizó en los frascos descritos anteriormente, en el caso de mantenimiento de la línea, o en las placas correspondientes de 96, 24 o 6 pocillos, dependiendo del tipo de ensayo a realizar. Toda la manipulación de las células se llevó a cabo en la cabina de flujo laminar.

5.2 Caracterización del crecimiento de las líneas celulares

Para la caracterización del crecimiento de las líneas celulares, en el caso de la línea celular HaCaT, puesto que no existían ensayos previos sobre el crecimiento de esta línea celular, se llevó a cabo un estudio temporal durante 24, 48, 72, 96 y 120 h utilizando diferentes densidades celulares de siembra (12.800, 6.400, 3.200, 1.600, 800 y 400 células por pocillo) tomando como punto de partida la densidad celular de siembra óptima recomendada por el fabricante (1×10^4 células cm⁻², equivalente a 3.200 células por pocillo en el caso de las placas de 96 pocillos). Se sembraron 10 réplicas por cada densidad y tantas placas como puntos temporales se estudiaron.

Material y métodos

Una vez se realizaron las curvas de crecimiento de la línea celular HaCaT, se calculó el tiempo de duplicación y la velocidad máxima de crecimiento de la línea según los resultados obtenidos de las curvas a partir de diferentes inóculos. Para estos cálculos se escogieron los datos obtenidos de la fase de crecimiento exponencial de cada una de las curvas y se usaron para ello las siguientes ecuaciones:

$$TD = \frac{\ln 2}{\mu}$$
$$\mu = \frac{\ln(Xf/Xi)}{t}$$

Siendo:

TD: tiempo de duplicación (d); μ : velocidad máxima (d^{-1}); Xf: número de células final; Xi: número de células inicial; t: tiempo (d).

Para la línea de colon (CCD-18Co), las células se sembraron a una densidad de entre aproximadamente 3.000 y 6.000 células cm^{-2} en medio EMEM durante el tiempo requerido para cada tipo de ensayo. La caracterización del crecimiento se llevó a cabo en placas de microtitulación de 96 pocillos y una vez sembradas se mantuvieron en oscuridad en un incubador a 37 °C y 5% CO_2 .

5.3 Ensayos de viabilidad celular

La determinación de la viabilidad de las células HaCaT y CCD-18Co se llevó a cabo mediante el ensayo del MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio) modificado por Denizot & Lang (1986). Se trata de un método colorimétrico que mide cuantitativamente la actividad metabólica de las células viables. Mediante este ensayo, la sal de tetrazolio (MTT), de color amarillo e hidrofílica, es reducida a un compuesto hidrofóbico, el formazano ((E,Z)-5-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-1,3-difenilformazano), de color violeta (Figura 17), por acción de las oxidoreductasas mitocondriales de las células metabólicamente activas.

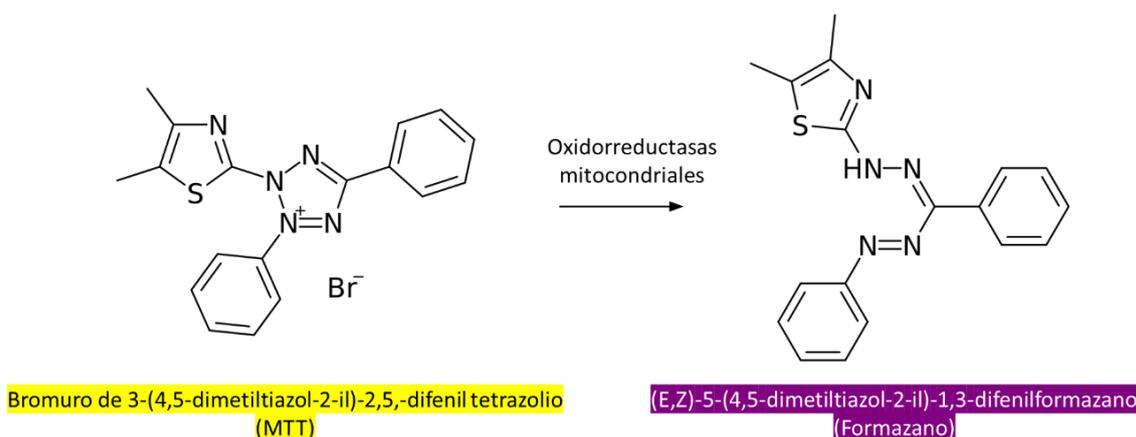


Figura 17. Conversión del MTT en formazano por medio de las oxidorreductasas presentes en las mitocondrias.

Para realizar el ensayo de MTT, primero se realizó la siembra de cada una de las líneas celulares y se dejaron en incubación durante 24 h para conseguir la adherencia de las células a la base de los pocillos y que comenzara la fase de crecimiento. Tras ese tiempo, las células se expusieron a los extractos/agentes objeto de estudio. Transcurrido el tiempo de incubación con los extractos/agentes a estudiar, o bien el tiempo necesario para la realización de las curvas de crecimiento, se retiró todo el medio de cultivo de cada pocillo y se sustituyó por 200 μl de una solución de MTT (1 mg ml^{-1}) preparada en medio de cultivo base DMEM/EMEM sin rojo fenol y sin SBF, para la línea celular HaCaT y CCD-18Co, respectivamente. Transcurridas 4 h se retiró la solución de MTT y las sales de formazano violetas formadas debido a la reducción del MTT se disolvieron en 100 μl de dimetilsulfóxido (DMSO). Tras 5 min de suave agitación se midió la absorbancia con un lector de placas Omega Fluostar (BMG Labtech, Ortenberg, Alemania) a 570 nm (realizando una corrección a 690 nm). La viabilidad celular se determinó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Viabilidad celular} = \frac{(\text{Abs } 570 \text{ nm} - \text{Abs } 690 \text{ nm})_{\text{ensayos}}}{(\text{Abs } 570 \text{ nm} - \text{Abs } 690 \text{ nm})_{\text{control}}} \times 100$$

5.3.1 Ensayos de citotoxicidad de los extractos enriquecidos en compuestos bioactivos

Para la línea celular HaCaT se comprobó el efecto citotóxico de los extractos enriquecidos en compuestos bioactivos obtenidos mediante SFE y PLE. Como paso previo para la evaluación de la citotoxicidad de los extractos SFE enriquecidos en compuestos bioactivos sobre la línea celular HaCaT, estos se resuspendieron en DMSO ya que se trata de un disolvente orgánico ampliamente usado en estudios con cultivos celulares a diferencia del etanol, disolvente utilizado para la cuantificación de los compuestos bioactivos del extracto. Por ello, en primer

Material y métodos

lugar, se realizó un estudio temporal durante 12, 24 y 48 h de la citotoxicidad de diferentes concentraciones de DMSO (0,1, 0,25, 0,5 y 1%). Para ello, se sembraron 3 placas (cada una correspondiente con un punto temporal, en este caso 12, 24 y 48 h) de 96 pocillos con una concentración celular de 5.000 células por pocillo. Tras 24 h desde la siembra, una vez que las células estaban adheridas a la placa y en fase de crecimiento, se adicionó DMSO a diferentes concentraciones con 6 réplicas por cada concentración, además del control con el medio de cultivo y se mantuvieron en oscuridad en un incubador a 37 °C y 5 % CO₂. Trascurridos los tiempos de incubación indicados, se llevó a cabo la determinación de la viabilidad celular en presencia del DMSO mediante el ensayo del MTT. Una vez determinada la concentración mínima de DMSO que afectaba significativamente a la viabilidad celular se procedió a evaluar la citotoxicidad del extracto enriquecido en compuestos bioactivos obtenidos mediante SFE. Así, trascurridas 24 h desde la siembra, se adicionaron diferentes concentraciones de extracto SFE disueltos en DMSO (0,1, 0,5, 1, 5, 10, 50, 100 y 200 µg extracto ml⁻¹).

Por otro lado, se determinó la citotoxicidad de los extractos enriquecidos en glucosinolatos obtenidos mediante PLE en la línea celular CCD-18Co de fibroblastos de colon. Para ello, se sembraron 2.000 células por pocillo y se incubaron durante 24 h para que las células se adhirieran a la base de los pocillos y comenzaran a proliferar. Trascurrido ese tiempo, se adicionaron diferentes concentraciones del extracto PLE (0,1, 1, 10, 50, 100, 200, 500, 1.000 y 2.000 µg extracto ml⁻¹).

Tanto las células HaCaT (expuestas al extracto SFE) como las CCD-18Co (expuestas al extracto PLE) se mantuvieron durante 12, 24 y 48 h en oscuridad en un incubador a 37°C y 5% CO₂ y transcurrido este tiempo, se reemplazó el medio de cultivo por la solución de MTT (1 mg ml⁻¹) y se llevó a cabo el protocolo de viabilidad celular.

5.3.2 Evaluación del efecto fotoprotector de los extractos procedentes de subproductos de brócoli

Con el fin de evaluar el efecto fotoprotector de los extractos procedentes de los subproductos de brócoli, en primer lugar, se determinó el efecto citotóxico de la luz UV-B sobre la monocapa de queratinocitos. Para ello, las células HaCaT se sembraron en placas de 96 pocillos a razón de 5.000 células por pocillo durante 24 h y seguidamente se reemplazó el medio de cultivo por una fina capa de PBS. A continuación, las células se irradiaron con diferentes dosis de luz UV-B (25, 50, 100, 500 y 1.000 mJ cm⁻²), usando para ello un Crosslinker Bio-Link BLX (Vilber Louvert Biolink. Eberhardzell, Alemania) equipado con una lámpara UV-B con un máximo de emisión a

312 nm, además de un control sin irradiar. El tiempo del tratamiento varió para proporcionar las dosis específicas de luz UV-B. Una vez irradiadas las células, se eliminó el PBS y se añadió medio DMEM completo a los pocillos. A continuación, las células se incubaron durante 24 h más, antes de proceder a determinar la viabilidad celular mediante el ensayo del MTT.

La dosis inhibidora del 50 % del crecimiento celular (IC_{50}) se determinó a partir del porcentaje de viabilidad celular (en comparación con el control) frente a diferentes dosis específicas de luz UV-B.

Una vez determinada la dosis de luz UV-B que redujo la viabilidad celular en más del 50 %, se evaluó el efecto fotoprotector de los extractos enriquecidos en compuestos bioactivos obtenidos mediante SFE a partir de los subproductos de brócoli de la variedad Naxos (SFE-NX). Para ello, se sembraron 5.000 células por pocillo durante 24 h y transcurrido ese tiempo, se adicionaron diferentes concentraciones de extractos (0, 0,1, 1 y 10 $\mu\text{g extracto ml}^{-1}$) utilizando quercetina como control positivo (30 $\mu\text{g ml}^{-1}$). Tras 24 h de incubación en presencia de los extractos, el medio de cultivo se descartó y se reemplazó por una fina capa de PBS y seguidamente las células se irradiaron con luz UV-B (50 MJ cm^{-2}). Tras esto, se sustituyó de nuevo el PBS por medio DMEM completo y se mantuvieron en cultivo 24 h más, transcurrido este tiempo se les determinó la viabilidad con el ensayo de MTT.

5.3.3 *Evaluación del efecto protector de extracto enriquecido en glucosinolatos*

Con la finalidad de evaluar el efecto protector del extracto enriquecido en glucosinolatos obtenido mediante PLE, sobre la línea celular de fibroblastos de colon (CCD-18Co), en primer lugar, las células se expusieron al agente inflamatorio LPS para determinar la dosis y el tiempo de exposición al LPS que afectaba a la viabilidad celular. Para ello, se sembraron 2.000 células por pocillo en placas de 96 pocillos y se incubaron durante 24 h. Tras este tiempo se adicionaron diferentes concentraciones de LPS (1, 2 y 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$), disuelto en PBS estéril, y las células se mantuvieron en cultivo durante 12, 24 y 48 h. Transcurrido el tiempo correspondiente, se determinó la viabilidad celular mediante el ensayo de MTT descrito en el apartado 5.2.

Una vez determinado el efecto del LPS sobre la viabilidad celular, al no causar este compuesto diferencias significativas en la viabilidad de las células, se procedió a comprobar el efecto protector de los extractos SFE-NX frente a la producción de ROS en presencia de LPS. Las células se sembraron a razón de 3.000 células por pocillo en placas de 96 pocillos y tras 24 h de incubación se pretrataron durante otras 24 h, con diferentes concentraciones del extracto

Material y métodos

enriquecido en glucosinolatos obtenido mediante PLE a partir de los subproductos de brócoli de la variedad Naxos (PLE-NX) (1, 10, 50, 200, 500, 1.000 $\mu\text{g extracto ml}^{-1}$). Tras la exposición, se les eliminó el medio con los extractos antes de exponerlas al LPS (2 $\mu\text{g ml}^{-1}$) durante 4 h. Una vez pasado ese tiempo, el medio se sustituyó por una solución de DHCF-DA a 10 μM preparada en medio de cultivo EMEM y se incubaron en oscuridad durante 30 min. Tras la incubación se eliminó la sonda lavando dos veces con tampón PBS y se midió la fluorescencia de las células como se indica posteriormente en el apartado 5.5.

5.4 Ensayo de migración celular

Para comprobar el posible efecto reparador del extracto SFE-NX y PLE-NX sobre la barrera de queratinocitos de piel dañados por heridas, se procedió a realizar un ensayo de migración celular. Para ello, las células HaCaT se sembraron a razón de 50.000 células por pocillo en placas de 24 pocillos, y se mantuvieron en medio DEMEM en un incubador a 37 °C y 5 % de CO₂ hasta que alcanzaron una confluencia del 90 %. Una vez formada la monocapa uniforme de queratinocitos, las células se pretrataron con diferentes concentraciones de extracto SFE-NX (0,1, 1, 10 y 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$) o PLE-NX (1, 10, 100 y 500 $\mu\text{g ml}^{-1}$) y se mantuvieron en las mismas condiciones de incubación durante 24 h. Se usó quercetina (30 $\mu\text{g ml}^{-1}$) como control positivo. Tras este tiempo, se le realizó a cada monocapa de células una herida en línea recta utilizando un agente punzante estéril. Tras la realización de la herida, las células se lavaron con PBS para eliminar las células desprendidas y el medio con los extractos, se volvió a añadir medio DMEM completo y se mantuvieron en incubación durante 48 h. Durante ese tiempo se realizó un seguimiento fotográfico del avance del cierre de la herida a las 0, 6, 24 y 48 h usando un Microscopio Invertido Zeiss Axio Observer 7 (Oberkochen, Alemania) para comprobar la velocidad de migración de las células hasta que la herida quedó completamente cerrada. El área de la herida se determinó trazando una línea a lo largo del borde de la herida con el software ImageJ (Bethesda, MD) y el porcentaje de curación de la herida y la velocidad de cicatrización se determinó usando las siguientes ecuaciones:

$$\text{Curación herida (\%)} = \frac{\text{Área inicial (T0)} - \text{Área final (Tx)}}{\text{Área inicial (T0)}} \times 100$$

$$\text{Velocidad cierre (mm}^2 \text{ h}^{-1}\text{)} = \frac{\text{Área inicial (T0)} - \text{Área final (Tx)}}{\text{Horas (Tx)}}$$

Cada concentración, así como cada ensayo se realizó por duplicado y se tomaron imágenes de dos campos diferentes de cada pocillo.

5.5 Determinación de la producción intracelular de especies reactivas de oxígeno

La producción de ROS intracelular se evaluó utilizando la sonda diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (DCF-DA) (Molecular Probes, Eugene, Oregón, EE. UU.). Esta sonda no presenta fluorescencia por sí misma y es permeable a la membrana celular. Una vez en el interior de la célula, la sonda es des-esterificada y se convierte en 2',7'-diclorofluoresceína, por acción de las ROS, que es altamente fluorescente (Figura 18).

3', 6'-diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína

2',7'-diclorofluoresceína

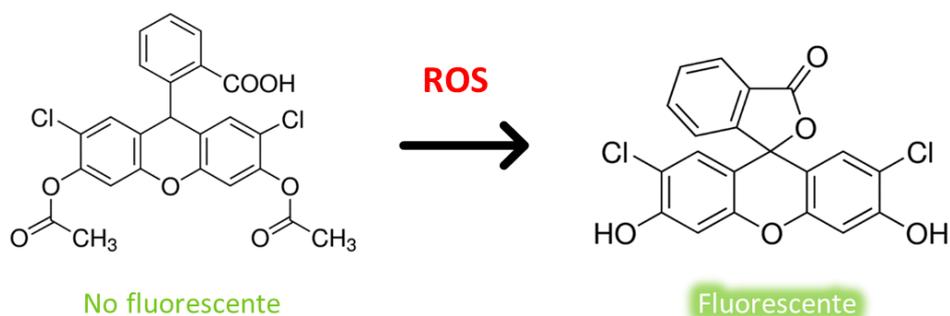


Figura 18. Conversión de la sonda no fluorescente diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína a 2',7'-diclorofluoresceína, que sí presenta fluorescencia, por la acción de las ROS intracelulares.

Las células se sembraron en placas de 96 pocillos (5.000 y 3.000 células por pocillo de las células HaCaT y CCD-18Co, respectivamente) y tras las primeras 24 h de incubación, se expusieron durante otras 24 h a diferentes concentraciones de los extractos SEF-NX (0,1, 0,5, 1, 5, 10 y 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$) y PLE-NX (1, 10, 50, 200, 500 y 1.000 $\mu\text{g ml}^{-1}$) para las células HaCaT y CCD-18Co, respectivamente. Se usó quercetina (30 $\mu\text{g ml}^{-1}$) como control positivo. Tras ese tiempo se les eliminó el medio que contenía los extractos y se sometieron a luz UV-B (50mJ cm^{-2}) en el caso de las células HaCaT, siguiendo la metodología descrita descrito en el apartado 5.3.2 y a la exposición a LPS (2 $\mu\text{g ml}^{-1}$ durante 4 h) para las CCD-18Co según se describe en el apartado 5.3.3. Inmediatamente, tras la exposición a los estreses (luz UV-B y LPS), el medio se sustituyó por una solución de DHCF-DA a 10 μM preparada en el medio correspondiente para cada línea celular (DMEM (HaCaT) y EMEM (CCD-18Co)) y se incubaron durante 30 min en oscuridad. Tras la incubación, la sonda se eliminó lavando dos veces las células con tampón PBS y a continuación, se midió la fluorescencia de las células utilizando un lector de placas Omega Fluostar (BMG Labtech, Ortenberg, Alemania), tomando como longitud de onda de excitación de la sonda 485 nm y 520 nm de emisión. El porcentaje de fluorescencia con respecto al control se determinó siguiendo la siguiente fórmula:

Material y métodos

$$\% \text{ de fluorescencia} = \frac{\text{Fluorescencia extractos}}{\text{Fluorescencia control}} \times 100$$

Las unidades relativas de fluorescencia (RFU) se analizaron con el software MARS y se normalizaron con respecto a la viabilidad de las células en presencia de los extractos/agentes correspondientes.

5.6 Determinación de la expresión de genes relacionados con la inflamación

5.6.1 Aislamiento y purificación de ARN celular

Para la determinación de la expresión relativa de los genes implicados en la respuesta inflamatoria se usaron las líneas celulares HaCaT y CCD-18Co sometidas a los agentes causantes de inflamación, luz UV-B para células de queratinocitos y el LPS para las de colon. Para ello, las células de queratinocitos (HaCaT) y los fibroblastos de colon (CCD-18Co) se sembraron en placas de 6 pocillos a razón de 100.000 y 90.000 células/pocillo, respectivamente, y tras 48 h de incubación se sometieron a un pre-tratamiento de 24 h con diferentes concentraciones de los extractos: 0,1, 1, 10 y 50 μg extracto SFE-NX ml^{-1} para HaCaT y 0,1, 1, 10, 50 y 200 μg extracto PLE-NX ml^{-1} para CCD-18Co. Tras el pre-tratamiento con el extracto SFE-NX, las células HaCaT se irradiaron con luz UV-B (50 mJ cm^{-2}), mientras que las células CCD-18Co se expusieron durante 4 h a 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de LPS. Posteriormente, las células (tanto HaCaT como CCD-18Co) se mantuvieron en incubación en las condiciones anteriormente descritas durante 2, 8, 14 y 24 h. Transcurrido este tiempo, se les retiró el medio de cultivo y las células se lisaron para la obtención del ARN usando para ello el kit de extracción y purificación RNEasy MiniKit (Qiagen, Hilden, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez lisadas las células y extraído el ARN, las muestras se congelaron en N_2 líquido y se almacenaron a -80°C hasta su uso. Además, para la eliminación de posibles restos de ADN genómico que interfirieran en la reacción, las muestras se sometieron a un tratamiento con DNasa, utilizando el kit RNase-Free DNase Set (Qiagen, Hilden, Alemania) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

5.6.2 Cuantificación y comprobación de la pureza del ARN extraído

La cantidad del ARN extraído se determinó usando un espectrofotómetro NanoDrop ND-2000 (Thermo-Fischer Scientific, Wilmington, Delaware, EE. UU.). Posteriormente, una vez conocida la cantidad de ARN, la migración del gel se realizó en agarosa al 1,5% que contenía 3 μl de RedSafe (iNtRON Biotechnology, Corea del Sur) para la visualización de las dos bandas típicas del ARN total, aplicando una corriente de 120 V durante 30 min con una fuente BioRad™, a

temperatura ambiente y tras ese tiempo, las bandas se visualizaron en un transiluminador Syngene (Cambridge, Reino Unido) comprobando así, la calidad del ARN extraído.

5.6.3 Síntesis de ADNc

A partir de 1 µg de ARN extraído y purificado de los dos tipos de células HaCaT y CCD-18Co se llevó a cabo la síntesis del ADNc mediante una reacción de transcripción reversa, usando el kit RevertAid First Strand cDNA Synthesis (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, EE.UU.) que contenía el tampón de reacción (50 mM de Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM de KCl, 4 mM de MgCl₂, 10 mM de DTT), 5 µM de Oligo(dT)₁₈ Primer, 20 U de inhibidor de RNasa, 1 mM de dNTP y 200 U de retrotranscriptasa, siguiendo para ello las instrucciones del fabricante. La reacción se incubó durante 1 hora a 42 °C, terminándose la reacción incubando 5 min a 70 °C en un termociclador Mastercycler gradient de Eppendorf (Eppendorf, Hamburgo, Alemania). Una vez sintetizado el ADNc, las muestras se mantuvieron a -80 °C hasta el momento de su utilización.

5.6.4 Análisis con PCR cuantitativa en tiempo real

El estudio de la expresión diferencial de los genes que codifican para algunos de los factores proinflamatorios que se producen en la respuesta a estreses como la luz UV-B o la presencia de LPS se realizó mediante ensayos de PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR, *QuantStudio™ 5 Flex*, Applied Biosystems) y el colorante SYBR Green. Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 10 µl que contenía 5 µl de 2X Power SYBR Green PCR Master Mix (incluyendo AmpliTaq Gold ADN polimerasa-LD, dNTPs y el colorante SYBR Green), 51 nM de cebadores específicos (Tabla 2) y 33 ng de ADNc en placas de 96 pocillos Fast-PCR (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, EE.UU.). Todas las muestras se analizaron por triplicado. Las condiciones de la amplificación fueron 2 min a 50 °C seguidos de 10 min a 95 °C para la activación de la polimerasa seguidos de 40 ciclos de amplificación compuestos por 15 s a 95 °C para la desnaturalización seguidos de 1 min a 60 °C en donde tuvo lugar la hibridación y extensión de las hebras de ADN.

Las secuencias de los cebadores utilizados para el análisis por qRT-PCR se diseñaron con la herramienta online PrimerQuest™ Tool, excepto en el caso del gen *GAPDH*, cuya secuencia fue descrita por Zhou et al. (2013). La eficiencia de cada par de cebadores se analizó para comprobar la especificidad de cada reacción de amplificación utilizando diluciones seriadas del ADNc. Todos los genes usados mostraron una eficiencia $\geq 0,8$. Los valores de la expresión relativa de los genes analizados se normalizaron con respecto al gen *GAPDH*, (usado como gen de referencia). Los

Material y métodos

niveles de expresión de los genes *IL-1β*, *IL-6*, *IL-8*, *TNF-α* y *COX-2* se determinaron tras 2, 8, 14 y 24 h de exposición a la luz UV-B o LPS en las líneas celulares HaCaT y CCD-18Co, respectivamente, y en presencia o ausencia de un pre-tratamiento con los extractos SFE-NX y PLE-NX.

Tabla 2. Pares de cebadores utilizados para qRT-PCR en cultivos celulares de HaCaT y CCD-18Co. *IL-1β*: Interleucina 1β; *IL-6*: Interleucina 6; *IL-8*: Interleucina 8; *TNF-α*: Factor de necrosis tumoral α; *COX-2*: Ciclooxygenasa 2 y *GAPDH*: Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa.

Gen	Número de acceso (GenBank)	Par de cebadores (5'-sentido-3'/5'-antisentido-3')	Tamaño del amplicón (pb)
<i>IL-1β</i>	NM_000576	GCAACCGCTTCCTATTTAT/ACAGACACTGCTACTTCTTG	90
<i>IL-6</i>	NM_000600	ACCTTCCAAAGATGGCTGAA/TGGCTTGTCCTCACTACTC	146
<i>IL-8</i>	BC013615	GTAAATCTGGCAACCCTAG/GGTAAGATGGTGGCTAATAC	111
<i>TNF-α</i>	NM_000594	CAGGGACCTCTCTAATCA/TGCTACAACATGGGCTACAG	89
<i>COX-2</i>	M90100	TTGACAGTCCACCAACTTAC/GAGGAAGGGCTCTAGTATAA	88
<i>GAPDH</i>	NM_002046	TGTTGCCATCAATGACCCCTT/CTCCACGACGTACTIONCAGCG	202

6. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos obtenidos de los diferentes experimentos se realizó con el software SPSS, versión 22.0 (SPSS Science; Chicago, EE. UU.). Todos los valores mostrados se corresponden con las medias \pm la desviación estándar (DE) de varias réplicas independientes. Los resultados se evaluaron mediante la prueba de varianza (ANOVA) y las diferencias significativas se determinaron mediante la prueba de la t de Student, considerándose las diferencias estadísticamente significativas cuando $p < 0,05$. Los resultados se agruparon según la prueba de Tukey.

Resultados y discusión

Capítulo 1: Optimización de la extracción de compuestos bioactivos a partir de subproductos del brócoli

1. Antecedentes y objetivos

En los últimos años, numerosos estudios han explorado el uso de subproductos vegetales como fuente de compuestos bioactivos valiosos con potencial aplicación para el tratamiento y prevención de enfermedades humanas (Coman et al., 2020). Estos compuestos bioactivos derivan del metabolismo secundario de las plantas y se sintetizan en pequeñas cantidades en comparación con otros metabolitos que las plantas necesitan para mantener su crecimiento y desarrollo. Estos metabolitos secundarios o especializados que son utilizados por las plantas en los mecanismos de defensa contra el estrés ambiental así como para combatir las infecciones por microorganismos, el ataque de otros seres vivos y para hacer frente a otras plantas competidoras, poseen propiedades biológicas que pueden ejercer efectos beneficiosos sobre la salud de los consumidores (Hooper & Cassidy, 2006; Ares et al., 2013). Entre los principales componentes de interés presentes en los subproductos del brócoli se encuentran los glucosinolatos y los compuestos fenólicos (especialmente flavonoides y ácidos hidroxycinámicos), así como los carotenoides, esteroides, vitamina C, fibra y elementos minerales, que resultan esenciales para la salud humana (López-Berenguer et al., 2009; Martínez-Ballesta et al., 2010; Arnáiz et al., 2012).

Hoy en día, el mercado de los productos naturales está creciendo, en parte, por la alta calidad de las formulaciones, que atrae a los consumidores y porque la sociedad es consciente de la importancia del desarrollo sostenible y la protección del medio ambiente. En este contexto, existe un interés creciente por recuperar compuestos bioactivos a partir de subproductos vegetales ecológicos, no solo para reducir el impacto ambiental de los residuos y los costes que conlleva su tratamiento (Hwang & Lim, 2015; Ferreira et al., 2018), sino también para convertirlos en una fuente especialmente valiosa de extractos para su uso en diferentes industrias, debido a la ausencia de plaguicidas y otros productos químicos potencialmente tóxicos (Liu et al., 2018). En este sentido, los subproductos del brócoli pueden constituir una valiosa fuente de compuestos beneficiosos para la salud con posible aplicación en la industria cosmética y nutracéutica debido principalmente al efecto antioxidante que poseen estos fitoquímicos (Barbulova et al., 2015; Selvamuthukumaran & Shi, 2017). Por lo tanto, la demanda de productos naturales ultrapuros y de alto valor está redirigiendo los esfuerzos de las industrias alimentarias hacia el desarrollo de nuevos métodos de extracción verde que preserven la calidad y cantidad de compuestos bioactivos sin generar un impacto ambiental negativo (Wijngaard et al., 2012; Banerjee et al., 2017).

Capítulo I

De esta manera, en los últimos años, cada vez más, la mayoría de los estudios han ido evolucionando hacia la utilización de métodos de extracción más respetuosos con el medio ambiente, por lo que se han ido introduciendo técnicas de extracción nuevas y prometedoras como son la SFE y PLE, las cuales se ha demostrado que superan muchas de las limitaciones de las técnicas de EC, evitando el uso de solventes orgánicos potencialmente tóxicos, obteniendo así ingredientes funcionales y nutraceuticos de diferentes fuentes vegetales (da Silva et al., 2016). Otras ventajas incluyen tiempos de extracción más cortos, mayores rendimientos, el uso de solventes seguros y respetuosos con el medio ambiente y poco o ningún residuo de solvente, lo que hace que estos métodos sean adecuados para el procesamiento de alimentos termolábiles. Además, estas tecnologías de extracción “verdes” no inducen oxidación ni degradación, se reducen los costes de los disolventes y su almacenamiento y se pueden obtener compuestos bioactivos específicos regulando el disolvente, la temperatura y la presión (De Melo et al., 2014). Por tanto, estas tecnologías de extracción se consideran de especial utilidad ya que permiten la obtención de compuestos bioactivos con diferentes características de forma separada a partir de una misma biomasa vegetal.

Con estos antecedentes y para el desarrollo de este capítulo se utilizaron subproductos de brócoli de los cultivares Parthenon (PT) y Naxos (NX) para desarrollar un sistema de producción sostenible de ingredientes bioactivos apostando por la valorización de estos subproductos mediante el empleo de tecnologías limpias, por lo que los objetivos generales que se plantean son los siguientes:

1. establecimiento de las condiciones óptimas de cultivo del brócoli en campo y de los subproductos originados tras la recolección del material cosechado.
2. optimización de las metodologías de extracción de los compuestos bioactivos que ejercen un efecto beneficioso para la salud humana.

2. Preparación y acondicionamiento de los subproductos de brócoli para la extracción de sus compuestos bioactivos

2.1 Recolección de muestras

Los técnicos de la empresa Agrícola Santa Eulalia S.L. en Totana (Murcia, España) cultivaron plantas de brócoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) de los cultivares PT y NX en los terrenos que la empresa posee en la finca El Pastillero de Alhama de Murcia (Tabla 3). Transcurridos 4 meses desde la plantación de cada una de las variedades, se procedió a recolectar el subproducto generado (hojas y tallos), una vez recogidas las pellas destinadas al consumo humano. La Tabla 3 muestra el número de hectáreas cultivadas, así como los kg de producto cosechado destinado a consumo y la cantidad de subproducto generado. Una vez recogidos los subproductos, estos se depositaron en cajas de corcho especialmente diseñadas para el transporte de material destinado a alimentación. Los subproductos empaquetados se enviaron al CTC en camiones refrigerados para mantener las condiciones del producto. Una vez en el CTC, los subproductos se conservaron a 8 °C en cámaras refrigeradas.

Tabla 3. Datos sobre las hectáreas cultivadas, los kilogramos de brócoli cosechados y de los subproductos recogidos.

Cultivar	Finca	Hectáreas cultivadas	Kg cosechados	Kg subproducto recogido
Parthenon	El Pastillero (Alhama de Murcia)	27,5	454.991	672.960
Naxos		30,2	500.654	740.500

2.2 Optimización del proceso de secado de las muestras

La optimización del proceso de deshidratación de los subproductos de brócoli se llevó a cabo con el cultivar PT. Para ello, una vez recolectado el subproducto en la empresa Agrícola Santa Eulalia, este material se transportó en camiones refrigerados hasta el CTC, donde tuvo lugar la optimización del proceso de deshidratación. La finalidad del secado de las muestras fue la obtención de un producto con un bajo contenido en humedad y cuyas condiciones higiénicas fueran las aceptables para su uso como materia prima en los procesos de extracción de diferentes compuestos de interés que finalmente se pretenden usar en aplicaciones alimentarias, nutracéuticas y cosméticas.

Para optimizar el proceso de secado de los subproductos se ensayaron dos protocolos diferentes además de la molienda de los tallos y hojas de brócoli. La diferencia entre los dos protocolos radica en el orden de los procesos llevados a cabo. El primer protocolo de deshidratación consistió en un primer paso de secado de hojas y tallos por separado en una estufa a 70 °C durante 24 h y una vez deshidratado el material vegetal se procedió a su molienda mientras que,

para la segunda prueba de secado en primer lugar, se realizó un triturado de los subproductos de brócoli, en proporción 3:1 (hoja/tallo), seguido de la deshidratación. Los resultados obtenidos tras el proceso de optimización de la deshidratación de los subproductos de brócoli mostraron que, el primer protocolo no resultó idóneo para el secado de los tallos dado el grado de lignificación de estos. Los tallos no pudieron deshidratarse hasta obtener la humedad idónea para el posterior proceso de molienda y alcanzaron como mínimo un 11,45 % de humedad frente al 2,7 % de humedad que se alcanzó tras la deshidratación de las hojas, lo cual dificultó considerablemente el proceso de molienda. A pesar de ello, se consiguió obtener el subproducto seco de hojas y tallos, aunque en este último caso, en mucha menor proporción de la que cabría esperar. Por tanto, con el fin de favorecer el proceso de secado y molienda de los subproductos, se llevó a cabo el segundo proceso de optimización del secado y molienda de los subproductos, para el cual se realizó en primer lugar el triturado conjunto de los subproductos de brócoli PT en fresco en proporción 3:1 (hoja/tallo) (Figura 19A), seguido de la deshidratación en una cámara de secado (Figura 19B).

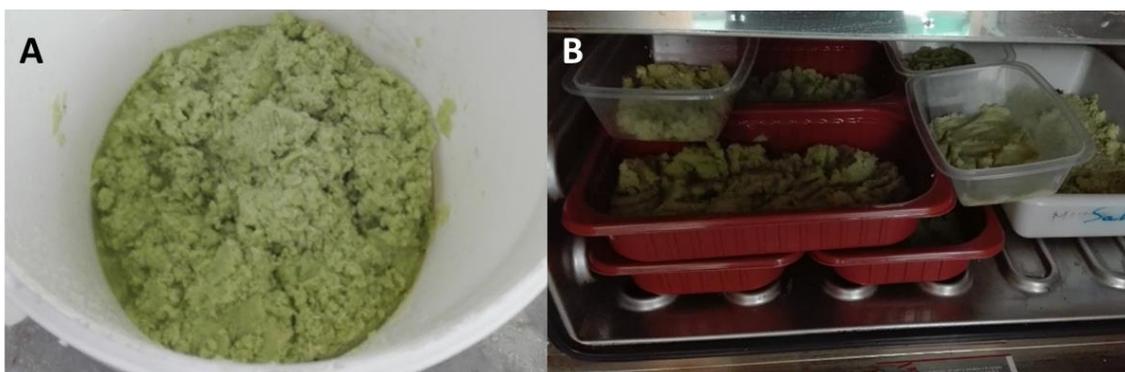


Figura 19. Subproducto de brócoli cultivar Parthenon triturado a 100 µm (A) y secado en cámara (B).

Una vez deshidratada la muestra se procedió a su homogeneización y posterior tamizado para la obtención de fracciones representativas, con un menor tamaño de partícula, con el fin de aumentar la superficie de contacto y con ello la eficacia de los procesos de extracción (Figura 20).



Figura 20. Hojas (A), tallos (B) y mezcla de hoja y tallo (proporción 3:1) de brócoli cultivar Parthenon tras el proceso de secado y triturado de los subproductos.

En la Tabla 4 se muestra los resultados obtenidos del proceso de secado de los subproductos de brócoli. Así, partiendo de 6 kg de PF de subproducto (hoja/tallo 3:1) que contenían una humedad inicial del 90,1 %, se consiguió obtener 300 g de subproducto seco cuyo porcentaje de humedad fue del 4,0 %. Por tanto, tras las pruebas de secado y triturado realizadas al subproducto de brócoli, se definió como procedimiento óptimo, el triturado inicial que se realizó de los tallos y hojas en fresco a un tamaño de 100 μm y su posterior secado a 55 °C durante 24 h para alcanzar una humedad final del 4 %, ya que este proceso favoreció el secado y triturado óptimo de los tallos, por lo que se utilizó este procedimiento para la obtención de subproductos en seco para la realización posterior de los diferentes procedimientos de extracción de compuestos bioactivos.

Tabla 4. Resultados de humedad obtenidos en el proceso de secado de troncos y hojas de brócoli Parthenon.

Parámetro	Valor
Peso inicial (kg)	6
Peso final (g)	300
Porcentaje de humedad (g 100 g⁻¹) materia prima	90,1
Porcentaje de humedad (g 100 g⁻¹) deshidratado	4,0

3. Caracterización del contenido en compuestos bioactivos de los subproductos de brócoli

Con el fin de determinar el contenido en compuestos bioactivos, los subproductos del brócoli se sometieron a diferentes metodologías de extracción: EC, extracción sin el uso de disolventes orgánicos, extracción mediante SFE y PLE.

3.1 Cuantificación de los compuestos obtenidos por extracción convencional

Como punto de partida en las diferentes metodologías para extraer compuestos bioactivos de interés de los subproductos de brócoli para aumentar el rendimiento, la eficiencia y la selectividad de la extracción se procedió en primer lugar a la EC de los compuestos de interés. Para ello, partiendo de diferentes fracciones de subproducto seco de brócoli PT (hoja y tallo), tanto puros como en diferentes proporciones (1:1, 3:1 y 1:3, hoja/tallo), se procedió a la EC de los compuestos bioactivos (Figura 21).

Los resultados obtenidos mostraron que, el mayor contenido total en compuestos de interés se obtuvo en la mezcla hoja/tallo 3:1, ($392,22 \pm 10,51 \text{ mg g}^{-1}$ extracto), siendo esta proporción, además, la más representativa del volumen total de los subproductos generados del cultivo de brócoli. Tras este, las hojas presentaron valores totales de $330,76 \pm 24,41 \text{ mg g}^{-1}$ de extracto,

encontrándose que, los valores más bajos en compuestos bioactivos se obtuvieron en los tallos ($134,75 \pm 8,46 \text{ mg g}^{-1}$ extracto). Los rendimientos de los procesos de extracción (RE) fueron de 2,57, 2,52 y 1,13 %, para las proporciones hoja/tallo 3:1, hoja y tallo, respectivamente. Al mismo tiempo, los compuestos que se encontraron mayoritariamente fueron el β -caroteno, que representó entre el 16 %, en el caso de la fracción de tallo 100 %, y el 65 % en la fracción hoja/tallo 3:1. Los compuestos fenólicos totales supusieron entre el 19 %, en el caso de hoja/tallo 3:1, y el 51 %, en el tallo. Por otra parte, los compuestos que se encontraron en menor proporción fueron los fitoesteroles y el α -tocoferol, que representaron sobre el 10 y el 4 %, respectivamente, de los compuestos totales. Con base a los resultados obtenidos de esta primera caracterización de los compuestos bioactivos de los subproductos de brócoli y con la finalidad de optimizar los procesos de extracción, se seleccionó la mezcla de hojas y tallos en proporción 3:1 como materia prima para los estudios posteriores con el objetivo de obtener los mayores porcentajes de recuperación de los compuestos de interés.

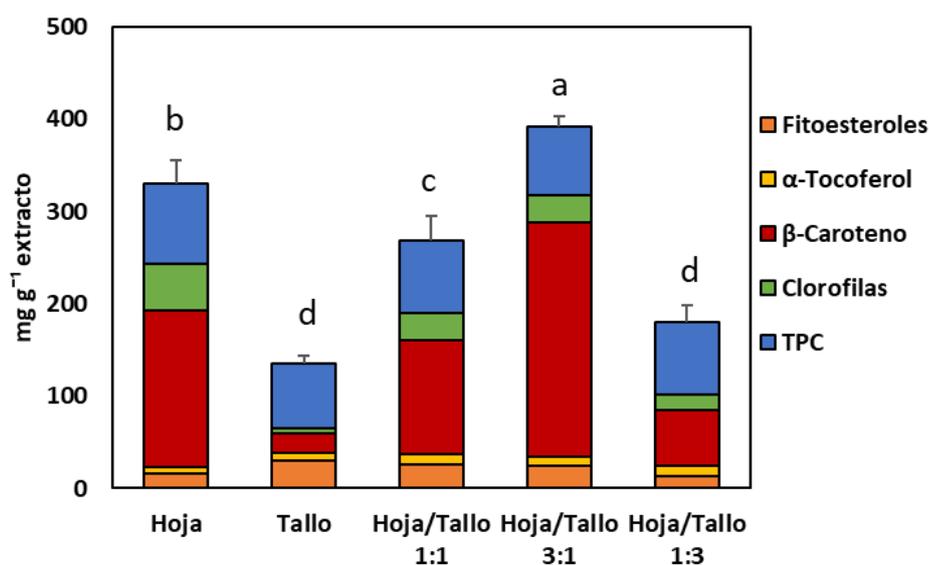


Figura 21. Compuestos bioactivos totales (mg g^{-1} extracto) obtenidos de los subproductos de brócoli cultivar Parthenon (hoja, tallo y la combinación de estos) obtenidos mediante extracción convencional. Los valores corresponden a la media \pm DE de tres réplicas. Diferentes letras indican diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ($p < 0,05$). TPC: contenido total de compuestos fenólicos.

En cuanto al contenido de fitoesteroles, en los subproductos de brócoli se identificaron y cuantificaron tres de estos compuestos: campesterol, β -sitosterol y fucosterol. El fitoesterol mayoritario en todas las proporciones fue el β -sitosterol, que llegó a representar alrededor del 65 % de los fitoesteroles totales encontrados, con valores que oscilaron entre $10,04 \pm 2,51$ y $16,45 \pm 3,62 \text{ mg g}^{-1}$ extracto. Tras este, el campesterol se encontró con valores entre los $3,11 \pm 0,37$ y $5,91 \pm 0,71 \text{ mg g}^{-1}$ extracto, que representó alrededor de un 20 % del total. Por último, el

fucosterol presentó los valores más significativos en la muestra de tallo, donde se encontró el valor más alto de este fitoesterol ($11,88 \pm 1,54 \text{ mg g}^{-1}$ extracto). En la mezcla hoja/tallo 3:1, seleccionada como óptima para el proceso de extracción de compuestos bioactivos, la cuantificación de los fitoesteroles dio como resultado valores de $4,19 \pm 0,21$, $16,45 \pm 3,62$ y $4,39 \pm 0,48 \text{ mg g}^{-1}$ extracto para el campesterol, β -sitosterol y fucosterol, respectivamente. Además, se determinó también el contenido en α -tocoferol de estas mezclas de hoja y tallo, que arrojó resultados que variaron entre los $7,21 \pm 0,22 \text{ mg g}^{-1}$ extracto en la muestra de hoja y los $11,87 \pm 0,36 \text{ mg g}^{-1}$ extracto en el caso de la fracción hoja/tallo 1:1.

Existen numerosos factores importantes que pueden afectar a la eficiencia de la EC ya que además de la composición del solvente, el tiempo de extracción y la proporción de las materias primas, otros factores como el tamaño de las partículas, la forma y porosidad de la propia matriz y la proporción sólido/solvente pueden influir significativamente en el proceso de extracción (Spigno et al., 2007; Sultana et al., 2009; Strati & Oreopoulou, 2014). Así, el ligero, aunque significativo aumento de los compuestos bioactivos totales en la mezcla hoja/tallo 3:1 podría deberse a que no se tuvo en cuenta el tamaño de partícula del material vegetal al realizar la extracción, ya que contenía diferentes tamaños de partícula, especialmente en los tallos. La importancia de obtener una granulometría adecuada en todos los componentes de la matriz vegetal se basa en aumentar la superficie y homogeneizar el material de partida durante el proceso de extracción. En ese sentido, Sun et al. (2011) evaluaron el efecto del tamaño de partícula en el proceso de extracción de *trans*- β -caroteno en cáscaras de cítricos. Sus resultados mostraron que el RE aumentaba a medida que se reducía el tamaño de partícula debido a que las paredes celulares se fraccionaban por lo que se aumentaba la superficie, permitiendo un mayor contacto de la matriz vegetal con el solvente de extracción. Asimismo, la eficiencia de los métodos de EC también puede verse afectada por la permeabilidad de los tejidos a los solventes utilizados. Por ejemplo, en tejidos altamente lignificados como los tallos, se reduce la accesibilidad de los solventes, aumentando la resistencia a la extracción y por ende reduciendo su rendimiento, lo que podría explicar el bajo contenido de compuestos bioactivos por g de extracto obtenido en este tipo de material vegetal (Zhao et al., 2014). Por lo tanto, un aumento en la cantidad de tallos en las mezclas de los subproductos significó una disminución en la recuperación de los compuestos bioactivos totales, hecho que se observa en los resultados de la Figura 21. Teniendo esto en cuenta, cabría esperar que la fracción con más compuestos bioactivos fuera la fracción de hoja, sin embargo, fue interesante comprobar que los mejores resultados en la extracción de los compuestos de interés se obtuvieron en combinación hoja/tallo 3:1. Este comportamiento podría explicarse puesto que la pequeña proporción de

Capítulo I

tallo en combinación con la hoja podría mejorar el aislamiento de los compuestos fitoquímicos y actuar como un dispersante lo que supuso una mejora de la accesibilidad del solvente a los tejidos de la hoja.

Por otro lado, además de estos compuestos de naturaleza lipofílica, también se llevó a cabo la extracción y cuantificación de los glucosinatos (Tabla 5). Como se puede observar en la tabla, el contenido total de glucosinatos resultó ser mayor en la fracción de tallo ($587,89 \pm 35,66 \mu\text{g g}^{-1}$ extracto), disminuyendo la cantidad de estos compuestos conforme disminuía la proporción de tallo en las muestras.

Tabla 5. Glucosinatos ($\mu\text{g g}^{-1}$ extracto) obtenidos de los subproductos de brócoli (hoja, tallo y la combinación de estos) cultivar Parthenon obtenidos mediante extracción convencional. Los valores corresponden a la media \pm DE de tres réplicas. Diferentes letras indican diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ($p < 0,05$).

	Hoja	Tallo	Hoja/Tallo 1:1	Hoja/Tallo 3:1	Hoja/Tallo 1:3
Glucoiberina	$11,94 \pm 0,56$	$24,33 \pm 1,39$	$16,48 \pm 1,02$	$14,87 \pm 0,21$	$15,56 \pm 0,9$
Glucorafanina	$133,44 \pm 8,67$	$472,04 \pm 22,66$	$274,63 \pm 22,52$	$206,17 \pm 4,95$	$359,44 \pm 24,8$
Glucoalisina	$2,66 \pm 0,19$	$4,35 \pm 0,25$	$3,31 \pm 0,14$	$2,37 \pm 0,16$	$4,93 \pm 0,47$
Gluconasturtiina	$2,88 \pm 0,14$	$25,4 \pm 1,3$	$9,98 \pm 0,63$	$5,23 \pm 0,13$	$16,84 \pm 1,35$
4-metoxi-glucobrasicina	$104,21 \pm 7,5$	$0,62 \pm 0,04$	$49,55 \pm 2,23$	$66,57 \pm 1,66$	$25,04 \pm 1,58$
Neoglucobrasicina	$102,82 \pm 4,32$	$54,41 \pm 0,82$	$64,66 \pm 2,97$	$73,45 \pm 1,98$	$56,01 \pm 1,96$
Glucobrasicina	$28,12 \pm 1,07$	$6,75 \pm 0,26$	$17,63 \pm 0,79$	$20,44 \pm 0,84$	$11,76 \pm 0,71$
TOTAL	$386,06 \pm 11,65^a$	$587,89 \pm 35,66^a$	$436,25 \pm 19,98^{bc}$	$389,1 \pm 14,98^a$	$489,58 \pm 26,7^b$

En cuanto al contenido individual de los glucosinatos identificados en los subproductos, en el brócoli, el glucosinolato más abundante es la glucorafanina, que generalmente representa sobre el 50 % del total de glucosinatos (Jeffery et al., 2003). Esto se confirmó en los subproductos, en donde la glucorafanina, precursor del isotiocianato SFN, se encontró también de manera mayoritaria, llegando a representar el 80 % de los glucosinatos totales en el caso de la fracción de tallo. En segundo lugar, encontramos la neoglucobrasicina, cuyo valor más alto ($102,82 \pm 4,32 \mu\text{g g}^{-1}$ extracto) se determinó en la fracción de hoja, siendo en esta misma fracción los glucosinatos obtenidos en menor cantidad la glucoalisina y la gluconasturtina ($2,66 \pm 0,19$ y $2,88 \pm 0,14 \mu\text{g g}^{-1}$ extracto, respectivamente), mientras que en la fracción de tallo fueron la glucoalisina y la 4-metoxiglucobrasicina los glucosinatos obtenidos en menor cantidad ($4,35 \pm 0,25$ y $0,62 \pm 0,04 \mu\text{g g}^{-1}$ extracto, respectivamente). Centrándonos en la fracción hoja/tallo 3:1, los glucosinatos más abundantes fueron la glucorafanina y la neoglucobrasicina ($206,17 \pm 4,95$ y $73,45 \pm 1,98 \mu\text{g g}^{-1}$ extracto, respectivamente) y los encontrados en menor cantidad la glucoalisina y la gluconasturtina ($2,37 \pm 0,16$ y $5,23 \pm 0,13 \mu\text{g g}^{-1}$ extracto, respectivamente).

Además, cabe destacar que, el contenido total de glucosinolatos obtenidos en la fracción hoja/tallo 3:1 se obtuvo en mucha menor proporción que el resto de los compuestos bioactivos analizados representando apenas el 0,10 % del total de compuestos extraídos.

Son diferentes los factores que pueden afectar a la activación de diferentes rutas de síntesis de los glucosinolatos, como el genotipo, el estado de maduración de la planta, las condiciones edafoclimáticas, el procesado de la planta o los órganos de la planta en los que se determinen estos compuestos (Brown et al., 2002). Así, las diferencias observadas en cuanto al perfil de los glucosinolatos obtenidos en las diferentes fracciones de los subproductos se pueden atribuir a la materia prima de partida. En este sentido, existe una clara tendencia en la distribución de estos compuestos entre hoja y tallo, siendo los glucosinolatos resultantes de la ruta indólica (4-metoxiglucobrasicina, neoglucobrasicina y glucobrasicina) los más acumulados en las hojas de brócoli PT y los obtenidos de las rutas alifáticas y aromáticas (glucoiberina, glucorafanina, glucoalisina y gluconasturtina), los acumulados en mayor cantidad en el tallo. Este tipo de diferencias en los patrones de acumulación de glucosinolatos entre diferentes órganos en brócoli también ha sido descrito por otros autores. Así, estudios realizados por Lee et al. (2017) mostraron que variedades de brócoli como la VI-158 exhibió perfiles distintivos de glucosinolatos en tejidos de hojas y raíces, donde los tejidos de las hojas contenían niveles más altos de glucobrasicina y los tejidos de las raíces contenían niveles más altos de gluconasturtina.

Los resultados obtenidos de la actividad antioxidante de las diferentes fracciones de EC-PT se muestran en la Figura 22.

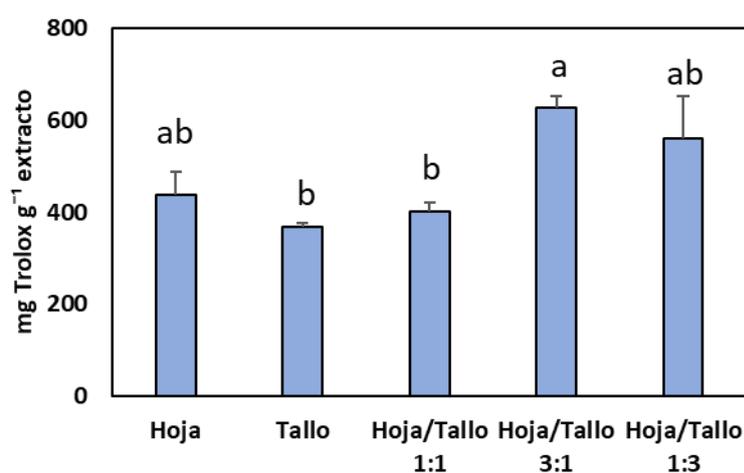


Figura 22. TEAC, (mg Trolox g⁻¹ extracto) obtenida de los subproductos de brócoli cultivar Parthenon (hoja, tallo y la combinación de estos) obtenidos mediante extracción convencional. Los valores corresponden a la media \pm DE de tres réplicas. Diferentes letras indican diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ($p < 0,05$).

Capítulo I

Atendiendo a los resultados, podemos observar que la capacidad antioxidante varió entre las diferentes fracciones, siendo las más bajas las determinadas en las fracciones de tallo y hoja/tallo 1:1 ($368,78 \pm 8,00$ y $399,57 \pm 21,53$ mg Trolox g^{-1} extracto, respectivamente) que resultaron significativamente menores que la encontrada en la fracción hoja/tallo 3:1 ($625,58 \pm 24,49$ mg Trolox g^{-1} extracto).

Una vez seleccionada aquella fracción de subproductos que dio lugar a un mayor contenido en compuestos bioactivos en brócoli PT y que, además, se correlacionó con una mayor capacidad antioxidante (fracción hoja/tallo 3:1), se llevó a cabo el mismo procedimiento de extracción y cuantificación de los compuestos bioactivos para la misma fracción de subproductos en brócoli NX. Como se observa en la Tabla 6, el contenido total de compuestos bioactivos en el extracto procedente de brócoli NX ($149,55 \pm 7,48$ mg g^{-1} extracto) resultó ser del orden de 2,62 veces menor que el contenido total obtenido en brócoli PT ($392,61 \pm 10,51$ mg g^{-1} extracto). Sin embargo, si atendemos al rendimiento del proceso de extracción de compuestos, estos resultaron ser similares, dando lugar a unos rendimientos del 2,57 y 3,43 % en brócoli PT y NX, respectivamente. Además, de los compuestos analizados, el compuesto mayoritario en ambos extractos fue el β -caroteno, que representó el 64,54 y 51,55 % del total de compuestos extraídos en brócoli PT y NX, respectivamente. En cuanto al resto de compuestos, las proporciones se mantuvieron tanto en clorofilas como compuestos fenólicos, pero el contenido de α -tocoferol y fitoesteroles fue del orden de 2,41 y 2,12 veces mayor, respectivamente, en brócoli NX con respecto a PT. De los fitoesteroles identificados, el β -sitosterol fue el mayoritario ($14,28 \pm 1,71$ mg g^{-1} extracto), seguido del campesterol ($3,15 \pm 1,01$ mg g^{-1} extracto) y finalmente, el fucosterol ($2,85 \pm 0,68$ mg g^{-1} extracto), al igual que ocurría en el cultivar PT.

Tabla 6. Contenido en compuestos bioactivos individuales y compuestos bioactivos totales (expresados como mg g^{-1} extracto) en los extractos procedentes de la extracción convencional en la fracción hoja/tallo 3:1, en brócoli Parthenon (EC-PT) y Naxos (EC-NX). Los datos entre paréntesis indican el porcentaje (%) que representa cada compuesto con respecto al total de compuestos bioactivos determinados. Los valores corresponden a la media \pm DE de tres réplicas. RE: rendimiento de la extracción.

	Fitoesteroles	α -Tocoferol	Clorofilas	β -Caroteno	Compuestos fenólicos	Glucosinolatos	Compuestos bioactivos totales	RE (%)
EC-PT	$25,04 \pm 0,7$ (6,38)	$9,45 \pm 0,59$ (2,41)	$30,03 \pm 0,89$ (7,65)	$253,4 \pm 7,3$ (64,54)	$74,31 \pm 1,02$ (18,93)	$0,39 \pm 0,01$ (0,10)	$392,61 \pm 10,51$	2,57
EC-NX	$20,29 \pm 1,01$ (13,56)	$8,70 \pm 0,64$ (5,81)	$14,50 \pm 0,50$ (9,70)	$77,10 \pm 9,94$ (51,55)	$19,96 \pm 4,89$ (13,34)	$9,01 \pm 0,45$ (6,03)	$149,55 \pm 7,48$	3,43

Por otro lado, destacó el incremento significativo ($p < 0,01$) en el contenido en glucosinolatos en brócoli NX (Tabla 7), cuyo porcentaje representó el 6,03 % ($9,01 \pm 0,45$ mg g^{-1} extracto) de los

compuestos bioactivos totales, frente al 0,10 % ($0,39 \pm 0,01 \text{ mg g}^{-1}$ extracto) encontrado en el extracto enriquecido en compuestos bioactivos del cultivar PT.

Tabla 7. Glucosinolatos ($\mu\text{g g}^{-1}$ extracto) obtenidos de los subproductos de brócoli (hoja y tallo en proporción 3:1) de los cultivares Naxos y Parthenon obtenidos mediante extracción convencional. Los valores corresponden a la media \pm DE de tres réplicas.

Glucosinolatos		Naxos	Parthenon
Alifáticos	Glucoiberina	$8,25 \pm 1,27$	$14,87 \pm 0,21$
	Glucorafanina	$4887,88 \pm 961,27$	$206,17 \pm 4,95$
	Glucotalisina	$27,35 \pm 4,72$	$2,37 \pm 0,16$
	Glucoerucina	$919,07 \pm 176,56$	n.d.
	Glucorafenina	$4,24 \pm 1,91$	n.d.
Indólicos	Glucobrasicina	$470,64 \pm 87,63$	$20,44 \pm 0,84$
	Neoglucobrasicina	$2116,38 \pm 370,04$	$73,45 \pm 1,98$
	4-hidroxiglucobrasicina	$82,06 \pm 16,54$	n.d.
	4-metoxiglucobrasicina	$257,62 \pm 38,71$	$66,57 \pm 1,66$
Aromáticos	Glucotropaeolina	$8,25 \pm 1,33$	n.d.
	Gluconasturtina	$233,71 \pm 50,15$	$5,23 \pm 0,13$
TOTAL		$9.015,45 \pm 449$	$389,1 \pm 14,98$

En el caso de los glucosinolatos identificados, comprobamos que, a excepción de la glucoiberina, que fue ligeramente superior en el cultivar PT ($14,87 \pm 0,21 \mu\text{g g}^{-1}$ extracto) frente al cultivar NX ($8,25 \pm 1,27 \mu\text{g g}^{-1}$ extracto), el resto de glucosinolatos identificados mostraron valores remarcablemente mayores en el cultivar NX, obteniéndose además una mayor variabilidad en el número de glucosinolatos identificados, los cuales no se detectaron en ninguna de las fracciones de PT, como son la glucoerucina, la glucorafenina, la 4-hidroxiglucobrasicina y la glucotropaeolina. Estos resultados, junto con el resto de los compuestos bioactivos identificados en el cultivar NX, resultó especialmente interesante, en comparación con el cultivar PT, a la hora de obtener de estos compuestos bioactivos tan característicos de las brásicas.

Finalmente, se comparó la capacidad antioxidante de los extractos obtenidos mediante EC en la fracción hoja/ tallo 3:1 de los cultivares PT y NX mediante el método del ABTS (Tabla 8) dando lugar a valores de $625,58 \pm 24,49$ y $257,55 \pm 1,42 \text{ mg Trolox g}^{-1}$, respectivamente. Esta actividad antioxidante menor se puede relacionar con la cantidad total de compuestos bioactivos, que también es bastante más pequeña en NX.

Tabla 8. Capacidad antioxidante de los extractos (expresada en términos de equivalentes de Trolox (mg Trolox g⁻¹) y compuestos bioactivos totales (mg g⁻¹ extracto) obtenidos de los subproductos de brócoli Parthenon y Naxos (hoja/tallo 3:1) obtenidos mediante extracción convencional. Los valores corresponden a la media ± DE de tres réplicas.

	TEAC	Compuestos bioactivos totales
Parthenon	625,58 ± 24,49	392,61 ± 10,51
Naxos	257,55 ± 1,42	149,55 ± 7,48

3.2 Extracción y cuantificación de los compuestos bioactivos hidrosolubles sin el uso de disolventes orgánicos

Actualmente, se están investigando nuevas tecnologías y métodos de extracción de productos naturales bioactivos que promuevan su calidad y cantidad y se minimicen los problemas ambientales. En este sentido, la extracción de compuestos hidrosolubles sin el uso de disolventes orgánicos, a partir de los subproductos que se generan en la industria del procesado de brócoli en fresco, constituye una alternativa a los procesos de extracción convencionales. Por ello, los subproductos de brócoli PT y NX se sometieron a un proceso de extracción acuosa con el fin de obtener un extracto enriquecido en compuestos hidrosolubles. Las condiciones y el rendimiento del proceso de obtención del extracto seco para cada variedad se describen en la Tabla 9. Como puede observarse, una vez realizado el proceso de extracción sin el uso de disolventes orgánicos y tras la concentración de los extractos, se obtuvieron 7,52 kg de extracto concentrado con 8 °Brix para el cultivar PT (obtenido a partir de 18 Kg de subproducto) y 12 kg de extracto concentrado con 7 °Brix para el brócoli NX (obtenido a partir de 45 Kg de subproducto). Finalmente, el extracto concentrado se atomizó, dando lugar a 212 g y 621 g de extracto seco de brócoli PT y NX con un rendimiento de la extracción del 1,17 y 1,38 %, respectivamente.

Tabla 9. Parámetros del proceso para la obtención de extracto acuoso de los subproductos de brócoli Parthenon y Naxos tras la extracción sin el uso de disolventes orgánicos.

Parámetros	Parthenon	Naxos
Peso de subproducto (kg)	18	45
Líquido sin concentrar (kg)	69	170
Peso concentrado (kg)	7,52	12
Peso atomizado (g)	212	621

3.2.1 *Cuantificación del contenido de compuestos bioactivos en los extractos obtenidos de la extracción sin el uso de disolventes orgánicos*

Una vez obtenido el extracto enriquecido en compuestos hidrosolubles, tras la extracción sin el uso de disolventes orgánicos de los subproductos de brócoli PT y NX, se llevó a cabo la determinación del contenido en compuestos bioactivos. Como era de esperar, dada la finalidad de la extracción, los compuestos mayoritarios presentes en los extractos fueron los compuestos fenólicos. Así, el mayor contenido de fenoles se encontró en el extracto procedente de brócoli del cultivar PT ($17.630,47 \pm 539,34 \mu\text{g GAE g}^{-1}$ extracto) siendo éstos del orden de 4 veces superior al contenido en brócoli NX ($4.503,80 \pm 101,33 \mu\text{g GAE g}^{-1}$ extracto). En cuanto al contenido en β -caroteno, los valores obtenidos en ambos cultivares fueron similares, aunque algo mayores en NX ($193,66 \pm 9,68 \mu\text{g g}^{-1}$ extracto y $216,39 \pm 7,93 \mu\text{g g}^{-1}$ extracto, en PT y NX, respectivamente). Lo contrario ocurrió con respecto a las clorofilas, cuyos valores fueron algo más altos en PT ($47,58 \pm 2,85 \mu\text{g g}^{-1}$ extracto) que en NX ($40,73 \pm 2,18 \mu\text{g g}^{-1}$ extracto), aunque los contenidos fueron del mismo orden de magnitud.

Además de estos compuestos mayoritarios, también se cuantificaron otros compuestos bioactivos como fitoesteroles y α -tocoferol, que se detectaron en menor proporción. En el caso de los fitoesteroles, el compuesto mayoritario fue el β -sitosterol, presente tanto en los extractos de brócoli PT como de NX, cuyos valores fueron $32,3 \pm 2,26$ y $31,46 \pm 3,78 \mu\text{g g}^{-1}$ extracto, respectivamente, mientras que el campesterol solo fue identificado en el cultivar NX ($8,28 \pm 0,66 \mu\text{g g}^{-1}$ extracto). También se identificó en los extractos de brócoli NX pequeñas cantidades de α -tocoferol ($17,73 \pm 1,42 \mu\text{g g}^{-1}$ extracto). Los resultados obtenidos en la cuantificación de estos compuestos resultaron ser bajos debido a la naturaleza apolar de estos compuestos bioactivos (Sabater-Jara & Pedreño, 2013) y a que el procedimiento de extracción no implicaba el uso de disolventes orgánicos, lo que dificultó enormemente su extracción.

Por otra parte, los glucosinolatos encontrados en los extractos hidrosolubles de los subproductos de brócoli PT y NX, se muestran en la Tabla 10. Los resultados obtenidos mostraron que la mayor concentración en glucosinolatos totales se obtuvo en el extracto de brócoli PT ($138,82 \pm 7,73 \mu\text{g g}^{-1}$ extracto) siendo el contenido en glucosinolatos en el cultivar NX en torno a 4,5 veces inferior ($31,17 \pm 0,73 \mu\text{g g}^{-1}$ extracto). En cuanto a los glucosinolatos identificados solo se identificó la neoglucobrasicina en ambos cultivares, representando el 62 y el 55 % del total de glucosinolatos identificados en brócoli PT y NX, respectivamente. Además de este, también se identificó la glucobrasicina en brócoli PT ($52,69 \pm 2,21 \mu\text{g g}^{-1}$ extracto) y la glucorafanina, único glucosinolato alifático, en brócoli NX ($14,03 \pm 0,49 \mu\text{g g}^{-1}$ extracto). En

general, el escaso contenido en glucosinolatos de estos extractos podría deberse a la falta de un disolvente orgánico en el proceso de extracción, que mejoraría la recuperación de estos compuestos (Deng et al., 2015). Este hecho resultaría en una falta de afinidad de los glucosinolatos presentes en los subproductos del brócoli por el agua usada en la extracción, lo que se traduce en unos rendimientos de obtención de estos compuestos muy bajos.

Tabla 10. Contenido en compuestos bioactivos ($\mu\text{g g}^{-1}$ extracto) en el extracto procedente de la extracción sin el uso de disolventes orgánicos de los subproductos de brócoli Parthenon y Naxos (hoja/tallo 3:1). Los valores corresponden a la media \pm DE de tres réplicas. n.d: no detectado.

	Parthenon	Naxos
Compuestos fenólicos	17.630,47 \pm 539,34	4.503,80 \pm 101,33
Clorofilas	47,58 \pm 2,85	40,73 \pm 2,18
β-Caroteno	193,66 \pm 9,68	216,39 \pm 7,93
α-Tocoferol	n.d.	17,73 \pm 1,42
Fitoesteroles	32,33 \pm 2,26	39,74 \pm 5,28
β-Sitosterol	32,33 \pm 2,26	31,46 \pm 3,78
Campesterol	n.d.	8,28 \pm 0,66
Glucosinolatos	138,82 \pm 7,73	31,17 \pm 0,73
Glucobrasicina	52,69 \pm 2,21	n.d.
Neoglucobrasicina	86,14 \pm 7,24	17,14 \pm 0,70
Glucorafanina	n.d.	14,03 \pm 0,49
Total ($\mu\text{g g}^{-1}$ extracto)	18.042,86 \pm 561,87	5.052,01 \pm 118,03

Por otro lado, dada la naturaleza hidrosoluble de los extractos obtenidos, se procedió a determinar la composición nutricional de estos (Tabla 11). Como se observa en la Tabla 11, la composición nutricional de los extractos obtenidos a partir de los subproductos de brócoli PT y NX fue muy similar. Sin embargo, se observó un elevado contenido en vitamina C que, además de los beneficios para la salud que supone la ingesta diaria de esta vitamina, es un apreciado ingrediente por su poder antioxidante en la elaboración y conservación de alimentos (Varvara et al., 2016).

Así, el brócoli PT mostró los valores más elevados de vitamina C ($2.946 \mu\text{g g}^{-1}$) siendo ésta del orden de 1,5 veces superior al contenido en vitamina C en el cultivar NX. Este elevado contenido en vitamina C, junto con el elevado contenido en compuestos fenólicos de los extractos, se correlacionó con una elevada actividad antioxidante, expresada como equivalentes de Trolox en brócoli PT ($151,96 \pm 12,68 \text{ mg Trolox g}^{-1}$ extracto) frente a los $63,11 \pm 0,10 \text{ mg Trolox g}^{-1}$ extracto, en brócoli NX cuyo contenido en vitamina C y compuestos fenolicos fue significativamente menor. Finalmente, en cuanto al rendimiento de esta extracción acuosa, los valores obtenidos resultaron ser muy bajos (1,18 % en el caso de PT y del 1,38 % para NX) en comparación con los datos obtenidos en la EC para ambos cultivares, 2,57 y 3,43 %, respectivamente, resultados esperables puesto que la EC se trata de un método extractivo más dirigido y específico para una

mayor cantidad de de compuestos bioactivos de los que se obtienen mediante la extracción acuosa.

Tabla 11. Composición nutricional de los extractos enriquecidos en compuestos bioactivos hidrosolubles obtenidos a partir de los subproductos de brócoli Parthenon y Naxos.

Composición (g 100 g ⁻¹)	Parthenon	Naxos
Ácidos grasos saturados	< 0,1	<0,1
Azúcares totales	38,2	38,4
Fibra alimentaria	8,9	8,2
Cenizas totales	25,0	22,7
Cloruro sódico	7,49	0,96
Grasa	0,6	0,4
Hidratos de carbono	62,1	58,7
Humedad	1,0	6,7
Proteínas	11,3	11,5
Vitamina C (µg g ⁻¹)	2.946	1.917
Valor energético (kcal/kj)	281/1190	268/1134
Capacidad antioxidante (mg Trolox g ⁻¹ extracto)	151,96 ± 12,68	63,11 ± 0,10

3.3 Cuantificación de los compuestos obtenidos por extracción mediante fluidos supercríticos

3.3.1 Establecimiento de las condiciones para SFE

Para el establecimiento de las condiciones óptimas para la extracción mediante SFE, se desarrolló un diseño experimental basado en el método de superficie de respuesta (RSM). Este método permite resumir el comportamiento de la variable respuesta bajo las condiciones experimentales que se quieran proponer. Para llevar a cabo esta optimización, se consideró el β-caroteno como el compuesto bioactivo más representativo de los subproductos, por lo que la optimización del proceso se llevó a cabo en base a este analito. Para ello, en primer lugar, se establecieron las variables independientes de acuerdo con los factores que afectan a la recuperación de los compuestos bioactivos, en este caso: temperatura, presión, porcentaje de co-solvente (etanol), flujo o caudal y tiempo. El efecto de estos factores en la SFE para la extracción de β-caroteno se evaluó de acuerdo con un diseño central compuesto (CCD) 2⁵ con dos puntos centrales y tres niveles (-1, 0 y 1) para cada variable independiente: (a) temperatura, 40, 60 y 80 °C; (b) presión, 150, 300 y 450 bares; (c) porcentaje de co-solvente, 7, 18,5 y 32 %; (d) caudal, 28, 30 y 32 g min⁻¹; y (e) tiempo, 40, 60 y 80 min. En total, se llevaron a cabo 26 experimentos en orden aleatorio como se muestra en la Tabla 12. Los experimentos se llevaron a cabo por duplicado para asegurar una mayor reproducibilidad.

Tabla 12. Valores de los factores independientes usados para el diseño compuesto central y los valores de respuesta. Los datos se expresan como la media \pm DE de dos réplicas.

Condición	Temperatura (°C)	Presión (bar)	Etanol (%)	Flujo (g min ⁻¹)	Tiempo (min)	Respuesta (mg β -caroteno g ⁻¹ extracto)
SFE-1	40	450	30	28	80	45,17 \pm 1,23
SFE-2	60	150	18,5	30	60	48,53 \pm 0,55
SFE-3	40	450	7	32	80	96,34 \pm 3,26
SFE-4	60	300	18,5	30	40	41,22 \pm 3,32
SFE-5	60	300	18,5	30	60	50,04 \pm 3,45
SFE-6	60	300	18,5	30	80	75,08 \pm 4,17
SFE-7	60	300	7	30	60	34,94 \pm 0,19
SFE-8	40	450	30	32	40	66,51 \pm 3,18
SFE-9	80	150	7	32	80	57,67 \pm 1,48
SFE-10	40	150	30	28	40	11,51 \pm 1,1
SFE-11	80	450	30	28	40	40,72 \pm 0,63
SFE-12	60	300	18,5	28	60	29,42 \pm 2,08
SFE-13	40	450	7	28	40	28,76 \pm 0,27
SFE-14	40	150	30	32	80	53,55 \pm 2,44
SFE-15	80	150	30	32	40	50,16 \pm 0,38
SFE-16	80	450	30	32	80	28,41 \pm 0,99
SFE-17	40	150	7	32	40	25,83 \pm 0,58
SFE-18	80	450	7	32	40	38,88 \pm 1,64
SFE-19	60	300	30	30	60	45,19 \pm 0,6
SFE-20	80	150	30	28	80	30,95 \pm 0,08
SFE-21	80	450	7	28	80	24,81 \pm 0,77
SFE-22	40	300	18,5	30	60	65,54 \pm 1,31
SFE-23	40	150	7	28	80	49,52 \pm 1,4
SFE-24	80	300	18,5	30	60	31,26 \pm 2
SFE-25	60	300	18,5	32	60	30,52 \pm 2,44
SFE-26	60	300	18,5	30	60	46,76 \pm 1,56

3.3.2 Optimización del proceso de SFE

Para el procesamiento de los resultados obtenidos de las diferentes muestras de SFE se utilizó el software Statgraphics Centurion XVI proporcionado por Statpoint Technologies (Warrenton, VA, EE. UU.). Los resultados de las pruebas ANOVA indicaron si el factor propuesto presentaba un efecto significativo ($p < 0,05$) o no significativo ($p > 0,05$) (Liyana-Pathirana & Shahidi, 2005).

En la Tabla 13 se muestran los parámetros usados para el ajuste del modelo CCD 2⁵ propuesto, así como la significación estadística de los efectos de las variables independientes. Para que la

interpretación del modelo sea más simple, solamente se han incluido los efectos individuales y los efectos cuadráticos y de interacción entre variables con impacto significativo. Como se observa en la Tabla 13, el modelo presentó un grado de correlación alto ($R^2 = 0,935$) y la varianza dentro de los datos fue explicada por el resultado, ya que este valor evalúa la capacidad del modelo para predecir el comportamiento de la variable respuesta. Asimismo, la falta de ajuste no fue significativa ($p > 0,1$), lo que confirmó la calidad de ajuste del modelo. Así, el modelo propuesto proporcionó una buena aproximación a las condiciones experimentales (Figura 23), lo que se confirmó en los resultados obtenidos por el análisis de varianza ANOVA (Tabla 13).

Tabla 13. Análisis de varianza (ANOVA) y parámetros de ajuste del modelo CCD 2⁵ propuesto. *Coeficientes significativos ($p < 0,05$ o $p < 0,10$). SS = suma de cuadrados; Df = grados de libertad; MS = media cuadrada; R^2 = Coeficiente de correlación cuadrática.

Fuente	Y = Contenido en β -caroteno				
	SS	Df	MS	F-Ratio	p-Value
X ₁ : Temperatura	1064,38	1	1064,38	197,87	0,0452*
X ₂ : Presión	490,67	1	490,67	91,22	0,0664
X ₃ : Etanol	20,8	1	20,8	3,87	0,2995
X ₄ : Flujo	1870,99	1	1870,99	347,82	0,0341*
X ₅ : Tiempo	1346,36	1	1346,36	250,29	0,0402*
X ₃ X ₅	1282,13	1	1282,13	238,35	0,0412*
X ₄ X ₄	604,38	1	604,38	112,35	0,0479*
Falta de ajuste	3262,24	4	191,9	35,67	0,1296
Pure error	5,38	1	5,38		
Total (corr.)	8172,58	25			
R ²	0,935				

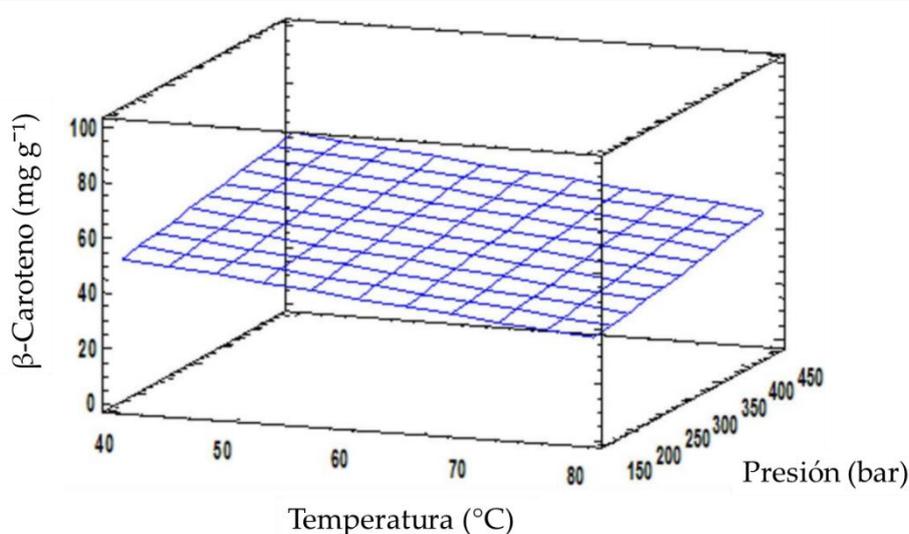


Figura 23. Gráfico en 3D de superficie de respuesta pronosticado de los efectos de la temperatura y la presión sobre el contenido en β -caroteno.

Capítulo I

Una vez que el modelo se verificó como válido, su optimización permitió aumentar hasta el máximo la respuesta evaluada, es decir, el contenido en β -caroteno. Para llevar a cabo la optimización se analizaron los valores de p (p -value) de los efectos lineales, cuadráticos y de interacción entre las variables independientes. Tanto la temperatura, como el flujo y el tiempo de extracción presentaron efectos significativos, siendo sus valores de p de 0,0452, 0,0341 y 0,0402, respectivamente (p -value < 0,05). Por otra parte, la presión no mostró un nivel de significación superior al 90%, siendo su valor de p de 0,0664. Los parámetros con resultados estadísticamente significativos (temperatura, flujo y tiempo de extracción) demostraron tener un efecto individual sobre la cantidad de β -caroteno. Curiosamente, aunque el porcentaje de etanol usado en la extracción por sí solo no demostró afectar significativamente al valor de la variable respuesta (β -caroteno), cuando se estudió su efecto en conjunto con el tiempo de extracción sí que resultó en un impacto significativo en el contenido de β -caroteno. El efecto cuadrático del flujo también fue significativo (valor $p = 0,0479$). Finalmente, tras el análisis del modelo CCD 2⁵, se utilizó un modelo polinomial cuadrático (Ecuación 1) para llevar a cabo los ajustes de los datos experimentales:

$$Y = \alpha_0 + \sum_{i=1}^k \alpha_i X_i + \sum_{i=1}^k \alpha_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^k \sum_{j=i+1}^k \alpha_{ij} X_i X_j \quad (1)$$

En donde:

Y : contenido de β -caroteno; α_0 : coeficiente constante, que fijó la respuesta en el punto central del diseño; α_i , α_{ii} y α_{ij} : coeficientes de regresión de los efectos lineales, cuadrático y de interacción, respectivamente; X_i y X_j : valores de las variables independientes. Tras el ajuste de los datos experimentales para obtener un modelo reducido y mantener solo los parámetros significativos en el modelo cuadrático, la ecuación modelo final fue la siguiente (Ecuación 2):

$$Y = -2478,19 - 0,407818X_1 + 0,0376639X_2 + 2,55145X_3 + 159,064X_4 + 1,20856X_5 - 0,0408957X_3X_5 - 2,56244X_4X_5 \quad (2)$$

De este modo, usando esta ecuación para explicar el modelo, se propusieron las condiciones óptimas para la máxima recuperación de β -caroteno. Los valores óptimos predichos por el modelo se muestran en la Tabla 14.

Tabla 14. Valores de los parámetros óptimos de la extracción mediante fluidos supercríticos.

	Temperatura (°C)	Presión (bar)	Tiempo (min)	Flujo (g min ⁻¹)	Etanol (%)
Óptimo	40	443	68	31	7

Una vez determinadas las condiciones óptimas propuestas por el modelo, estas se aplicaron en la recuperación de β -caroteno para confirmar los resultados teóricos. Así, bajo estas condiciones óptimas de extracción (Tabla 14), el contenido en β -caroteno del extracto SFE fue de $84,11 \pm 1,51$ mg β -caroteno g⁻¹ extracto. Con respecto a la temperatura, Baysal et al. (2000) llevaron a cabo un estudio sobre como afectaba la temperatura y como optimizar este parámetro en la extracción de carotenoides a partir de residuos de tomate. Los resultados de este estudio mostraron que el uso de temperaturas altas, por encima de 65 °C, produjeron rendimientos de extracción más altos pero que, por el riesgo de que los carotenoides pudieran degradarse a esas temperaturas, se recomendaba el uso de otras más bajas. Por otra parte, Alzate et al. (2013) propusieron la reducción de la temperatura, por debajo de los 40 °C, para evitar, precisamente, esta degradación por la temperatura, lo que concordó con nuestros resultados (Tabla 14). Con respecto a la presión, el rango usado en este estudio para los subproductos de brócoli se encuentra en los mismos valores que los descritos por Vega et al. (1996) para la extracción de carotenoides a partir de zanahorias. Según sus resultados, la aplicación de presiones alrededor de los 400 bares, a 40 °C y usando un 5 % de etanol como cosolvente, incrementó el rendimiento en la extracción de β -caroteno.

Por estos motivos podemos afirmar que los parámetros obtenidos para la SFE basados en la RSM se encuentran dentro de los rangos óptimos que otros autores han determinado para la extracción de β -caroteno. Es más, al comparar el valor predicho por nuestro modelo para el β -caroteno en base a la ecuación obtenida (Ecuación 2), con los valores experimentales al aplicar las condiciones óptimas (Tabla 15), se observó que a excepción de la muestra SFE-10, la varianza de los datos fue aceptable, encontrándose todos en el rango de CV (%) de 0,4 a 20. De hecho, el coeficiente de varianza entre los datos teóricos y los obtenidos experimentalmente fue muy baja (CV = 0,4 %), lo cual indica una buena reproducibilidad del sistema investigado (Liyana-Pathirana & Shahidi, 2005).

Tabla 15. Comparación entre los resultados experimentales y los predichos por el modelo generado para la cantidad de β -caroteno (mg g^{-1} extracto) de la extracción mediante fluidos supercríticos. CV = coeficiente de varianza.

β -caroteno (mg g^{-1} extracto)							
Nombre	Teórico	Experimental	CV (%)	Nombre	Teórico	Experimental	CV (%)
SFE-1	43	45,17 \pm 1,23	1,8	SFE-14	53	53,55 \pm 2,44	0,4
SFE-2	44	48,53 \pm 0,55	3,7	SFE-15	38	50,16 \pm 0,38	10
SFE-3	81	96,34 \pm 3,26	6,2	SFE-16	48	28,41 \pm 0,99	18
SFE-4	40	41,22 \pm 3,32	0,8	SFE-17	33	25,83 \pm 0,58	8
SFE-5	94	50,04 \pm 3,45	0,5	SFE-18	28	38,88 \pm 1,64	12
SFE-6	58	75,08 \pm 4,17	8,8	SFE-19	50	45,19 \pm 0,6	4
SFE-7	48	34,94 \pm 0,19	11	SFE-20	16	30,95 \pm 0,08	20
SFE-8	65	66,51 \pm 3,18	0,6	SFE-21	43	24,81 \pm 0,77	19
SFE-9	53,4	57,67 \pm 1,48	1,5	SFE-22	57	65,54 \pm 1,31	4,7
SFE-10	32,3	11,51 \pm 1,1	33	SFE-23	48	49,52 \pm 1,4	1
SFE-11	28	40,72 \pm 0,63	13	SFE-24	41	31,26 \pm 2	10
SFE-12	28,4	29,42 \pm 2,08	1,2	SFE-25	49	30,52 \pm 2,44	7
SFE-13	23	28,76 \pm 0,27	8,5	SFE-26	49	46,76 \pm 1,56	1,8
Condiciones óptimas					83,12	84,11	0,4

3.3.2.1 Cuantificación de los compuestos bioactivos en las condiciones óptimas de SFE

Una vez determinadas las condiciones óptimas para la extracción de β -caroteno en los subproductos de brócoli PT (fracción hoja/tallo, 3:1), se realizó la SFE de los compuestos bioactivos en los subproductos de brócoli PT y NX en esas condiciones óptimas, y además de β -caroteno se identificaron otros compuestos bioactivos en los extractos mediante HPLC-DAD (Figura 24) y GC-MS (Figura 25).

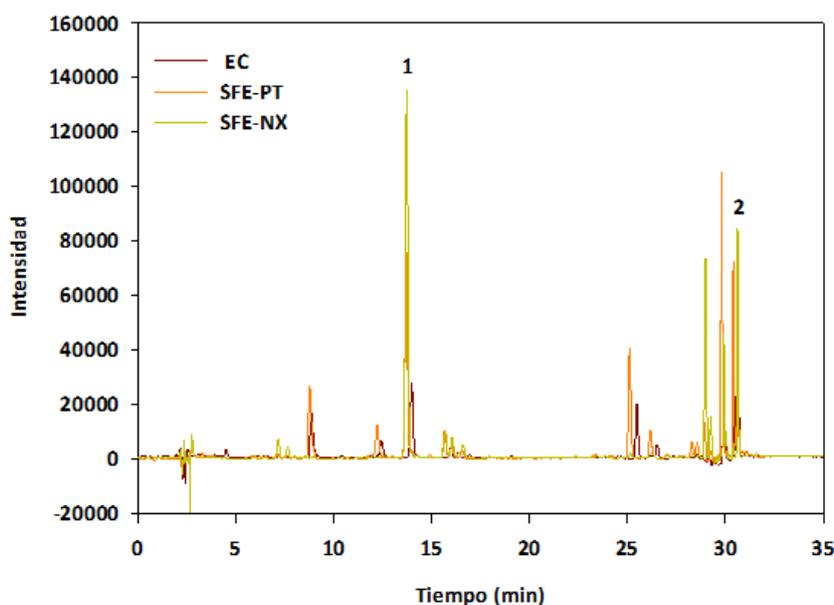
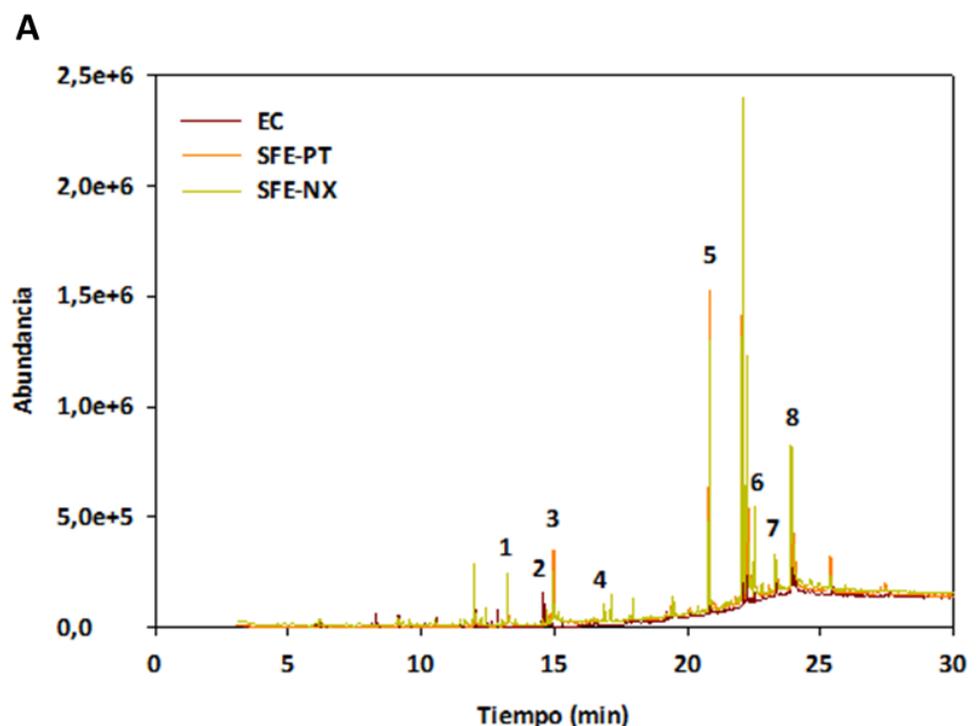


Figura 24. Perfil cromatográfico de los compuestos bioactivos adquirido a 454 nm (por HPLC-DAD) obtenidos mediante la extracción con fluidos supercríticos (SFE) y la extracción convencional (EC) de subproductos de brócoli de la variedad Parthenon (PT) y Naxos (NX). 1: Luteína; 2: β -caroteno

**B**

Pico nº	RT (min)	Compuesto	Área (%)			
			SFE-PT	SFE-NX	EC-PT	EC-NX
1	13,24	Ácido n-hexadecanoico	3,49	2,43	2,41	0,94
2	14,72	Fitol	0,93	1,03	0,99	5,41
3	14,96	Ácido (9 Z, 12 Z, 15 Z) - Octadeca-9,12,15-trienoico*	4,98	3,17	5,16	5,12
4	16,89	(Z)-9-Octadecenamida	0,53	0,74	n.d.	n.d.
5	20,83	Nonacosano	15,88	11,42	5,34	7,58
6	22,52	dl- α -tocoferol*	5,66	5,27	1,85	3,95
7	23,29	Campesterol*	3,17	4,97	6,05	4,45
8	23,9	β -sitosterol*	13,64	18,49	22,75	13,85

Figura 25. (A) Total Ion Chromatogram (TIC) de los extractos optimizados de la extracción mediante fluidos supercríticos (SFE) y la extracción convencional (EC) de los subproductos de brócoli Parthenon (PT) y Naxos (NX). (B) Compuestos identificados en los extractos obtenidos de los subproductos de brócoli mediante GC-MS. * Indica los compuestos cuantificados; RT: tiempo de retención; n.d.: no detectado.

En cuanto al contenido total de compuestos presentes en los extractos SFE (Tabla 16), los compuestos bioactivos totales de los extractos de SFE-NX se encontraron por encima de los obtenidos para SFE-PT (hasta 1,47 veces su valor). Además, se encontraron diferencias en la proporción de dichos compuestos dependiendo del cultivar. De esta forma, se observó que la cantidad de β -caroteno fue mayor en los extractos de SFE-NX, llegando a representar hasta un 62,47 % del total de compuestos bioactivos, frente al 52,03 % que representa este mismo compuesto en los extractos de SFE-PT (Tabla 16).

Tabla 16. Compuestos bioactivos mayoritarios (mg g^{-1} extracto), compuestos bioactivos totales y rendimiento de la extracción (RE) obtenidos en la extracción convencional de los cultivares Parthenon (EC-PT) y Naxos (EC-NX) y las extracciones optimizadas mediante fluidos supercríticos de ambas variedades (SFE-PT y SFE-NX, Parthenon y Naxos, respectivamente). Los datos entre paréntesis indican el porcentaje (%) que representa cada compuesto con respecto al total de compuestos bioactivos determinados. Los valores corresponden a la media \pm DE de tres réplicas.

	Fitoesteroles	α -Tocoferol	Clorofilas	β -Caroteno	Compuestos fenólicos	Compuestos bioactivos totales	TEAC	RE(%)
EC-PT	25,04 \pm 0,7 (6,38)	9,45 \pm 0,59 (2,41)	30,03 \pm 0,89 (7,66)	253,4 \pm 7,3 (64,61)	74,31 \pm 1,02 (18,94)	392,22 \pm 10,51	625,58 \pm 24,49	2,57
EC-NX	20,29 \pm 1,01 (14,43)	8,70 \pm 0,64 (6,19)	14,50 \pm 0,50 (10,32)	77,10 \pm 9,94 (54,86)	19,96 \pm 4,89 (14,20)	140,53 \pm 7,48	257,55 \pm 1,42	3,43
SFE-PT	19,71 \pm 2,39 (12,19)	5,69 \pm 0,13 (3,52)	32,64 \pm 1,72 (20,19)	84,11 \pm 1,51 (52,03)	19,51 \pm 0,6 (12,07)	161,66 \pm 6,35	262,68 \pm 33,09	2,61
SFE-NX	12,68 \pm 1,43 (5,34)	5,67 \pm 0,19 (2,39)	40,89 \pm 2,19 (17,22)	148,93 \pm 8,56 (62,74)	29,21 \pm 5,04 (12,31)	237,38 \pm 17,42	338,69 \pm 31,95	2,73

En el caso de los fitoesteroles, la proporción encontrada en SFE-PT fue 2,28 veces mayor que la obtenida en SFE-NX. Este aumento también se encontró en el contenido de clorofilas con niveles 1,17 veces mayores también en SFE-PT con respecto al cultivar NX (Tabla 16). Por otro lado, como se observa en la Figura 24, el análisis mediante HPLC-DAD reveló también la presencia de la xantofila luteína que, junto con el β -caroteno, han sido previamente descritos como los principales carotenoides presentes en las especies de *Brassica* (Podsdek, 2007; Singh et al., 2007). En cuanto a los fitoesteroles identificados mediante GC-MS (Figura 25) se encontraron el campesterol ($3,95 \pm 0,33$ y $2,66 \pm 0,26 \text{ mg g}^{-1}$ extracto) y β -sitosterol ($15,77 \pm 0,90$ y $10,85 \pm 0,80 \text{ mg g}^{-1}$ extracto) así como el α -tocoferol ($5,69 \pm 0,50$ y $5,67 \pm 0,43 \text{ mg g}^{-1}$ extracto) tanto en el extracto SFE-PT como en SFE-NX, respectivamente. También se detectaron otros compuestos minoritarios como el fitol y ácidos grasos como el ácido linoleico ($4,14 \pm 0,19$ y $1,55 \pm 0,09 \text{ mg g}^{-1}$ extracto) y el ácido linolénico ($32,42 \pm 3,18$ y $19,54 \pm 1,19 \text{ mg g}^{-1}$ extracto) para SFE-PT y SFE-NX, respectivamente.

Llegados aquí, debemos señalar que la cantidad de compuestos bioactivos totales del brócoli PT obtenidos por SFE fue menor ($161,66 \pm 6,35 \text{ mg g}^{-1}$ extracto) que la que se obtuvo mediante EC ($392,22 \pm 10,51 \text{ mg g}^{-1}$ extracto). Sin embargo, en cuanto al rendimiento de las extracciones, se obtuvieron resultados similares, obteniéndose valores de 2,61 y 2,57%, para SFE y EC de brócoli PT, respectivamente (Tabla 16). Resultados similares se obtuvieron en brócoli NX, en el cual el rendimiento de la SFE (SFE-NX) fue similar al obtenido en la EC (EC-NX), alcanzando valores de 2,73 y 3,43 %, respectivamente. Por otra parte, a pesar de no obtenerse un mayor rendimiento

tras la SFE, podemos determinar que la EC cuenta con muchos más inconvenientes que la SFE. Entre estos inconvenientes podemos destacar el uso de disolventes no respetuosos con el medio ambiente, la mayor cantidad de pasos (maceración, centrifugación y evaporación), así como la eliminación incompleta de disolventes, tiempos de extracción más largos y un alto consumo de disolvente, lo que hace del proceso SFE una mejor opción para la obtención de compuestos bioactivos a partir de los subproductos de brócoli. De este modo, para la obtención de compuestos de interés mediante SFE solamente necesitaríamos un paso, utilizaríamos una menor cantidad de disolventes, que además son más respetuosos con el medio ambiente y que acabarían eliminándose casi por completo en el paso de despresurización. Además, como ya demostraron Arnáiz et al. (2011, 2012), los extractos de los subproductos de brócoli obtenidos por SFE contenían un mayor porcentaje de ácidos grasos insaturados (sobre todo de los poliinsaturados 18:3) y de algunos aminoácidos (prolina y glutamina) en comparación con las extracciones Soxhlet y la convencional, respectivamente.

3.3.2.2 Determinación de la actividad antioxidante

Al igual que con las diferentes extracciones anteriores, tras la cuantificación de los compuestos bioactivos de los extractos SFE optimizados, tanto de Parthenon (SFE-PT) como de Naxos (SFE-NX), se procedió a la caracterización de su capacidad antioxidante. Para ello se utilizó el método TEAC y la actividad se expresó en equivalentes de Trolox (mg Trolox g^{-1} extracto). El valor más alto para la actividad antioxidante se obtuvo para los extractos optimizados SFE-NX ($338,69 \pm 31,95 \text{ mg Trolox g}^{-1}$ extracto) en comparación con la obtenida para SFE-PT ($262,68 \pm 33,10 \text{ mg Trolox g}^{-1}$ extracto). Este hecho podría estar ligado a la mayor cantidad de compuestos bioactivos presentes en el extracto SFE-NX optimizado ($237,38 \pm 17,42 \text{ mg g}^{-1}$ extracto, Tabla 16). Además, la elevada capacidad antioxidante de estos extractos podría deberse a un efecto sinérgico entre todos los compuestos bioactivos presentes en el extracto. De esta forma, los resultados obtenidos concuerdan con los descritos por Arnáiz et al. (2016), quienes concluyeron que los extractos obtenidos mediante SFE de hojas de brócoli NX contenían una mayor cantidad de compuestos fenólicos totales y presentaron además, una mayor capacidad antioxidante que los extractos de procedentes de brócoli PT. Del mismo modo, estudios realizados por Hwang & Lim (2015) demostraron que la cantidad de compuestos bioactivos procedentes de subproductos del brócoli (hojas y tallos) pueden verse afectados por diferentes factores como pueden ser el cultivar y el estado de madurez de la planta siendo los subproductos derivados ricos en compuestos con actividad antioxidante y anticancerígena.

Capítulo I

Por otra parte, cuando se compararon la actividad antioxidante determinada en los extractos obtenidos mediante EC con la que se obtuvo de los extractos SFE (Tabla 16), se observaron ciertas diferencias en las tendencias. Mientras que, en los extractos de EC, la actividad antioxidante fue mayor en brócoli PT (EC-PT) que en NX (EC-NX) ($625,58 \pm 24,49$ frente a $257,55 \pm 1,42$ mg Trolox g^{-1} extracto), en los extractos de SFE, se observó un efecto contrario ($262,68 \pm 33,09$ y $338,69 \pm 31,95$ mg Trolox g^{-1} extracto, para SFE-PT y SFE-NX, respectivamente). Esto podría estar ligado a la cantidad de compuestos bioactivos totales determinados en ambas variedades, la cual resultó ser inferior en brócoli NX con la EC, pero mayor que en brócoli PT con la extracción SFE (Tabla 16).

3.4 Cuantificación de los compuestos obtenidos por extracción mediante fluidos presurizados

3.4.1 Establecimiento de las condiciones para PLE

A pesar de todas las ventajas que supuso el uso de la tecnología SFE para la extracción de compuestos bioactivos a partir de los subproductos del brócoli, mediante esta técnica no fue posible la extracción de los compuestos más característicos del género *Brassica*: los glucosinolatos. Por tanto, con el fin de extraer y cuantificar los glucosinolatos se procedió a la extracción de estos compuestos mediante PLE.

Con las condiciones de extracción ya establecidas (Tabla 17), se cuantificaron los glucosinolatos (variable respuesta) presentes en las 16 condiciones mencionadas mediante HPLC-MS (Tabla 17). Los resultados obtenidos indicaron que las condiciones capaces de extraer la mayor cantidad de glucosinolatos totales fueron PLE-15, seguida de la PLE-16 y la PLE-3. En estas condiciones se obtuvieron $3.648,94 \pm 116,18$, $2.929,95 \pm 93,79$ y $2.564,74 \pm 80,65$ μg de glucosinolatos g^{-1} extracto, respectivamente. Estas condiciones se correspondieron con aquellas en las que la temperatura de extracción fue de las más baja estudiadas, 70 °C para PLE-15 y PLE-3 y 53 °C para PLE-16 (Tabla 17). Por el contrario, aquellas condiciones con temperaturas más elevadas (185 - 200 °C), PLE-7, 9, 11, 13 y 14 fueron en las que menos cantidad de glucosinolatos se extrajeron. Este hecho podría deberse al efecto de degradación térmica por los valores de la temperatura de extracción. En cuanto al rendimiento de la extracción, como se observa en la Tabla 17, los valores obtenidos oscilaron entre el $22,42$ % en el caso de la extracción PLE-10 y el $56,31$ % en la PLE-7. Sin embargo, el mayor contenido en glucosinolatos se obtuvo en aquellas condiciones en las que el rendimiento fue menor, como se observa en la condición PLE-15 ($3.648,94 \pm 116,18$ μg de glucosinolatos g^{-1} extracto; RE- $26,59$ %).

Tabla 17. Valores de las variables independientes usados para el diseño compuesto central y la variable respuesta (contenido en glucosinolatos ($\mu\text{g g}^{-1}$ extracto)) obtenidos para cada condición. Los datos se expresan como la media \pm la DE de tres réplicas. RE, rendimiento de extracción.

Condición	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Etanol (%)	Tiempo (min)	Respuesta (glucosinolatos)	RE (%)
PLE-1	70	15	20	1.926,44 \pm 59,16	37,11
PLE-2	128	50	22	1.896,04 \pm 61,55	38,17
PLE-3	70	85	5	2.564,74 \pm 80,65	26,72
PLE-4	128	50	12,5	1.701,03 \pm 56,01	37,16
PLE-5	70	15	5	1.820,11 \pm 56,62	37,6
PLE-6	128	50	12,5	1.838,77 \pm 59,36	36,18
PLE-7	185	15	5	531,44 \pm 19,61	56,31
PLE-8	128	50	3	1.660,95 \pm 55,07	35,53
PLE-9	200	50	12,5	335,44 \pm 13,62	40,48
PLE-10	128	95	12,5	976,81 \pm 29,26	22,42
PLE-11	185	15	20	695,85 \pm 24,73	51,83
PLE-12	128	5	12,5	1.144,76 \pm 34,5	45,34
PLE-13	185	85	5	154,56 \pm 5,06	38,08
PLE-14	185	85	20	193,97 \pm 8,09	40,58
PLE-15	70	85	20	3.648,94 \pm 116,18	26,59
PLE-16	53	50	12,5	2.929,95 \pm 93,79	32,36

En cuanto al contenido individualizado de glucosinolatos (Figura 26), el glucosinato mayoritario fue la glucorafanina (glucosinato alifático precursor del isotiocianato SFN). Este glucosinato representó de media un 64 % del total de glucosinolatos, con valores que alcanzaron los $1.798,97 \pm 98,94 \mu\text{g g}^{-1}$ extracto (PLE-16). Tras este, se encontró la neoglucobrasicina, que representó en promedio un 25% del total de glucosinolatos. En conjunto, estos dos glucosinolatos representaron casi el 90% del total cuantificado, por lo que el resto de los glucosinolatos determinados se encontraron en cantidades significativamente menores en comparación con los dos glucosinolatos mayoritarios ya citados.

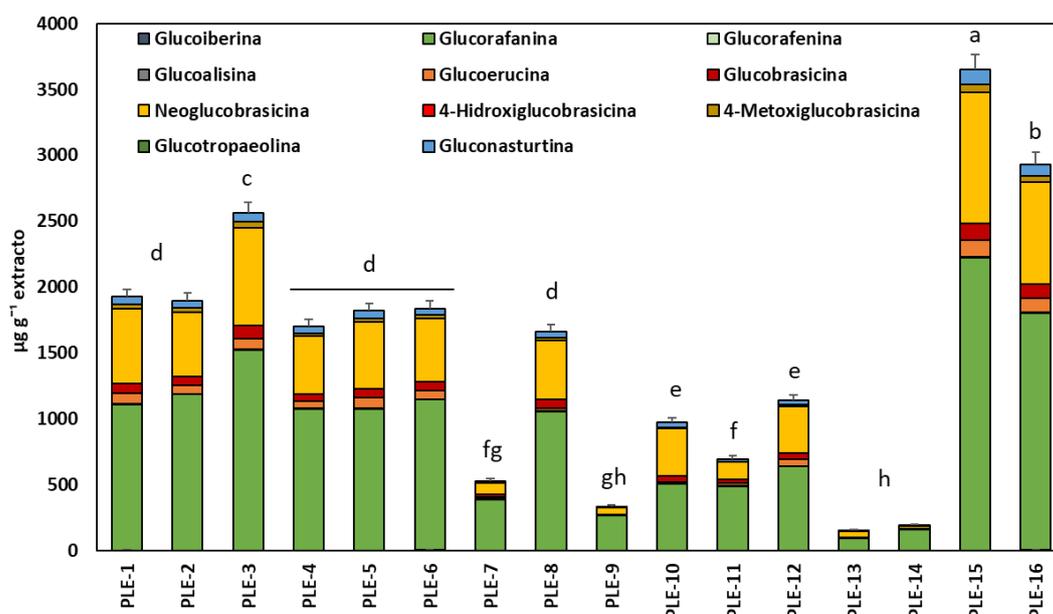


Figura 26. Glucosinolatos totales ($\mu\text{g g}^{-1}$ extracto) obtenidos de los de subproductos de brócoli cultivar Naxos (fracción hoja/tallo 3:1) extraídos mediante PLE. Los datos muestran la media \pm DE de tres replicas independientes. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas según el test de Tukey ($p < 0,05$).

3.4.2 Optimización de la extracción PLE

Los resultados experimentales obtenidos de la cuantificación de glucosinolatos para los diferentes puntos del diseño experimental fueron evaluados para determinar el ajuste del modelo CCD 2³ propuesto, así como la significación estadística de los efectos de las variables independientes (Tabla 18). Este análisis determinó un alto grado de correlación ($R^2 = 0,942$).

Tabla 18. Análisis de varianza (ANOVA) y parámetros de ajuste del modelo CCD 2³ propuesto. *Coeficientes significativos ($p < 0,05$ o $p < 0,10$). SS = suma de cuadrados; Df = grados de libertad; MS = media cuadrada; R^2 = Coeficiente de correlación cuadrática.

Fuente	Y = Contenido en glucosinolatos				
	SS	Df	MS	F-Ratio	p-Value
X₁: Temperatura	1,21e+7	1	1,21e+7	131,88	0,0000*
X₂: Etanol	166424	1	166424	1,81	0,2209
X₁ X₂	1,40e+6	1	1,40e+6	15,19	0,0059*
X₂ X₂	680824	1	680824	7,39	0,0298*
Falta de ajuste	234659	4	58664,7	0,64	0,6527
Pure error	644881	7	92125,8		
Total (corr.)	1,53e+7	15			
R²	0,942				

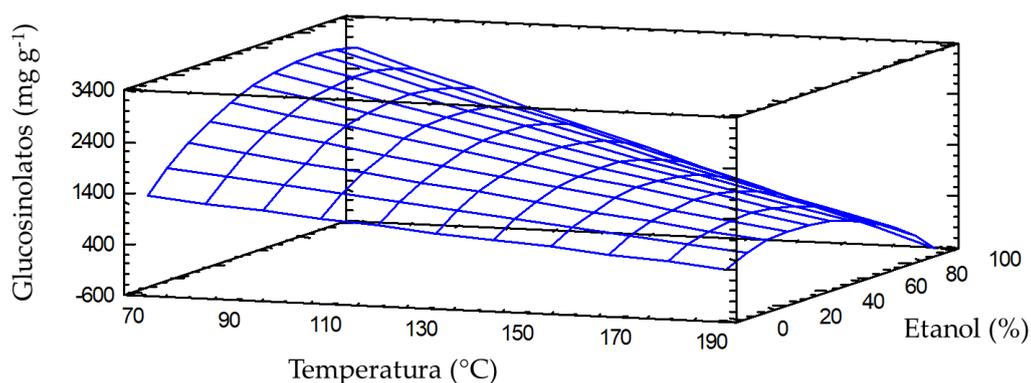


Figura 27. Gráfico en 3D de superficie de respuesta pronosticado de los efectos de la temperatura y la presión sobre el contenido en glucosinolatos.

Se analizaron los valores de probabilidad (p -value) de los efectos lineales, cuadráticos y de interacción entre las variables independientes. En este caso solamente la temperatura presentó un efecto individual significativo (p -value de 0,0000). En relación con el porcentaje de etanol usado en la extracción, a pesar de que su efecto lineal no demostró afectar significativamente al valor de la variable respuesta, la interacción con la temperatura sí que resultó en un impacto estadísticamente significativo en el contenido de glucosinolatos (valor $p = 0,0059$).

Estos resultados podrían indicar la existencia de una sinergia entre la temperatura y el porcentaje de etanol usado para maximizar la obtención de compuestos como los glucosinolatos, conclusión similar a la obtenida por otros estudios llevados a cabo en la optimización de este proceso (Bojorquez-Rodríguez et al., 2022). El efecto cuadrático del etanol también fue significativo (valor $p = 0,0298$). En base a los resultados, el diseño experimental se ajustó a un modelo polinomial cuadrático que fue reducido conservando los términos de las variables independientes y sus efectos significativos para la variable respuesta (Y , en este caso μg de glucosinolatos g^{-1} extracto) (Ecuación 3):

$$Y = 1831,28 - 7,6311X_1 + 58,7085X_2 - 0,207819X_1X_2 - 0,287463X_2X_2 \quad (3)$$

De este modo, se propusieron las condiciones óptimas para la máxima recuperación de glucosinolatos. Los valores óptimos predichos por el modelo se muestran en la Tabla 19:

Tabla 19. Valores de los parámetros óptimos en la extracción mediante fluidos presurizados

	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Etanol (%)
Óptimo	53	8	83

Al aplicar estas condiciones optimizadas de forma experimental, la cantidad máxima de glucosinolatos extraída fue de $4.529,52 \pm 131,69 \mu\text{g g}^{-1}$ extracto, cantidad incluso mayor que la obtenida con la condición más favorable de la batería de experimentos que fue PLE-15 ($3.648,94 \pm 116,18 \mu\text{g g}^{-1}$ extracto).

Además, como se muestra en la Tabla 20, al comparar el valor predicho por nuestro modelo para el contenido total de glucosinolatos en base a la ecuación obtenida (Ecuación 3), con los valores experimentales al aplicar las condiciones óptimas, se observó que, a excepción de las muestras PLE-13 y 14, la varianza de los datos fue aceptable, encontrándose todos en el rango de 0,6 a 10,3 (CV < 20 %). De hecho, la varianza entre los datos teóricos y los obtenidos experimentalmente en las condiciones óptimas fue baja (CV = 10 %), indicando una buena reproducibilidad del sistema investigado (Liyana-Pathirana & Shahidi, 2005).

Tabla 20. Comparación entre los resultados experimentales y los predichos por el modelo generado para la cantidad de glucosinolatos ($\mu\text{g g}^{-1}$ extracto) de la extracción mediante fluidos presurizados. CV = coeficiente de varianza.

Nombre	Teórico	Experimental	CV (%)
PLE-1	1894,84	$1926,44 \pm 59,16$	0,6
PLE-2	1741,23	$1896,04 \pm 61,55$	3,0
PLE-3	2973,88	$2564,74 \pm 80,65$	5,2
PLE-4	1741,23	$1701,03 \pm 56,01$	0,8
PLE-5	1894,84	$1820,11 \pm 56,62$	1,4
PLE-6	1741,23	$1838,77 \pm 59,36$	1,9
PLE-7	658,78	$531,44 \pm 19,61$	7,6
PLE-8	1741,23	$1660,95 \pm 55,07$	1,7
PLE-9	443,64	$335,44 \pm 13,62$	9,8
PLE-10	1310,37	$976,81 \pm 29,26$	10,3
PLE-11	658,78	$695,85 \pm 24,73$	1,9
PLE-12	1007,85	$1144,76 \pm 34,5$	4,5
PLE-13	64,88	$154,56 \pm 5,06$	28,9
PLE-14	64,88	$193,97 \pm 8,09$	35,3
PLE-15	2973,88	$3648,94 \pm 116,18$	7,2
PLE-16	3092,88	$2929,95 \pm 93,79$	1,9
Condiciones óptimas	3405,11	$4529,52 \pm 131,69$	10

Una vez establecidas las condiciones óptimas para la extracción de los glucosinolatos mediante PLE, se realizó la extracción optimizada de glucosinolatos brócoli NX (Tabla 21). El rendimiento de esta extracción optimizada fue del 21,42 %, similar al rendimiento de la condición PLE-15 (26,59 %, Tabla 17), que dio lugar a la mayor cantidad de glucosinolatos (Figura 26). Sin embargo, al comparar estos resultados con los obtenidos en la EC-NX de glucosinolatos observamos que mediante PLE los valores totales de glucosinolatos fueron del orden de 2 veces inferior al obtenido tras la EC ($4.529,52 \pm 131,69 \mu\text{g g}^{-1}$ extracto frente a los $9.015,45 \pm 449 \mu\text{g g}^{-1}$ extracto), pero esa diferencia en el contenido de glucosinolatos no se tradujo en una reducción significativa en el RE, obteniéndose rendimientos del 21,42 y 30,55 % en PLE-OP-NX y EC-NX, respectivamente. Esta diferencia podría explicarse por las condiciones de ambos métodos. Es probable que los 53 °C a los que se extraen estos compuestos por PLE, no sean suficientes para inactivar la enzima mirosinasa (en comparación con los 73 °C a los que se exponen en la EC; es decir, 20 °C más) que degrada los glucosinolatos a sus isotiocianatos. Este además resultó ser el factor que más afectó a la obtención de glucosinolatos mediante PLE, como quedó reflejado en la tabla 18, siendo el *p*-value de la temperatura de 0,000. Sin embargo, algunos autores obtuvieron resultados similares en la optimización de procesos de extracción de glucosinolatos. En ese sentido, Campos et al. (2013) mediante un modelo RSM concluyeron que las condiciones óptimas para alcanzar el mayor rendimiento en la extracción de glucosinolatos en hipocótilos de *Lepidium meyenii* fue el uso del etanol al 60 % y una temperatura de 47 °C, aunque en este caso durante un tiempo mucho mayor, 90 minutos. Resultados similares fueron obtenidos por (Bojorquez-Rodríguez et al., 2022) quienes establecieron las condiciones óptimas para la extracción de glucosinolatos mediante PLE a partir de brotes de brócoli en un 50 % de etanol y una temperatura de 40 °C.

Tabla 21. Glucosinolatos totales ($\mu\text{g g}^{-1}$ extracto) obtenidos de los subproductos de brócoli cultivar Naxos obtenidos mediante las condiciones óptimas de PLE..

Glucosinolatos		PLE-OP-NX	EC-NX
Alifáticos	Glucoiberina	6,92 ± 0,37	8,25 ± 1,27
	Glucoorafanina	2143,62 ± 100,75	4887,88 ± 961,27
	Gluconapina	0,6 ± 0,04	n.d.
	Glucoalisina	13,57 ± 1,14	27,35 ± 4,72
	Glucoerucina	380,23 ± 9,51	919,07 ± 176,56
	Glucoorafenina	n.d.	4,24 ± 1,91
Indólicos	Glucobrasicina	215,57 ± 11,64	470,64 ± 87,63
	Neoglucobasicina	1497,44 ± 140,76	2116,38 ± 370,04
	4-Hidroxiglucobasicina	21,87 ± 1,25	82,06 ± 16,54
	4-Metoxiglucobasicina	130,1 ± 11,06	257,62 ± 38,71
Aromáticos	Gluco tropaeolina	n.d.	8,25 ± 1,33
	Gluconasturtina	119,6 ± 11,60	233,71 ± 50,15
TOTAL		4529,52 ± 131,69	9015,45 ± 449
RE (%)		21,42	30,74

Capítulo 2. Aplicación de los extractos obtenidos de subproductos de brócoli en la industria cosmética

1. Antecedentes y objetivos

La industria cosmética está experimentando a nivel mundial un rápido crecimiento debido al aumento de la concienciación sobre la belleza y al creciente interés por el cuidado de la salud, la protección de la piel y los productos cosméticos. Con la expansión de este lucrativo sector, ha surgido una nueva tendencia entre los consumidores de productos cosméticos naturales, sostenibles y de origen “verde” en lugar de sintéticos, lo que ha dado lugar a un aumento del mercado mundial basado en los extractos de plantas (Bouzroud et al., 2023). En este sentido, los subproductos procedentes de la industria agroalimentaria pueden ser útiles como fuente de nutrientes e ingredientes potencialmente funcionales, ofreciendo la oportunidad de obtener productos cosméticos de alto valor añadido. Así, como se ha descrito en el capítulo I, los subproductos de brócoli constituyen una fuente importante de compuestos bioactivos entre los que se incluyen compuestos fenólicos, carotenoides y glucosinolatos, que proporcionan importantes beneficios para la salud humana debido fundamentalmente a sus propiedades antioxidantes y anticancerígenas (Ares et al., 2013; Jang et al., 2015; Dang et al., 2019).

La piel humana es la primera barrera de protección frente a los agentes externos que pueden causar daño en el organismo. Uno de los principales factores nocivos a los que se enfrenta este gran órgano es la radiación UV. La principal fuente de exposición a los rayos UV es la luz solar, siendo aquella clasificada como UV-A (400–315 nm), UV-B (315–280 nm) y UV-C (280–100 nm), según la longitud de onda de emisión. Los rayos UV que llegan a la piel humana son principalmente UV-A y UV-B. Las radiaciones UV-A y UV-B comprenden alrededor de un 10 % de la radiación solar antes de que éstas penetren en la atmósfera terrestre y son las únicas radiaciones ultravioleta que alcanzan la superficie de la Tierra. Así, la cantidad de radiación UV del sol que alcanza la superficie terrestre está determinada por diversos factores como el agujero de la capa de ozono, la altitud, latitud y elevación de la superficie, así como las condiciones ambientales (Narayanan et al., 2010). Incluso a pesar de que el 95 % de la UV-B sea filtrada por la capa de ozono, esta radiación es considerada como la más dañina y genotóxica. Además de a la luz UV-B, la piel se encuentra expuesta a otras fuentes de luz que pueden llegar a ser perjudiciales para la salud como las fuentes de luz ocupacionales y los sistemas de fototerapia, que son los principales responsables de quemaduras solares, foto-envejecimiento, daño ocular, mutaciones, generación de ROS y daño en el ADN, lo que puede llegar a causar cáncer de piel (Godar, 2005; Hussein, 2005; Svobodova et al., 2006). En cuanto a la UV-C, a pesar de que ser la radiación UV más peligrosa, puesto que es la más energética ya que abarca las

Capítulo II

longitudes de onda más cortas, no presenta un riesgo real tan importante puesto que es prácticamente bloqueada en su totalidad por el oxígeno de la atmósfera.

La diana principal de actuación de la radiación UV-B es la capa basal de células de la epidermis, siendo los queratinocitos la población celular más abundante de esta capa, por lo que se consideran la diana principal de los efectos de la luz UV-B (Liu et al., 2012). Los queratinocitos actúan como inmunocitos de la piel ya que son capaces de secretar diferentes citoquinas, participando así en la regulación de la respuesta inmune, por lo que este tipo de células tienen un papel principal en la amplificación de la cascada de inflamación en las enfermedades de la piel (Li et al., 2015). Así, la radiación UV-B percibida por la piel es, en gran parte, absorbida por los aminoácidos aromáticos del estrato córneo aunque finalmente llega al ADN de las células epiteliales, puesto que este es el principal cromóforo diana de este tipo de radiación (Hussein, 2005). Una vez el ADN de los queratinocitos es afectado por la radiación UV-B, y las células se encuentran dañadas irreversiblemente, se desencadenan los mecanismos de apoptosis, que actúan como un mecanismo protector de gran importancia puesto que, de esta manera, se garantiza la eliminación de las células que podrían resultar potencialmente cancerígenas (Takasawa et al., 2005). De esta manera, el daño de la piel inducido por UV-B puede ser directo, debido a la absorción de la luz UV-B por las moléculas diana (membrana lipídica, proteínas y ADN), generando varios tipos de lesiones pro-mutagénicas como los dímeros de ciclobutano pirimidina y los fotoproductos (6,4) de pirimidina-pirimidinona, o indirecta, en respuesta a la generación excesiva de ROS (Calò & Marabini, 2014). Además, la radiación UV-B es capaz de aumentar la expresión génica y los niveles de secreción de interleucinas como la IL-1 β , IL-6, IL-10, la proteína quimioatrayente de monocitos (MCP-1) o el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) (Monfrecola et al., 2013).

Dada la amplia variedad de efectos secundarios causados por la exposición a la radiación UV, reducir la cantidad de la luz UV que penetra en la piel y reforzar los mecanismos protectores propios de la piel es una estrategia interesante para la prevención de enfermedades de la piel, incluido el cáncer. Teniendo todo esto en cuenta, se han propuesto diversos métodos como medida para la fotoprotección de la piel y así paliar los daños provocados por la radiación UV, entre los que destacan la ingesta de compuestos antioxidantes capaces de eliminar los radicales libres que causan estos desequilibrios (Park & Lee, 2008). De esta forma, se ha establecido la eficacia de la ingesta de compuestos antioxidantes para proteger frente al desarrollo de cáncer tanto en modelos de estudio animal, como en estudios epidemiológicos en humanos (Nishigori et al., 2004).

Con estos antecedentes y para el desarrollo de este capítulo se utilizaron los extractos enriquecidos en compuestos bioactivos procedentes de los subproductos de brócoli Naxos obtenidos mediante tecnologías de extracción “verdes” como un sistema de protección frente al daño inducido por la radiación UV-B en una línea celular de queratinocitos no tumorigénicos (HaCaT) (Figura 28), por lo que los objetivos generales que se plantean son los siguientes:

1. la caracterización del crecimiento de la línea celular de queratinocitos HaCaT
2. el estudio del efecto fotoprotector de los extractos procedentes de subproductos de brócoli sobre la línea celular HaCaT expuesta previamente a la radiación UV-B.
3. el estudio de los mecanismos protectores desencadenados por los extractos enriquecidos en compuestos bioactivos procedentes de los subproductos de brócoli sobre la línea celular HaCaT expuesta previamente a la radiación UV-B.
4. el estudio del efecto reparador de los extractos enriquecidos en compuestos bioactivos procedentes de los subproductos de brócoli sobre la barrera de queratinocitos de piel dañados por heridas superficiales.

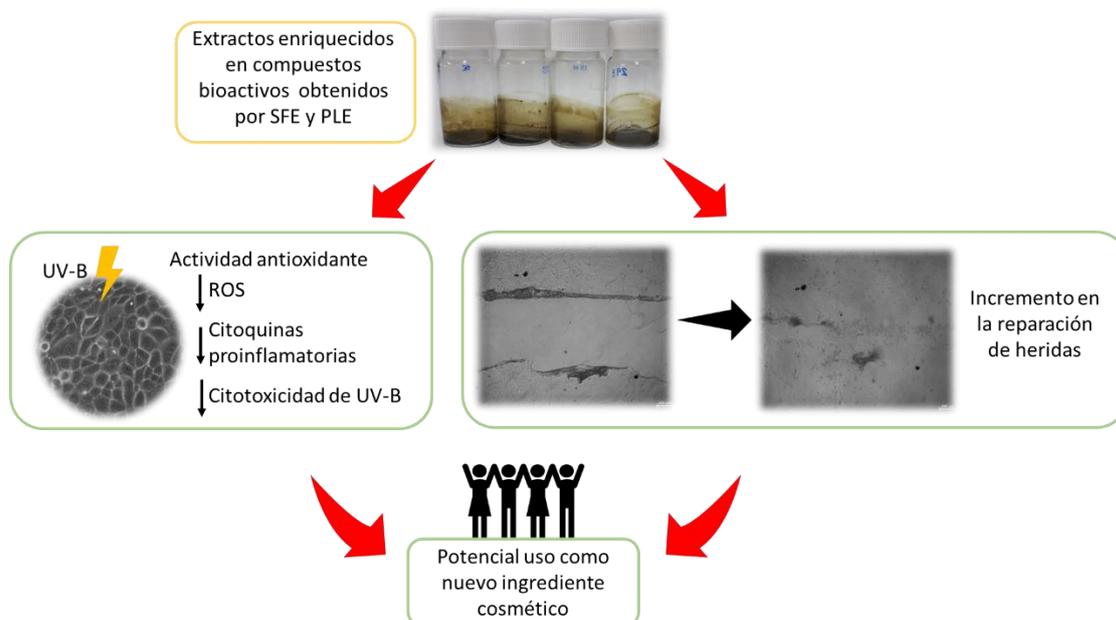


Figura 28. Resumen gráfico de los objetivos planteados en este capítulo.

2. Caracterización del crecimiento de la línea celular de queratinocitos HaCaT

Puesto que la línea celular de queratinocitos HaCaT (Figura 29) se adquirió por primera vez por el grupo de investigación de la Universidad de Murcia, en primer lugar, se realizó la caracterización del crecimiento de esta línea con el fin de determinar la fase de crecimiento, así como la densidad celular óptima para la realización de los ensayos posteriores.

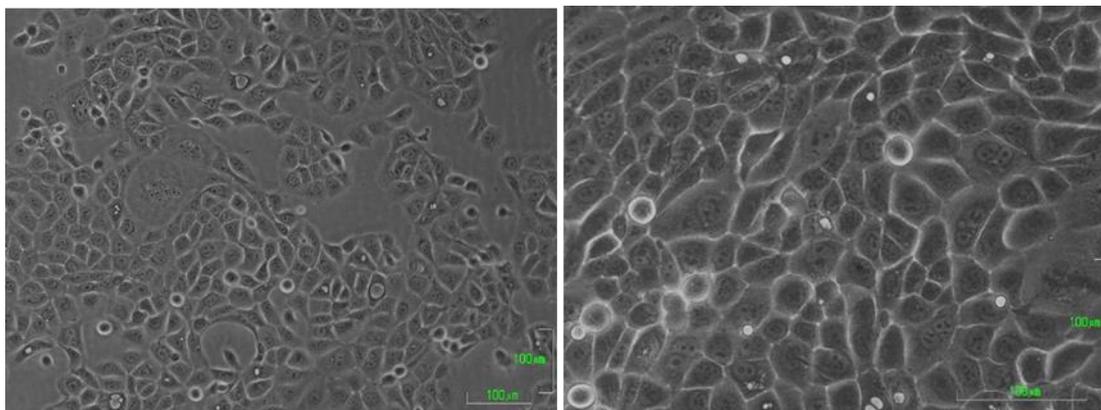


Figura 29. Imagen de monocapa de queratinocitos HaCaT. Aumento de 10x (A) y 20x (B).

Para ello, se llevó a cabo la realización de la recta patrón de las células que nos mostró la relación entre la absorbancia y el número de células vivas mediante el ensayo colorimétrico del MTT. Las medidas de absorbancia se obtuvieron tras 24 h desde la siembra de diferentes densidades celulares (400, 800, 1.600, 6.400, 12.800, 25.600, 51.200 102.400 y 204.800 células por pocillo en placas de 96 pocillos) una vez realizada la incubación con MTT durante 4 h y los resultados se reflejan en la Figura 30. Así, como se observa en la Figura 30, existe una relación de tipo sigmoide entre el número de células en cultivo y el valor de absorbancia, siendo la fórmula de la curva obtenida:

$$y = \frac{Bottom + (Top - Bottom)}{1 + \frac{EC50^{slope}}{x}}$$

En donde:

y: absorbancia; Bottom: absorbancia mínima; Top: absorbancia máxima; EC50: número de células que presenta la mitad de la absorbancia máxima; slope: pendiente; x: número de células.

Como se puede observar de la curva obtenida (Figura 30A), las densidades celulares más bajas (400 y 800 células/pocillo) apenas mostraron cambios en la medida de absorbancia a 570 nm (0,11 y 0,14 unidades de absorbancia (UA)), respectivamente). A partir de 3.200 células/pocillo, los valores de absorbancia comenzaron a incrementarse de manera exponencial desde las 0,36

UA hasta aproximadamente 3,2 UA (correspondiente a 102.400 células por pocillo), donde se observó una saturación en la medida de absorbancia. Los parámetros de esta recta patrón (Figura 30B) permitieron determinar al rango de absorbancia en el que se deben encontrar las células a la hora de realizar los ensayos, y que se situó en el rango de 0,4-2,9 UA (correspondiente a 3.500 y 80.000 células respectivamente), densidades celulares entre las cuales se realizaron los siguientes experimentos.

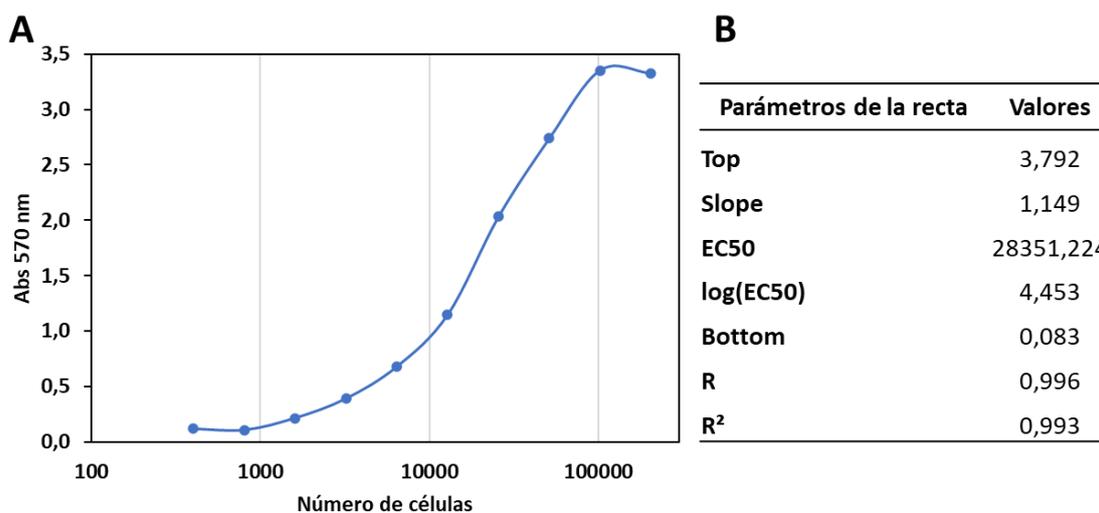


Figura 30. Recta patrón de la absorbancia de las células (A) y parámetros de la recta (B)

2.1 Curva de crecimiento de HaCaT

Una vez determinado el número máximo de células por pocillo que podíamos detectar usando el ensayo de MTT en placas de 96 pocillos, se llevó a cabo la determinación del perfil de crecimiento en la línea celular HaCaT, previamente establecida a lo largo de los subcultivos, utilizando diferentes densidades celulares de partida (400, 800, 1.600, 3.200, 6.400 y 12.800 células/pocillo en placas de 96 pocillos). Para ello, se determinó la viabilidad celular de las placas sembradas desde el inicio del cultivo hasta las 120 h.

Como se observa en la Figura 31, en las densidades celulares más bajas (400, 800 y 1.600 células por pocillo) apenas se observó proliferación celular. Este hecho fue el esperado puesto que se usó una densidad de siembra inicial por debajo de la recomendada por el distribuidor de la línea celular, que para el caso de las placas de 96 pocillos era de 3.200 células/pocillo. Con 1.600 células por pocillo, se observó una diferencia significativa en la absorbancia con respecto a las densidades anteriores, aunque la fase *lag* se extendió en el tiempo, hasta aproximadamente las 72 h, momento a partir del cual comenzó a observarse un ligero aumento del crecimiento. A partir de 3.200 y 6.400 células/pocillo como inóculo inicial y tras 24 h desde la siembra, las células se encontraban en la fase exponencial de crecimiento que se extendió más allá de las

Capítulo II

120 h, a diferencia de lo que ocurrió con el inoculo de 12.800 células por pocillo, en las cuales, tras 96 h se observó una desaceleración del crecimiento, encontrándose en ese momento en una fase estacionaria del crecimiento.

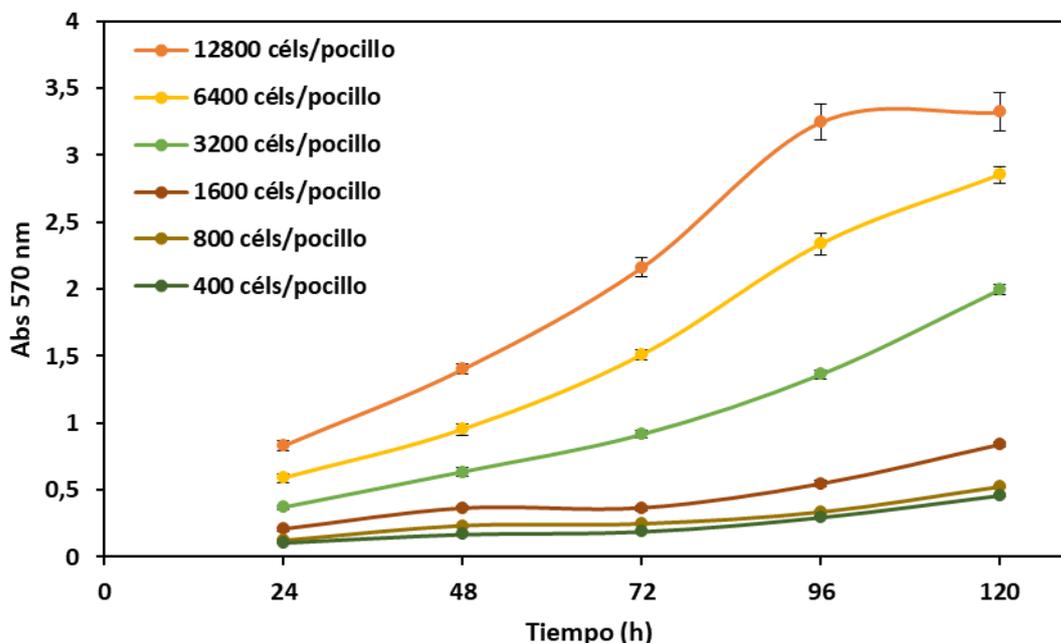


Figura 31. Curvas de crecimiento de la línea celular de HaCaT a diferentes densidades celulares (400, 800, 1.600, 3.200, 6.400 y 12.800 células/pocillo). Los valores representados son las medias \pm DE de seis réplicas independientes.

A partir de los resultados obtenidos de las curvas de crecimiento, se determinaron los parámetros característicos del crecimiento celular, tiempo de duplicación (DT) y velocidad máxima de crecimiento ($V_{m\acute{a}x}$) a partir de los datos correspondientes de las células que se encontraban en fase de crecimiento exponencial (Tabla 22). Como se observa en la Tabla 22, el mayor DT se produjo cuando se utilizó como inoculo inicial una densidad celular \leq a 1.600 células por pocillo (1,29 días (d) para 400 y 800 células/pocillo y 1,36 d para el inóculo de 1.600 células/pocillo), mientras que a densidades celulares $>$ de 1.600 células por pocillo, el DT se redujo significativamente hasta los 1,02 d para la concentración más alta de células (12.800 células por pocillo). Además, estos resultados se correlacionaron con los resultados obtenidos de las curvas de crecimiento (Figura 31) puesto que, a esas densidades celulares elevadas, la duración de la fase *lag* se produjo en las primeras 24 h desde la siembra de las células, alcanzándose mucho antes la fase de crecimiento activo y, por tanto, al ser mayor la cantidad de células, éstas proliferaron más rápidamente hasta llegar a la máxima confluencia. En el caso de la $V_{m\acute{a}x}$, esta fue inversamente proporcional al DT, obteniéndose la mayor $V_{m\acute{a}x}$ en las curvas de crecimiento con los inóculos iniciales más elevados, siendo estas 0,61, 0,58 y 0,68 d^{-1} para 3.200, 6.400 y 12.800 células/pocillo, respectivamente.

Tabla 22. Parámetros de caracterización del crecimiento de la línea celular HaCaT calculados a partir de los datos de las curvas de crecimiento. DT: tiempo de duplicación; $V_{m\acute{a}x}$: velocidad máxima de crecimiento. Diferentes letras indican diferencias significativas entre los valores de cada columna de acuerdo con la prueba de Tukey ($p < 0,05$).

Inóculo inicial (células/pocillo)	DT (d)	$V_{m\acute{a}x}$ (d^{-1})
400	1,29 ^{ab}	0,54 ^{bc}
800	1,29 ^{ab}	0,54 ^{bc}
1.600	1,36 ^a	0,51 ^c
3.200	1,14 ^{bc}	0,61 ^{ab}
6.400	1,20 ^{ab}	0,58 ^{bc}
12.800	1,02 ^c	0,68 ^a

Por tanto, los resultados obtenidos a partir de las curvas de crecimiento permitieron seleccionar una densidad celular de 5.000 células por pocillo como inóculo inicial óptimo para la realización de los ensayos de bioactividad de los extractos puesto que, densidades celulares entre 3.200 y 6.400 células por pocillo, se podían mantener en crecimiento durante 24 h, tiempo necesario para que las células superen la fase *lag* y se encuentren en la fase óptima de crecimiento activo para llevar a cabo la adición de los extractos, momento en el cual tiene lugar la metabolización de los compuestos bioactivos presentes en los extractos objeto de estudio. Además, las células se podían mantener en cultivo hasta pasadas 96 h más, sin que alcanzasen la confluencia, momento en el cual se realizan las determinaciones de la viabilidad celular mediante el ensayo del MTT.

3. Estudios de citotoxicidad de los extractos y de la luz UV-B

Una vez establecida la concentración adecuada de siembra de la línea celular de queratinocitos, se llevaron a cabo los ensayos de citotoxicidad con el fin de determinar aquellas concentraciones de los extractos y de dosis de luz UV-B que provocaban un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de las células HaCaT.

3.1 Citotoxicidad de los disolventes

Dada la naturaleza apolar de los extractos enriquecidos en compuestos bioactivos obtenidos de la SFE, los extractos optimizados obtenidos a partir de subproductos de brócoli NX (SFE-NX) se disolvieron en dos disolventes: etanol y DMSO, por lo que para descartar que el efecto inhibitorio observado sobre el crecimiento de los queratinocitos se debiese al disolvente, se evaluó la capacidad citotóxica de estos dos disolventes. Para ello, las células HaCaT se sembraron a una densidad inicial de 5.000 células por pocillo en microplacas de 96 pocillos y se incubaron durante 24 h. Después de 24 h, los disolventes se añadieron a los pocillos en diferentes concentraciones (rango de 0 a 1 %) en el medio de cultivo y tras otras 24 h, se determinó la

viabilidad celular mediante el método MTT. Los resultados obtenidos (Figura 32) mostraron que la exposición de las células HaCaT a concentraciones de etanol $\geq 0,25$ % provocaban un descenso significativo de la viabilidad celular. Así, a partir de una concentración de 0,25 % de etanol, la viabilidad celular se redujo hasta un 87 % con respecto al control y continuó disminuyendo de manera dosis-dependiente, llegando a reducirse hasta un 79 % y un 74 % cuando se usaron las concentraciones más altas de 0,5 % y 1 %, respectivamente. Sin embargo, al ser expuestas a DMSO, las células no presentaron una reducción significativa de la viabilidad hasta la concentración de 0,5 %, en donde las células alcanzaron el 80 % de la viabilidad con respecto al control. En consecuencia, y debido a que los extractos presentaban una mayor solubilidad en DMSO, se seleccionó este como disolvente más adecuado de los extractos para la realización de los ensayos posteriores y se utilizó DMSO a una concentración que, en ningún caso, superó el 0,5 % en los pocillos.

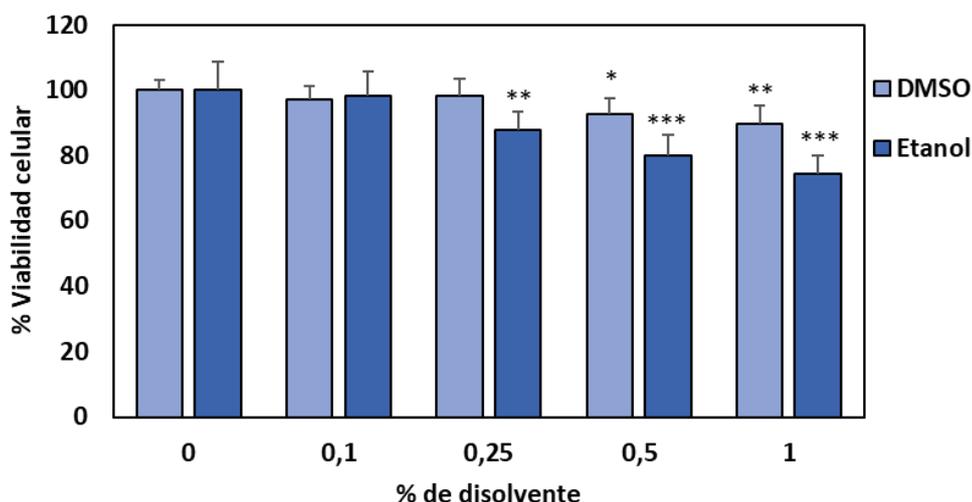
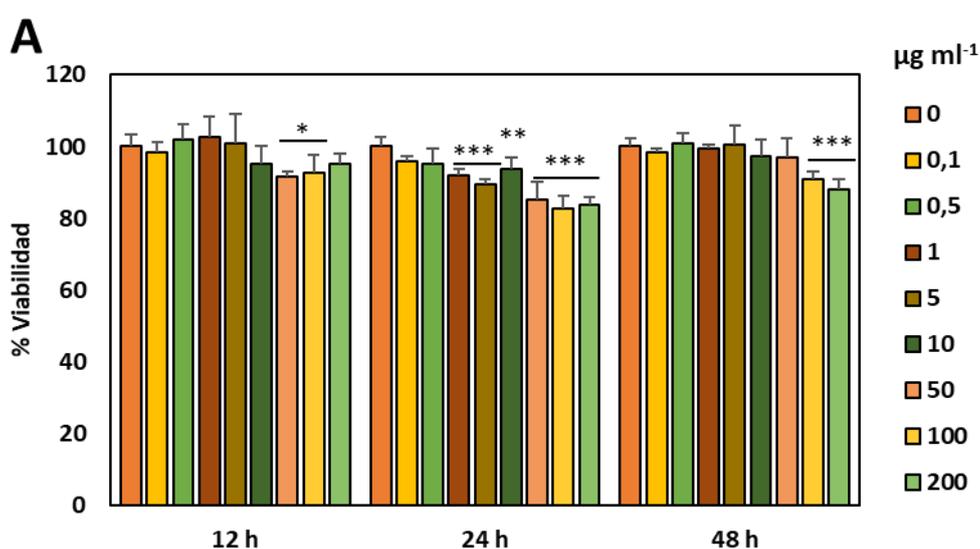


Figura 32. Efecto de diferentes porcentajes de dimetilsulfóxido (DMSO) y de etanol en la viabilidad celular de los queratinocitos HaCaT. Los valores se dan como el promedio \pm DE de seis réplicas. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, ***; $p < 0,001$.

3.2 Citotoxicidad de los extractos de Naxos obtenidos mediante fluidos supercríticos

Una vez seleccionado el DMSO como disolvente para los extractos, se llevó a cabo la evaluación del efecto citotóxico de diferentes concentraciones de los extractos SFE-NX a lo largo del tiempo (Figura 33). Para ello, los queratinocitos se sembraron en las condiciones descritas en la sección anterior y posteriormente, los extractos SFE-NX se añadieron a los pocillos para lograr concentraciones finales que oscilaron entre 0 y 200 μg de extracto ml^{-1} (que se correspondía con 46 μg de compuestos bioactivos ml^{-1}). Los extractos se incubaron durante 12, 24 y 48 h antes de determinar la viabilidad celular. Según el análisis ANOVA (Figura 33B), la viabilidad celular se vio significativamente afectada por la concentración del extracto, el tiempo de exposición y la

interacción entre ambos factores. Como se muestra en la Figura 33A, los extractos SFE-NX resultaron ser ligeramente citotóxicos hasta 50 μg de extracto ml^{-1} , reduciéndose la viabilidad celular en torno al 91 % después de 12 h de tratamiento. Sin embargo, se observó una disminución significativa en la viabilidad celular cuando las células HaCaT se expusieron a concentraciones de extracto superiores a 50 μg de extracto ml^{-1} durante 24 h (~83 %), mientras que los extractos SFE-NX fueron citotóxicos a concentraciones superiores a 100 μg de extracto ml^{-1} a las 48 h, en donde la viabilidad celular se redujo hasta en un 88 %. La toxicidad de los extractos alcanzó un máximo a las 24 h, mostrando el valor de IC_{50} más bajo (256 μg extracto ml^{-1}) con respecto a las 12 h (850 μg extracto ml^{-1}) y 48 h (1805 μg extracto ml^{-1}) después del tratamiento.



B

	SS	Df	MS	F-Ratio	p-Value
X ₁ : Concentración	3120,218	8	390,027	28,947	0,000***
X ₂ : Tiempo	1567,978	2	783,989	58,186	0,000***
X ₁ X ₂	923,558	16	57,722	4,284	0,000***
Error	2061,490	153	13,474		
Total (corr.)	7438,048	179			
R ²	0,723				

Figura 33. (A) Viabilidad de las células HaCaT tras 12, 24 y 48 h de exposición a los extractos obtenidos mediante fluidos supercríticos de Naxos. (B) Análisis de varianza ANOVA de las variables independientes de la viabilidad temporal a diferentes concentraciones de extractos. Los datos muestran la media \pm DE de seis réplicas independientes. Los asteriscos indican diferencias significativas * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. SS, suma de cuadrados; Df, grados de libertad; MS, media cuadrada; R², coeficiente de correlación cuadrática.

3.3 Citotoxicidad de la luz UV-B

Uno de los principales agentes causantes del envejecimiento de la piel es la luz UV, particularmente la luz UV-B, que es el componente más dañino de la radiación solar que llega a la superficie de la Tierra provocando una amplia gama de lesiones en la piel, incluida la inflamación, el fotoenvejecimiento y la fotocarcinogénesis (Afaq & Mukhtar, 2006). Para comprobar los efectos de la radiación UV-B sobre la viabilidad de los queratinocitos, se llevó a cabo un estudio de la toxicidad de diferentes dosis de luz UV-B en las células HaCaT con el fin de determinar la dosis a la cual se producía un descenso significativo de la viabilidad celular sin llegar a ser letal. Para ello, en primer lugar, las células HaCaT se expusieron a dosis específicas de luz UV-B (0, 25, 50, 100, 500 y 1.000 mJ cm^{-2}) y se incubaron durante 24 h antes de proceder a determinar la viabilidad celular. Como se muestra en la Figura 34, la exposición a la luz UV-B resultó en una reducción significativa de la viabilidad de las células HaCaT de manera dependiente de la dosis. Así, cuando se aplicó una dosis de 50 mJ cm^{-2} a las células HaCaT, se observó un descenso de la viabilidad hasta alcanzar un 47 % de células vivas con respecto a las células sin irradiar (0 mJ cm^{-2}). Este descenso se vio aún más afectado al aumentar la dosis de radiación, bajando hasta un 6 % de la viabilidad del control cuando se expuso a 100 mJ cm^{-2} , ~5 % al aumentar hasta 500 mJ cm^{-2} y en torno al 100 % de mortalidad con dosis de 1.000 mJ cm^{-2} . Dado que la dosis de luz UV-B de 50 mJ cm^{-2} redujo la viabilidad celular en más del 50 %, se seleccionó esta dosis para experimentos posteriores, que además, resultaría ser una dosis el doble de la requerida para producir el eritema en pieles de foto tipo II tras 24 h (Chiron de la Casinière & Cachorro, 2008).

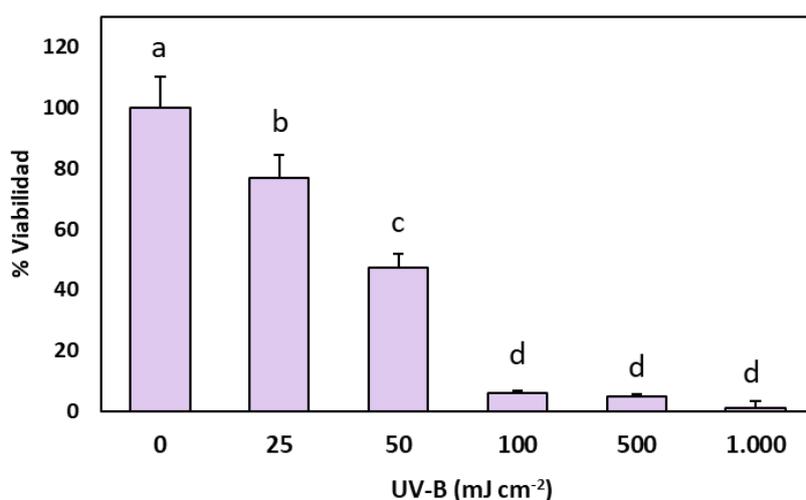


Figura 34. Viabilidad de células HaCaT crecidas en monocapa 24 h después la exposición a diferentes dosis de radiación UV-B. Diferentes letras indican diferencias significativas entre los valores según la prueba de Tukey. Los datos están dados por la media de cuatro réplicas \pm DE. Diferentes letras indican diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ($p < 0,05$).

Se ha determinado que los efectos de muerte celular en células HaCaT inducidos por la radiación UV-B se encuentran mediados por la modulación de la expresión de caspasas entre otros marcadores de estrés y apoptosis. La apoptosis por la luz UV-B parece que está mediada principalmente por la vía intrínseca (o mitocondrial) y la extrínseca, que se caracterizan por una regulación al alza de las caspasas-8 y -9, respectivamente (Park & Jang, 2014). Takasawa et al., (2005) ya determinaron que la dosis de UV-B desde la que empiezan los procesos de apoptosis en queratinocitos HaCaT fue 50 mJ cm^{-2} , a partir de la cual se comenzaron a observar diferencias en la morfología de las células, mostrando éstas una forma redondeada y despegada de la superficie de crecimiento. Esta dosis, a partir de la cual se aprecia apoptosis, coincide con la determinada con Monfrecola et al. (2013) quienes también observaron un descenso de la viabilidad en células HaCaT tratadas con 50, 100 y 150 mJ cm^{-2} . Incluso otros estudios han propuesto como modelo *in vitro* de inflamación, células HaCaT irradiadas con 50 mJ cm^{-2} de luz UV-B puesto que el transcriptoma que presentan es muy similar al que se encuentra en modelos *in vivo* de piel inflamada (Xiao et al., 2021).

3.4 Citotoxicidad de la luz UV-B en queratinocitos pretratados con extractos optimizados obtenidos mediante fluidos supercríticos a partir de subproductos de brócoli

Tras comprobar las concentraciones del extracto SFE-NX ($\leq 10 \text{ } \mu\text{g extracto ml}^{-1}$) y el tiempo de exposición (12 h) que no reducían significativamente la viabilidad celular (Figura 33A), se probó el efecto citoprotector de los extractos SFE-NX en células HaCaT expuestas a la luz UV-B. Para ello, los queratinocitos se sometieron a un pretratamiento con diferentes concentraciones de los extractos SFE-NX, que oscilaron entre 0 y $10 \text{ } \mu\text{g de extracto ml}^{-1}$ durante 12 h y a continuación, se irradiaron con luz UV-B (0, 25 y 50 mJ cm^{-2}), determinándose la viabilidad celular 24 h después de la irradiación. Los efectos de los extractos de SFE-NX sobre la citotoxicidad de la luz UV-B se muestran en la Figura 35. Según el análisis ANOVA, la viabilidad de las células HaCaT se vio significativamente afectada tanto por la irradiación con luz UV-B, como por la concentración de extracto SFE-NX y la interacción entre ambos factores. Así, la viabilidad de las células HaCaT disminuyó significativamente después de la irradiación con luz UV-B con respecto a las células no irradiadas. Tras la exposición a dosis bajas de luz UV-B (25 mJ cm^{-2}), el pretratamiento de los queratinocitos con el extracto SFE-NX incrementó la viabilidad de las células irradiadas de manera dosis-dependiente y no se observaron diferencias significativas con respecto a las células control ($0 \text{ } \mu\text{g de extracto ml}^{-1}$) así como en las células tratadas con quercetina ($p > 0,05$) a $10 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$. Estos resultados sugieren que una alta concentración de extracto SFE-NX ($10 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$) podría tener un efecto citoprotector sobre las células HaCaT

Capítulo II

expuestas a la luz UV-B. Por el contrario, tras la irradiación con altas dosis de luz UV-B (50 mJ cm^{-2}), no se detectaron efectos positivos sobre la viabilidad celular, incluso en presencia de una alta concentración de extracto.

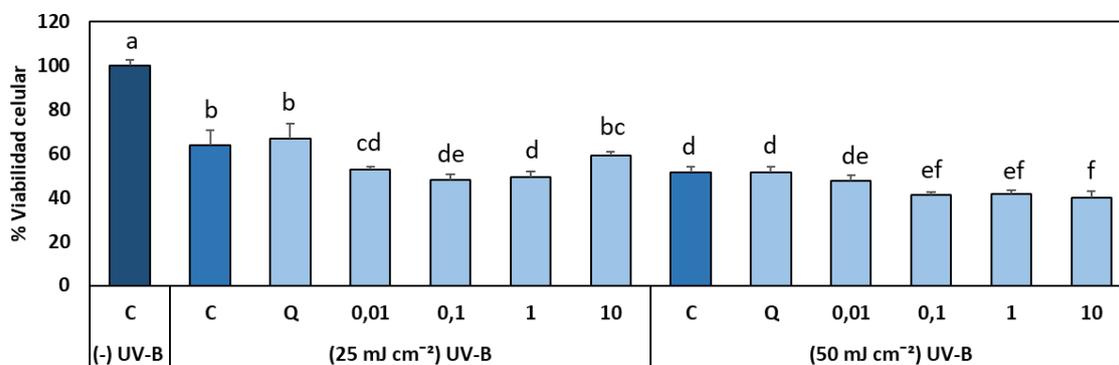


Figura 35. Viabilidad celular de los queratinocitos HaCaT pretratados con diferentes concentraciones de extracto SFE-NX (0,01, 0,1, 1 y $10 \mu\text{g ml}^{-1}$) 24 h después de su exposición a luz UV-B (25 y 50 mJ cm^{-2}). Q: quercetina ($30 \mu\text{g ml}^{-1}$), control positivo. Los datos muestran la media de dos experimentos con cinco réplicas cada uno \pm DE. Diferentes letras indican diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ($p < 0,05$).

Varios estudios han demostrado el efecto protector de los extractos de plantas contra la radiación UV-B. En ese sentido, Shibata et al. (2010) mostraron que el pretratamiento de las células HaCaT con SFN ($1 - 25 \mu\text{M}$), isotiocianato encontrado en vegetales del género *Brassica*, dio lugar a una recuperación de la pérdida de viabilidad inducida por la luz UV-B (50 mJ cm^{-2}) y suprimió la secreción de IL-6, un marcador inflamatorio cuya producción aumenta después de la exposición a este tipo de radiación. Asimismo, estudios realizados por Park et al. (2014) demostraron que los extractos de *Gardenia jasminoides* ($100 \mu\text{g ml}^{-1}$) tuvieron un efecto protector contra la muerte celular inducida por la luz UV-B en células HaCaT expuestas a 10 mJ cm^{-2} , mientras que los extractos de *Phellodendro amurense* y *Rheum rhabarbarum* tuvieron poco o ningún efecto citoprotector, respectivamente, en estas condiciones. Además, Vostálová et al. (2010) evaluaron el potencial de un extracto de *Prunella vulgaris* enriquecido con ácido rosmarínico para suprimir las alteraciones inducidas por la luz UV-B en queratinocitos HaCaT. Estos autores también observaron que el pretratamiento con extractos de *P. vulgaris* producía un efecto protector sobre las células HaCaT irradiadas con luz UV-B. Del mismo modo, Zaid et al. (2007) demostraron que el pretratamiento de este tipo de células con extractos de fruta de granada ricos en polifenoles ($10-40 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) inhibió la reducción de la viabilidad celular mediada por la luz UV-B ($15-30 \text{ mJ cm}^{-2}$) mediante el aumento del contenido intracelular de glutatión y disminuyendo tanto la peroxidación lipídica como los marcadores de fotoenvejecimiento, protegiendo así las células HaCaT del estrés oxidativo inducido por luz UV-B. Calò & Marabini

(2014) también demostraron que los extractos enriquecidos en polifenoles y antocianinas de *Vaccinium myrtillus* fueron capaces de reducir la citotoxicidad y genotoxicidad inducidas por dosis más bajas de radiación UV-B (32–64 mJ cm⁻²).

4. Aplicaciones cosméticas de los extractos en células de queratinocitos

4.1 Efecto de los extractos de subproductos de brócoli sobre la producción intracelular de ROS en queratinocitos HaCaT expuestos a UV-B

Los rayos UV-B absorbidos por las células epidérmicas causan daños en el ADN, aumentan el estrés oxidativo, las ROS y conducen al envejecimiento prematuro de la piel (Ansary et al., 2021). Las ROS son consideradas como uno de los indicadores más estudiados y descritos del estrés oxidativo en células humanas (Piechowiak et al., 2021). Así, la generación de ROS inducida por la radiación UV juega un papel muy importante en el envejecimiento de la piel, la inflamación y la foto carcinogénesis ya que la producción excesiva de ROS puede romper el equilibrio celular prooxidante/antioxidante y provocar estrés oxidativo en los queratinocitos y los fibroblastos de la piel (Song & Gao., 2014; Oh et al., 2019). Asimismo, las ROS inducen la apoptosis en los queratinocitos humanos para proteger contra los daños irreversibles en el ADN, previniendo la acumulación de células anormales, que pueden provocar tumores malignos en la piel. Los efectos nocivos de las ROS en la piel generalmente son anulados por el mecanismo de defensa antioxidante del cuerpo que consiste en la activación de enzimas antioxidantes y de moléculas depuradoras de radicales libres.

Numerosos estudios han demostrado que los extractos de plantas con propiedades antioxidantes pueden atenuar la generación de ROS reduciendo el fotoenvejecimiento y la fotocarcinogénesis de la piel inducidos por los rayos UV (Simitzis, 2018). Por ello, dado que la mayor parte del daño de la piel que se produce por la radiación UV-B prolongada está asociada con ROS y la inflamación relacionada con ROS, se evaluó el posible efecto citoprotector del extracto SFE-NX sobre el estrés oxidativo inducido por la luz UV-B con el fin de elucidar los mecanismos de protección subyacentes en las células HaCaT. Para ello, en primer lugar, se evaluaron los niveles de ROS intracelulares utilizando una sonda fluorescente DHCF-DA. Los

valores de fluorescencia obtenidos tras la exposición de la monocapa de células HaCaT a luz UV-B (50 mJ cm⁻²) con o sin pretratamiento con los extractos SFE-NX se muestran en la Figura 36.

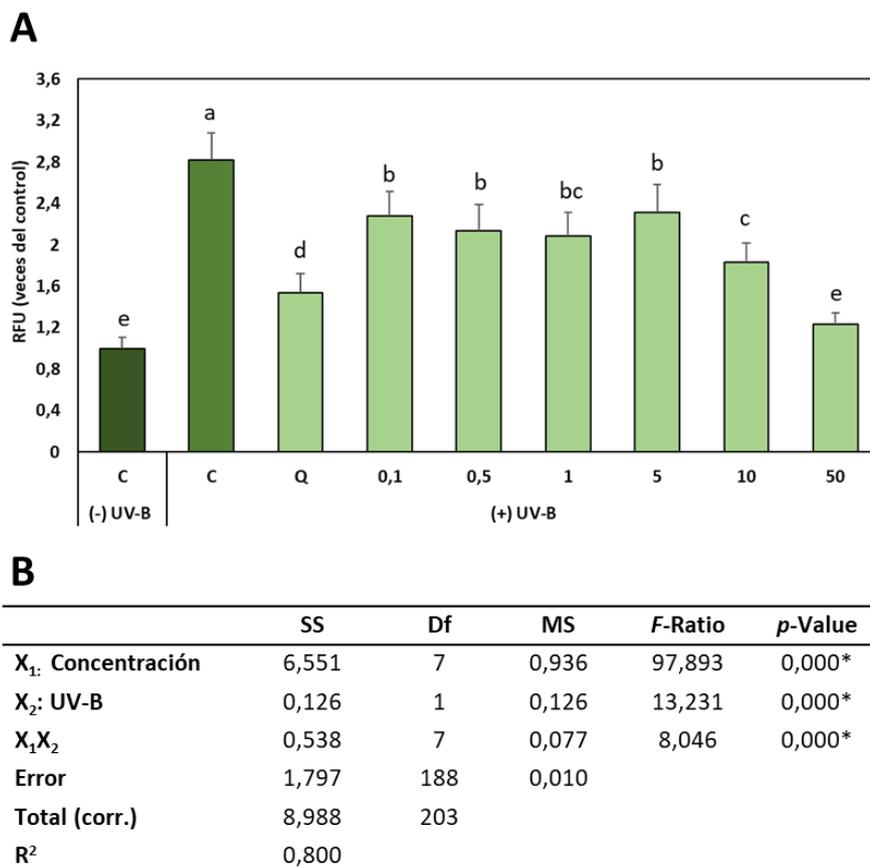


Figura 36. (A) Unidades relativas de fluorescencia (veces del control) de las células HaCaT debido a las especies reactivas de oxígeno (ROS) producidas en ausencia y presencia de radiación ultravioleta B a 50 mJ cm⁻² sometidas o no a un pretratamiento durante 24 h con los extractos. Los datos están dados como la media de dos experimentos con seis réplicas cada uno ± DE. Diferentes letras indican diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ($p < 0,05$). (B) Análisis de varianza ANOVA de la concentración de los extractos y la presencia o no de luz UV-B sobre las unidades relativas de fluorescencia (RFU). *Coeficientes significativos ($p < 0,001$). SS, suma de cuadrados; Df, grados de libertad; MS, media cuadrada; R², coeficiente de correlación cuadrática.

Los resultados mostrados por el análisis ANOVA (Figura 36B) indicaron que tanto la concentración de los extractos como la exposición a la radiación UV-B (50 mJ cm⁻²) individualmente o en combinación fueron capaces de afectar de manera significativa a los niveles intracelulares de ROS (p -value = 0,000). De esta forma, como muestra la Figura 36A, la exposición a la luz UV-B (50 mJ cm⁻²) aumentó significativamente la generación de ROS siendo del orden de 2,8 veces mayor con respecto a las células no irradiadas. Sin embargo, en células irradiadas con luz UV-B, el pretratamiento con el extracto SFE-NX redujo significativamente la generación intracelular de ROS a todas las concentraciones ensayadas (entre 0,1 y 50 µg ml⁻¹), observándose la mayor reducción en los niveles intracelulares de ROS tras el pretratamiento de las células HaCaT con 50 µg ml⁻¹ de extracto y expuestas a la luz UV-B. En estas condiciones, se

alcanzaron los niveles basales de ROS de las células control, es decir, aquellas células no expuestas a la radiación UV ni a los extractos, siendo incluso este efecto mayor que en células pretratadas con quercetina, indicando que el extracto SFE-NX actúa como un sequestrador de radicales libres.

Resultados similares fueron obtenidos por Jaisin et al. (2020), quienes consiguieron observar un aumento significativo de los niveles de ROS, hasta 1,6 veces más que el control, en células HaCaT expuestas a 40 mJ cm^{-2} de radiación UV-B, siendo capaces de revertir el efecto de la luz UV hasta niveles del control, cuando las células fueron tratadas con piperina. Otros compuestos antioxidantes como la afzelina o la fisetina también demostraron tener el mismo efecto reductor en la generación de ROS, de manera dosis-dependiente, en células expuestas a luz UV-B (20 mJ cm^{-2}) y a peróxido de hidrógeno, respectivamente (Shin et al., 2013; Seo & Jeong, 2015).

4.2 Efecto de los extractos de subproductos de brócoli sobre la expresión de genes relacionados con la inflamación en queratinocitos HaCaT expuestos a luz UV-B

La respuesta aguda de la piel frente a la exposición a la radiación UV es la inflamación, como eritema y edema, y el daño mitocondrial y del ADN causado por ROS (Park et al., 2018). Las ROS son un subproducto del metabolismo del oxígeno y está involucrado en muchas funciones fisiológicas, como la señalización celular, la activación de mecanismos de defensa frente a patógenos y la proliferación celular. Sin embargo, la exposición de la piel a los rayos UV puede producir mayores cantidades de ROS, lo que provoca un desequilibrio entre la producción de estas y los mecanismos de defensa antioxidantes, generando un estrés oxidativo. Este estrés oxidativo puede aumentar a su vez la producción de ROS iniciándose tanto la inflamación como la activación de citoquinas proinflamatorias como la interleucina-2 (IL-2), la interleucina-6 (IL-6) y el factor de necrosis tumoral (TNF- α), que involucran múltiples vías, incluido el del factor nuclear kappa B activado (NF- κ B), entre otros (Kammeyer & Luiten, 2015; Ansary et al., 2021). Todos estos compuestos generados durante la inflamación actúan como oxidantes y promueven a su vez la aparición de ROS, por lo que incrementan el estrés oxidativo convirtiéndose en una especie de círculo vicioso. Además, todo en conjunto, juega un papel importante en la aparición de cáncer de piel puesto que es capaz de transformar una queratosis solar benigna en un carcinoma de células escamosas puesto que incrementaría el daño oxidativo al ADN (Nishigori et al., 2004; Svobodova et al., 2006).

Con la finalidad de evaluar si el pretratamiento con extractos procedentes de subproductos de brócoli era capaz de reducir el estrés oxidativo causado por la exposición a la luz UV-B en las

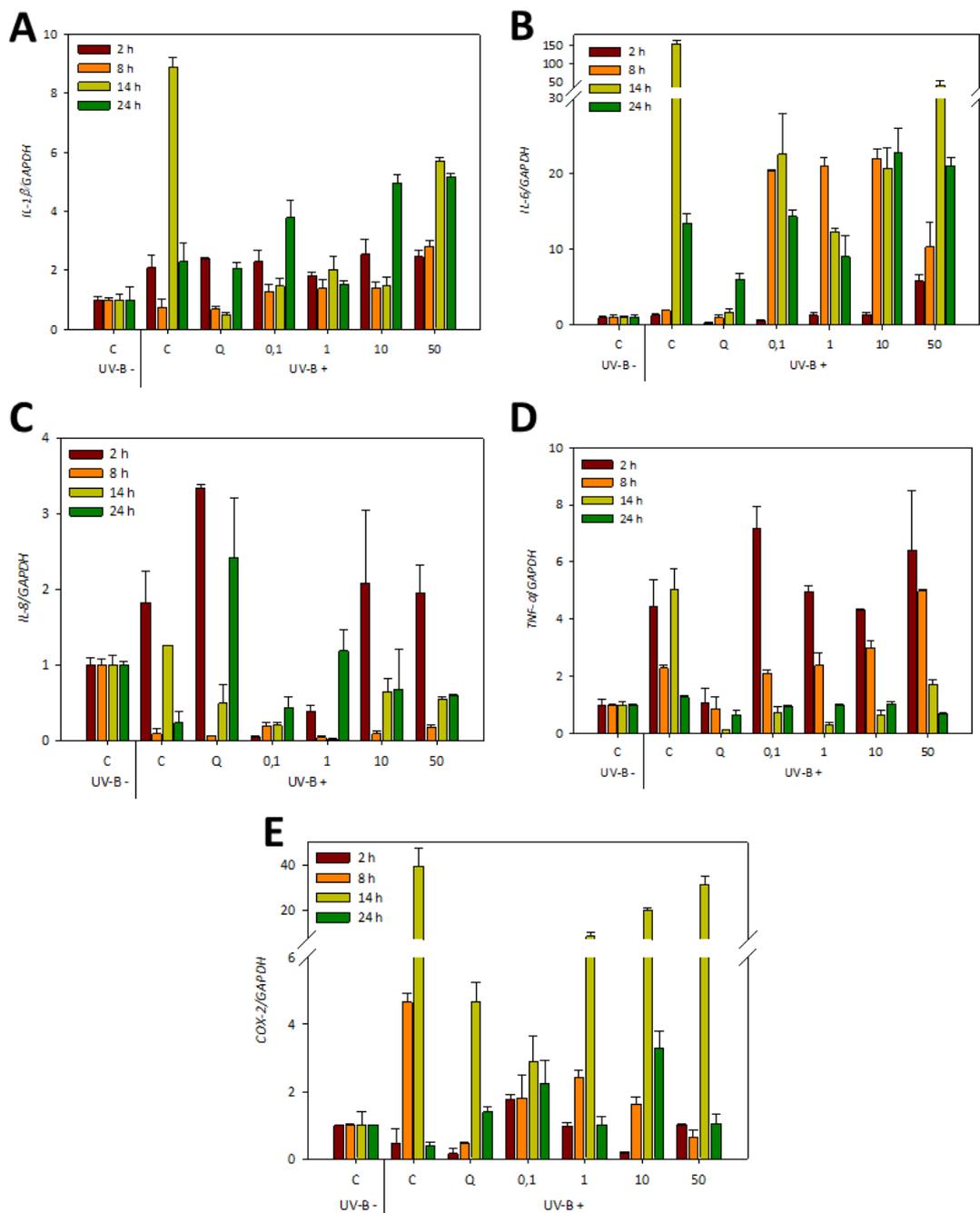
Capítulo II

células HaCaT, se determinaron los perfiles de transcripción de algunos genes que codifican para diferentes citoquinas proinflamatorias (*IL-1 β* , *IL-6*, *IL-8*, *TNF- α* y *COX-2*) mediante qRT-PCR. El efecto de diferentes concentraciones de los extractos SFE-NX sobre la expresión de mediadores inflamatorios inducidos por la luz UV-B en las células HaCaT se muestra en la Figura 37. El análisis ANOVA reveló que tanto el tiempo como la concentración de los extractos SFE-NX y la radiación UV-B afectaron de manera significativa a la expresión de los genes *IL-1 β* (Figura 37A), *IL-6* (Figura 37B), *TNF- α* (Figura 37D) y *COX-2* (Figura 37E). Sin embargo, la irradiación con UV-B no afectó a la expresión del gen *IL-8* (Figura 37C) (valor de $p = 0,224$) aunque la expresión de este gen sí que se vio estadísticamente afectada por el tiempo y la concentración de extracto empleada. Además, la interacción de los diferentes factores (tiempo x concentración de los extractos y tiempo x radiación UV-B) también mostraron tener efectos significativos en el perfil de expresión de todos los genes estudiados (valor de $p = 0,000$).

En cuanto al análisis del perfil de expresión del gen *IL-1 β* (Figura 37A), se observó claramente un aumento significativo en la acumulación de transcritos tras la exposición a la luz UV-B, tanto en células no tratadas como en las tratadas con las diferentes concentraciones de extracto SFE-NX. Así, tras la exposición de los queratinocitos a la luz UV-B, el máximo nivel de expresión del gen *IL-1 β* se alcanzó tras 14 h desde la irradiación, momento en el que la acumulación de transcritos resulto ser del 9 veces superior al control sin irradiar a ese tiempo. Teniendo en cuenta el tiempo de máxima expresión del gen *IL-1 β* tras la exposición a la luz UV-B (14 h), se puede observar, que el pretratamiento con concentraciones de extracto $\leq 50 \mu\text{g ml}^{-1}$ redujo significativamente la expresión de este gen siendo ésta del orden de 6 veces inferior con respecto al tratamiento control (expuestas solo a la luz UV) y ligeramente superior al efecto observado tras el pretratamiento con quercetina a ese tiempo. Además, la mayor concentración de extracto empleada ($50 \mu\text{g ml}^{-1}$) produjo un incremento significativo en el nivel de expresión del gen *IL-1 β* tras 14 h de exposición a la luz UV, pero ese incremento fue incluso menor que el observado tras la exposición a la luz UV en ausencia de extracto.

Del mismo modo, se analizó el perfil de expresión del gen correspondiente a la citoquina proinflamatoria *IL-6* (Figura 37B). Al igual que ocurría con la expresión el gen *IL-1 β* , el tratamiento con luz UV-B incremento considerablemente el nivel de expresión tras 14 h desde la irradiación alcanzándose en ese punto una acumulación de transcritos del orden de 150 veces superior a las células no irradiadas. También a ese tiempo, la expresión del gen *IL-6* disminuyó significativamente tras el pretratamiento con las diferentes concentraciones de extracto siendo este descenso más acusado tras el pretratamiento con $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ de extracto, cuya acumulación

de transcritos fue 12,5 veces inferior al de queratinocitos expuestos solo a la luz UV, aunque en ningún caso se llegó a alcanzar el nivel de protección inducido por la quercetina.



	F-Ratio				
	<i>IL-1β</i>	<i>IL-6</i>	<i>IL-8</i>	<i>TNF-α</i>	<i>COX-2</i>
X₁: Tiempo	51,708***	28,848***	34,396***	98,446***	72,642***
X₂: UV-B	391,607***	1057,147***	1,509	117,547***	218,891***
X₃: Concentración	132,477***	224,983***	30,948***	46,347***	61,231***
X₁X₂	211,052***	843,546***	12,183***	18,242***	186,809***
X₁X₃	100,136***	261,855***	16,453***	22,337***	59,990***

Figura 37. Variación de la expresión relativa (veces del control) de los genes que codifican para citoquinas proinflamatorias *IL-1β* (A) *IL-6* (B), *IL-8* (C), *TNF-α* (D) y *COX-2* (E) en células HaCaT pretratadas con diferentes concentraciones de extracto SFE-NX (0,1, 1, 10 y 50 μg extracto ml^{-1}) tras 2, 8, 14 Y 24 h desde

Capítulo II

la exposición a 50 mJ cm^{-2} de luz UV-B. Q: quercetina $30 \mu\text{g ml}^{-1}$. Los valores muestran la media \pm DE de tres réplicas independientes. El control UV-B (-) con valor de referencia = 1 se utilizó para normalizar los niveles de expresión relativos de cada gen. Los niveles de transcritos se calcularon usando el gen GAPDH como control interno). Valores F de ANOVA de dos vías significativos al 99,9 % (***)).

Asimismo, evaluamos la capacidad del extracto SFE-NX para modular la expresión génica de *TNF- α* en células HaCaT después de la irradiación con UV-B (Figura 37D). Al igual que en los casos anteriores, la expresión del gen *TNF- α* también aumentó después de la irradiación de los queratinocitos con luz UV-B observándose dos picos máximos de expresión a las 2 y 14 h después de la irradiación. Así, tras las primeras 2 h se observó un aumento de hasta 4,45 veces la expresión en las células irradiadas con respecto a las no expuestas a la luz UV. Este aumento se mantuvo en los queratinocitos pretratados con los extractos SFE-NX e irradiados con luz UV-B, pero no ocurrió así en las células con quercetina, la cual presentó una mayor efectividad en revertir la inducción de la expresión del gen *TNF- α* tras la exposición a la luz UV, alcanzando valores de expresión similares a las células sin tratar. Sin embargo, tras 14 h desde la exposición a la luz UV, el aumento en 5 veces en la expresión del ARNm de *TNF- α* inducido por la luz UV-B fue fuertemente regulado de manera negativa por el extracto SFE-NX a cualquier concentración, y casi restablecido por completo tras el pretratamiento con el extracto manteniéndose ese efecto hasta las 24 h. El *TNF- α* está involucrado en el inicio y la promoción de la vía inflamatoria posterior a la exposición a luz UV-B: ejerce efectos pleiotrópicos, incluida la modulación de las moléculas de adhesión celular, la promoción de la apoptosis y la activación de los linfocitos (Bashir et al., 2009). Por lo tanto, el pretratamiento con extracto SFE-NX, incluso a baja concentración, es suficiente para revertir el estado inflamatorio ya establecido.

Finalmente, se llevó a cabo el estudio del perfil de expresión del gen que codifica para la ciclooxigenasa COX-2 (Figura 37E). Como se observa en la Figura 37, la exposición de los queratinocitos a la luz UV-B incrementó significativamente la expresión de esta citoquina, produciéndose la mayor acumulación de transcritos, tras 8 y 14 h después de la irradiación. En esos tiempos, los niveles de expresión del gen *COX-2* fueron del orden de 4,6 y 39 veces superiores a las células no expuestas a la luz UV-B, indicando claramente una respuesta inflamatoria después de la irradiación de UV-B en las células HaCaT. El aumento en la expresión del gen *COX-2* observado tras 8 h desde exposición a la luz UV fue significativamente revertido tras el pretratamiento con el extracto SFE-NX a todas las concentraciones ensayadas, observándose el mayor efecto cuando se aplicó a una concentración de $50 \mu\text{g ml}^{-1}$, mostrando además un efecto similar al obtenido tras el pretratamiento con quercetina cuyo niveles de expresión se redujeron en torno a 9 veces con respecto a las células control (expuestas a la luz

UV-B en ausencia de pretratamiento). Por el contrario, tras 14 h desde la irradiación, el efecto inflamatorio inducido por la luz UV-B solo fue parcialmente revertido con el pretratamiento con los extractos SFE-NX ya que se observó un aumento del nivel de expresión de *COX-2* conforme se incrementaba la concentración de extracto, siendo en este caso la concentración de 0,1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ la que mostró una mayor eficacia frente el estrés causado por la luz UV, reduciéndose la expresión en torno a 1,64 y 14 veces con respecto a las células pretratadas con quercetina y células control, respectivamente.

Los resultados obtenidos han demostrado que la radiación UV-B (50 mJ cm^{-2}) es capaz de afectar de manera significativa a la regulación de los genes que codifican para las citoquinas proinflamatorias estudiadas a excepción de la IL-8. Esto contrasta con otros estudios llevados a cabo en los que la irradiación de células HaCaT con luz UV-B (con dosis que oscilaron entre los 5 y 100 mJ cm^{-2}) sí que produjo un efecto positivo sobre la regulación del gen de esta citoquina (Monfrecola et al., 2013; Lembo et al., 2014; Jaisin et al., 2020; Lee et al., 2020). Esto puede deberse a que el perfil de expresión y secreción de citoquinas sea dependiente tanto de la dosis administrada de radiación UV como de otras condiciones variables a la hora de llevar a cabo los ensayos, como el tipo de células, número de pases, tiempo en cultivo, etc. (Li et al., 2015).

Por otro lado, existen numerosos estudios llevados a cabo para la búsqueda tanto de compuestos puros como de extractos vegetales complejos que posean potencial para atenuar la expresión de estos marcadores de inflamación en células de piel expuestas a radiación UV-B. Algunos ejemplos son: la piperina (un alcaloide con propiedades antioxidantes que se encuentra en la pimienta), que ha demostrado su eficacia para disminuir la expresión de IL-6 e IL-8, además de inhibir la síntesis de *COX-2*/prostaglandinas (PGE2) (Jaisin et al., 2020); la fisetina también fue capaz de inhibir la producción de óxido nítrico (NO), PGE2, IL-1 β , IL-6, así como la expresión de iNOS y *COX-2* y la activación de NF- κ B en células HaCaT, en este caso, tratadas con TNF- α (Seo & Jeong, 2015); flavonoides como la afzelina también mostraron capacidad para inhibir la peroxidación lipídica y las ciclooxigenasas (*COX-1* y *COX-2*) inducidas por UV-B, además de ser capaces de reducir la expresión de *IL-6* y *TNF- α* en las mismas células (Shin et al., 2013). Otros compuestos como el ácido rosmarínico también han mostrado poseer efecto protector llegando a reducir de manera significativa la expresión de *IL-6*, *IL-8*, *MCP-1* y *TNF- α* (Lembo et al., 2014); la curcumina también fue capaz de regular negativamente la expresión de citoquinas proinflamatorias como la IL-1 β , IL-6 y TNF- α (Cho et al., 2007) o la nicotinamida (la forma amida de la vitamina B3, presente en el brócoli) que fue capaz de revertir el aumento de la expresión de *IL-6* y *TNF- α* en queratinocitos expuestos a UV-B (Monfrecola et al., 2013). Asimismo,

también se ha investigado el uso de extractos vegetales ricos en compuestos con actividad antioxidante para su uso como agentes terapéuticos capaces de paliar los procesos inflamatorios de la piel. Así, estudios realizados por Engel et al. (2007) demostraron que el tratamiento tópico con extractos de *Usnea barbata* (un líquen) en afecciones inflamatorias de la piel provocadas por radiación UV-B podría resultar beneficioso, ya que su uso sobre queratinocitos HaCaT provocó la disminución de PGE₂, así como de la proteína COX-2. Asimismo, el uso de extractos etanólicos de *Sanguisorba officinalis* L. en queratinocitos redujo la expresión de IL-8 tanto a nivel de proteína como de ARNm (Yang et al., 2015); o los extractos de granada ricos en elagitaninos, los cuales fueron capaces de inhibir la producción de radicales libres en la piel y de disminuir la expresión de COX-2, protegiéndola de los daños al ADN y disminuyendo así el riesgo de padecer cáncer de piel (Ismail et al., 2016). El extracto de *Laminaria japonica* fue capaz de disminuir la expresión de COX-2, de la metaloproteinasa-9 (MMP-9) y de PGE₂, así como de las citoquinas IL-8 y de TNF- α , inducidas por la radiación UV-B (Lee et al., 2020). También extractos de hoja de higuera (ricos en polifenoles y compuestos antioxidantes) fueron capaces de reducir los niveles de expresión de genes relacionados con la inflamación como TNF- α (Turkoglu et al., 2017). Incluso, existen estudios clínicos que han probado el efecto beneficioso de compuestos cuantificados en nuestros extractos, como el caso del dl- α -tocoferol, que poseen efectos fotoprotectores frente al daño causado por la radiación UV-B (Lin et al., 2008; Murray et al., 2008) o la aplicación tópica de un aceite esencial de hojas de *Curcuma longa* que logró inhibir el edema, además de reducir la producción de TNF- α , IL-6 e IL-1 β , en ratón (Kumar et al., 2018), al igual que ocurrió con un extracto rico en flavonoides de *Sophora flavescens* (Ma et al., 2018).

De conformidad con todos estos resultados podemos indicar que el uso tópico de extractos ricos en compuestos bioactivos con capacidad antioxidante puede ser beneficioso para el tratamiento de trastornos inflamatorios de la piel como los producidos por la exposición a la luz UV-B. En conjunto, estos estudios indican que los extractos de plantas ricos en polifenoles y compuestos antioxidantes, como lo son los extractos obtenidos a partir de subproductos de brócoli mediante SFE, son capaces de atenuar el estrés oxidativo y la inflamación en la piel producida por la luz UV-B. De esta forma, los resultados obtenidos sugieren que el extracto SFE-NX es capaz de prevenir y/o limitar la cascada inflamatoria inducida por la exposición a la luz UV-B, a través de una reducción de mediadores proinflamatorios, por lo que podríamos considerar los extractos de SFE-NX como ingredientes cosméticos naturales prometedores para su uso como protectores de la piel frente a los efectos nocivos producidos por la radiación UV-B.

4.3 Reparación de heridas piel

Los queratinocitos constituyen un tipo de células de la epidermis, es decir, la capa más externa de la piel que actúa como barrera, que están involucrados en eventos de defensa fundamentales, como la formación de la barrera física y la defensa inmunológica. Por lo tanto, mejorar las actividades funcionales relacionadas con la cicatrización de heridas de los queratinocitos ofrece un potencial para promover la reparación del daño de la piel y la función de barrera. En ese sentido, la proliferación y migración de queratinocitos juegan un papel importante para la cicatrización de heridas en la piel (Li et al., 2021).

Numerosas plantas se han utilizado en la medicina tradicional para promover la cicatrización de heridas (Kumar et al, 2013) puesto que, en términos generales, las plantas y sus extractos suelen mostrar menos efectos secundarios que los compuestos de síntesis, además de presentar importantes actividades biológicas. Por tanto, con el fin de evaluar el posible efecto reparador de heridas con los extractos procedentes de los subproductos de brócoli se llevó a cabo un ensayo de migración celular en células HaCaT tratadas con los extractos SFE-NX y PLE-NX. Para ello, las células se pretrataron con diferentes concentraciones de extracto SFE-NX (0,1, 1, 10 y 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$) y PLE-NX (1, 10, 100 y 500 $\mu\text{g ml}^{-1}$) durante 24 h y tras este tiempo, se le realizó a cada monocapa de células una herida en línea recta utilizando un agente punzante estéril, y se mantuvieron en incubación durante 48 h tomando fotografías a las 6, 24 y 48 h para determinar la longitud del cierre de la herida (mm) (Figura 38). Además, se utilizó quercetina como control positivo a una concentración de 30 $\mu\text{g ml}^{-1}$.

4.3.1 *Uso de los extractos SFE como reparador de heridas*

Los resultados arrojados tras el análisis de la cicatrización en queratinocitos pretratados con diferentes concentraciones de extracto SFE-NX (Figura 38) mostraron que, a medida que se incrementaba la concentración de extracto, el proceso de cicatrización de la herida fue más evidente, observándose tras el pretratamiento con 50 $\mu\text{g extracto ml}^{-1}$ y 48 h desde la realización de la herida, una cicatrización total de la misma. Además, el proceso de cicatrización se produjo más rápidamente que en los queratinocitos tratados con quercetina (control positivo). Estos datos se corroboraron tras la determinación del porcentaje de curación (Figura 39A) en el cual se observó que todas las concentraciones de extracto SFE-NX utilizadas dieron lugar a áreas de cierre de heridas estadísticamente significativas más altas que las células no tratadas, siendo de nuevo ese efecto de cicatrización de la herida más evidente a las 48 h desde la realización de la herida.

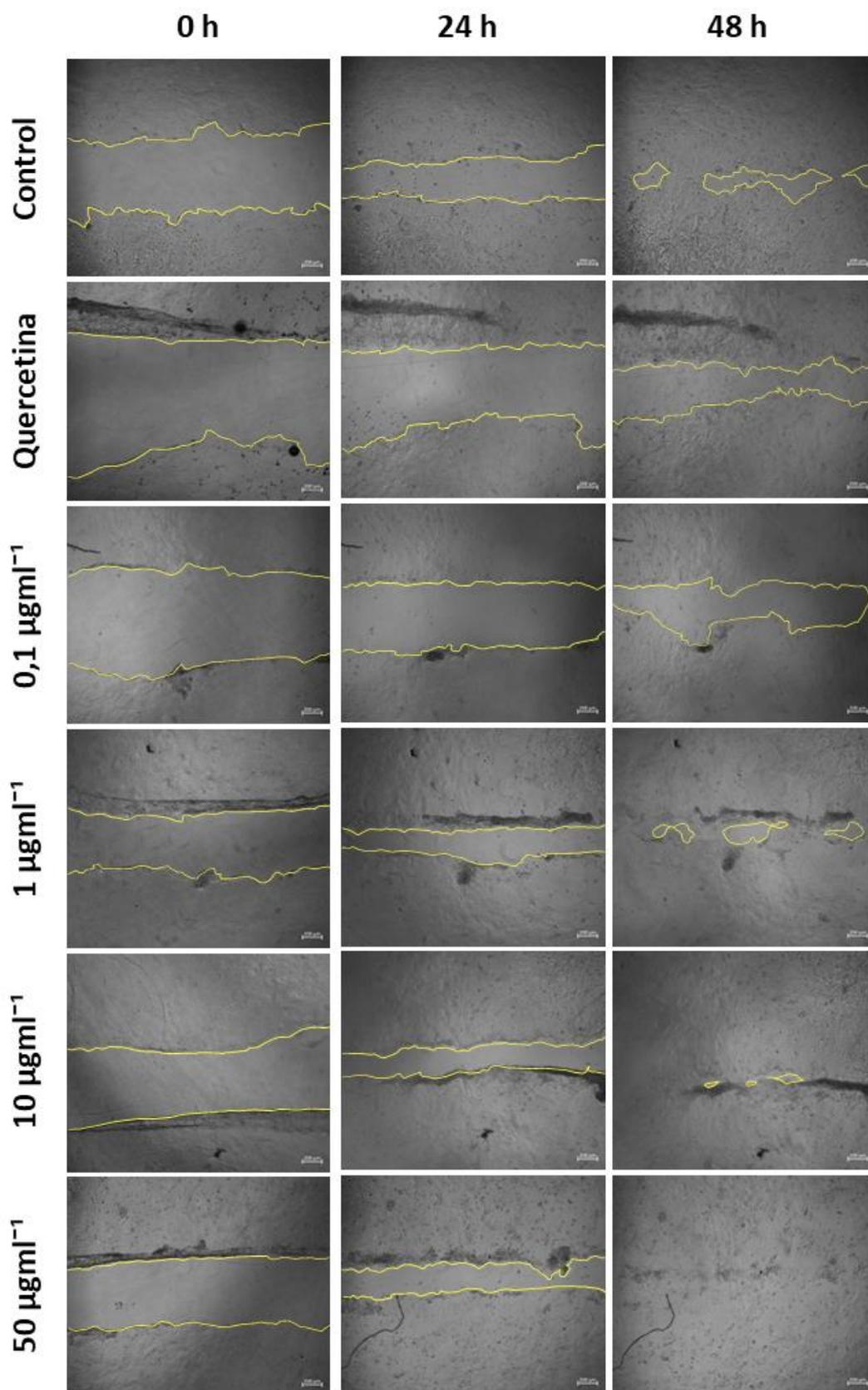


Figura 38. Imágenes tomadas a diferentes tiempos (0, 24 y 48 h) tras la realización de las heridas con un pretratamiento durante 24 h de los extractos SFE-NX. Quercetina ($30 \mu\text{g ml}^{-1}$).

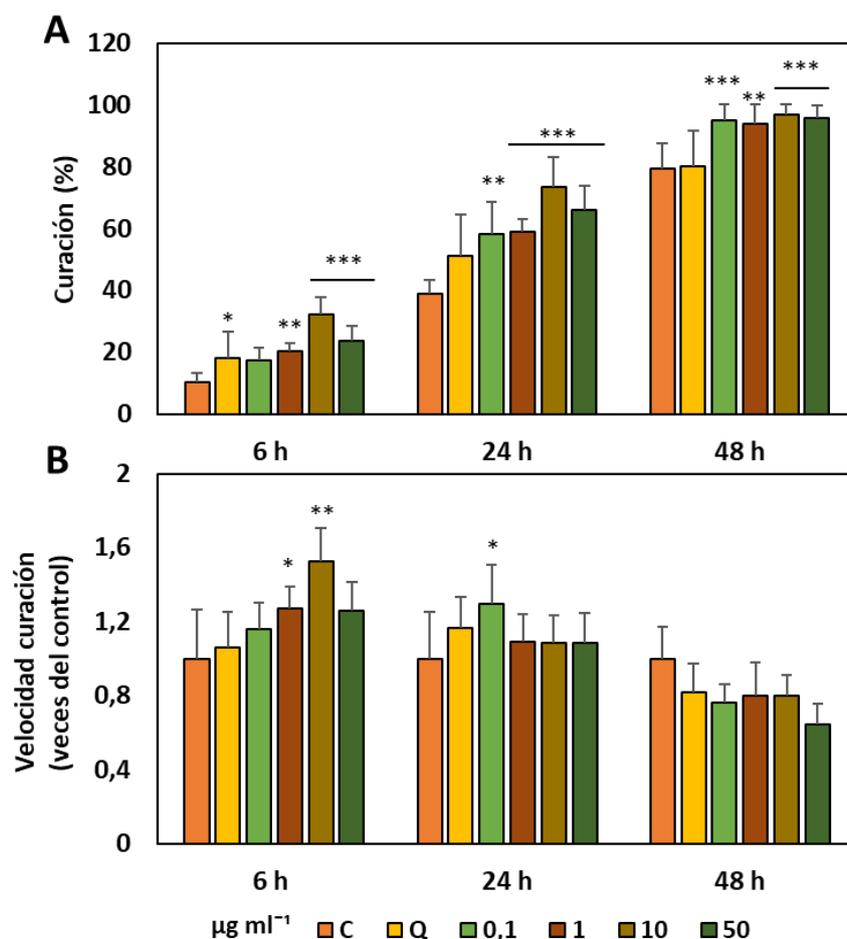


Figura 39. Porcentaje de curación de la herida tras 6, 24 y 48 h con un pretratamiento de 24 h con los extractos SFE-NX antes de la herida (A). Velocidad de migración (veces del control) de las células HaCaT tras 6, 24 y 48 h con un pretratamiento de 24 h con los extractos SFE-NX antes de la herida (B). C, control con medio de cultivo; Q, quercetina (30 µg ml⁻¹). Los datos vienen expresados como la media dos ensayos con cuatro réplicas ± DE. * Coeficientes significativos (* *p*-value<0,05; ** *p*-value<0,01 y *** *p*-value<0,001).

Tras este tiempo, las células control mostraron un porcentaje de curación de alrededor del 79 %, muy similar al presentado por las células expuestas a quercetina, que cerraron la herida en un 80 %. Sin embargo, todas las concentraciones del extracto SFE-NX usadas presentaron un porcentaje de cierre de curación cercano al 100 %, siendo los porcentajes de 95, 94, 96 y 96 %, para las concentraciones de 0,1, 1, 10 y 50 µg ml⁻¹, respectivamente. Como era de esperar, la velocidad de migración de las células (Figura 39B) fue mayor tras 6 h desde la realización de la herida debido a que en ese momento las células se encontraban en fase de crecimiento activo, observándose a ese tiempo, una mayor velocidad de curación de las células tratadas con concentraciones < 1 µg ml⁻¹ con respecto a las células control y aquellas tratadas con quercetina. A la vista de esto resultados, los extractos enriquecidos en compuestos bioactivos obtenidos mediante SFE procedentes de los subproductos de brócoli podrían ser un excelente agente terapéutico potencial para la cicatrización de heridas en la piel.

Capítulo II

En este sentido, numerosos extractos vegetales ricos en compuestos bioactivos han sido estudiados para comprobar su eficacia en la reparación de heridas. Algunos de ellos como los extractos de la flor de *Smilax china*, una planta trepadora originaria de Asia y que comparte con los extractos de brócoli obtenidos por SFE algunos compuestos como el ácido hexadecanoico, el ácido (9 Z, 12 Z, 15 Z)-octadeca-9,12,15-trienoico o el β -sitosterol. La aplicación de estos extractos incrementó la tasa de migración de células HaCaT de manera dependiente de la dosis, además de aumentar de manera significativa la síntesis de colágeno de tipo I y IV, implicados en la reparación de la piel y en la formación de las membranas, respectivamente (Li et al., 2021). Otros extractos obtenidos de tallo de *Alternanthera sessilis*, una planta suculenta, también ricos en ácido hexadecanoico y fitol, mostraron el mismo efecto. Así, tras la exposición de los queratinocitos a $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ de los extractos se observó un aumento de hasta un 209% en la tasa de migración celular en comparación con las células control (Muniandy et al., 2018).

Con respecto a ensayos obtenidos usando extractos de brócoli, los investigadores Nicolas-Espinosa et al. (2022) obtuvieron resultados similares, demostrando un aumento en el porcentaje del cierre de la herida en presencia de los extractos. Además, en esta investigación también se estudió el perfil de expresión de genes implicados en la proliferación celular, la apoptosis y los procesos inflamatorios tras la aplicación de extractos. Los resultados indicaron que la exposición de los queratinocitos a extractos de tallo de brócoli se tradujo en una sobreexpresión de genes de respuesta inflamatoria y de moléculas promotoras del crecimiento celular relacionadas con la proliferación celular y la reparación de heridas. También se ha probado que homólogos al ácido lisofosfatídico, presentes en crucíferas como hojas de col o floretes de brócoli, son capaces de inducir la proliferación y la motilidad celular en células de tipo epitelial de intestino (HGC-27) lo que podría considerarse de especial interés para la curación de úlceras gástricas (Tanaka et al., 2009).

Todos los resultados anteriores sobre cicatrización de heridas provocadas en cultivos celulares han sido complementados con estudios sobre el efecto hemostático de extractos de brócoli en ratones (Sammulia et al., 2020). Para ello, los ratones se alimentaron con los extractos de brócoli (ricos en compuestos como alcaloides, saponinas, taninos, flavonoides y vitamina K) a diferentes concentraciones, 20, 40 y 60 mg g^{-1} peso corporal. Tras un tiempo, se les realizó una herida y controlaron el tiempo hasta que paró la hemorragia. Los resultados mostraron diferencias significativas en los ratones que habían sido alimentados con 40 y 60 mg g^{-1} de peso, siendo los ratones alimentados con 60 mg g^{-1} los que menor tiempo de sangrado presentaron ($183,00 \pm 18,193 \text{ s}$ en el grupo control frente a los $90,40 \pm 3,845 \text{ s}$ en los alimentados con extractos de

brócoli) (Sammulia et al., 2020). Según estos autores, este hecho podría relacionarse, además de por la presencia de diversos compuestos bioactivos presente en estos vegetales, con el alto contenido en vitamina K del brócoli en comparación con otras verduras según datos de la USDA (USDA, s.f.).

4.3.2 *Uso de los extractos PLE para la cicatrización de heridas*

4.3.2.1 *Citotoxicidad de los extractos obtenidos mediante fluidos presurizados*

Los glucosinolatos son una clase de metabolitos secundarios característicos de las plantas de la familia *Brassicaceae*, los cuales al descomponerse enzimáticamente por acción de la enzima mirosinasa dan lugar a los compuestos biológicamente activos, los isotiocianatos, que son los principales compuestos bioactivos conocidos por su actividad biológica. Así, de sobra es conocido, que la activación metabólica de los glucosinolatos da como resultado la formación de isotiocianatos a los que se les atribuyen los efectos antitumorales, antimicrobianos y antiinflamatorios; sin embargo, se desconocen los efectos sobre la cicatrización de heridas de los glucosinolatos *per se*. Por ello, con el fin de evaluar el posible efecto reparador de heridas del extracto enriquecido en glucosinolatos obtenido mediante PLE a partir de los subproductos del brócoli Naxos (PLE-NX), se realizó un ensayo de cicatrización en las células HaCaT. Asimismo, puesto que no existían ensayos previos acerca del efecto citotóxico de estos extractos sobre las células HaCaT, como paso previo a los ensayos de migración celular, se determinó la toxicidad de diferentes concentraciones del extracto PLE-NX en células HaCaT, con el fin de determinar aquellas concentraciones que no resultasen citotóxicas en los queratinocitos (Figura 40).

Los resultados del análisis ANOVA (Figura 40B) indicaron que tanto la concentración del extracto como el tiempo de exposición a los mismos (valores de $p = 0,000$ y $p = 0,039$, respectivamente) de manera independiente, así como la interacción de ambos factores afectaron significativamente a la viabilidad celular. Como se observa en la Figura 40A, la viabilidad solo se vio significativamente afectada por las concentraciones de extracto PLE-NX más elevadas (500, 1000 y 2000 $\mu\text{g ml}^{-1}$) en todos los tiempos, reduciéndose en estas condiciones la viabilidad en torno a un 16, 23, y 20 % con respecto al control sin tratar, respectivamente.

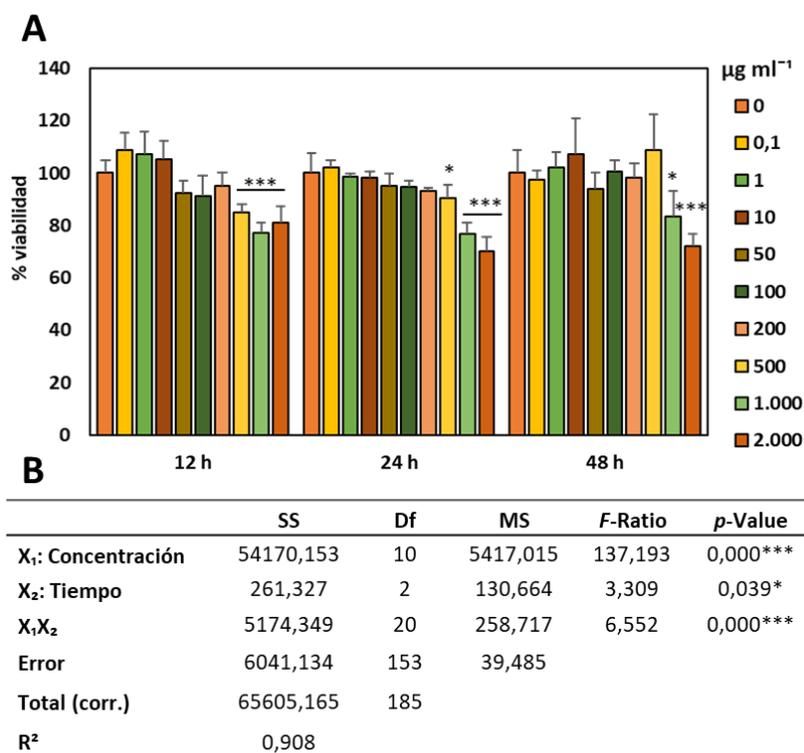


Figura 40. (A) Viabilidad de las células HaCaT tras 12, 24 y 48 h de exposición a los extractos obtenidos mediante fluidos presurizados de Naxos. (B) Análisis de varianza ANOVA de las variables independientes (concentración de los extractos y tiempo de exposición) sobre la viabilidad. *Coeficientes significativos ($p < 0,001$ o $p < 0,05$). SS, suma de cuadrados; Df, grados de libertad; MS, media cuadrada; R², coeficiente de correlación cuadrática

Una vez determinada la concentración de extracto que no afectaba significativamente a la viabilidad celular, se realizó el ensayo de migración para el estudio de la cicatrización de heridas en queratinocitos HaCaT pretratados con diferentes concentraciones de extracto enriquecido en glucosinolatos (Figuras 41y 42). Como se observa en la Figura 41, a medida que se incrementaba la concentración de extracto, el proceso de cicatrización de la herida fue más evidente, aunque en ningún caso se consiguió una cicatrización completa de la herida. Así, en cuanto al porcentaje de curación (Figura 42A), el pretratamiento de las células HaCaT con el extracto PLE enriquecido en glucosinolatos dio lugar a un incremento estadísticamente significativo en el porcentaje de curación de la herida tras 48 h con las concentraciones de 1, 100 y 500 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de extracto usadas, incrementándose este en torno a un 17 % y 30 % en comparación con las células control y tratadas con quercetina, respectivamente. Con respecto a la velocidad de cicatrización (Figura 42B), los resultados obtenidos fueron muy variables observándose únicamente una velocidad significativamente más alta que la del control a las 6 h cuando se usó la concentración de 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ y a las 48 h con la concentración de 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$.

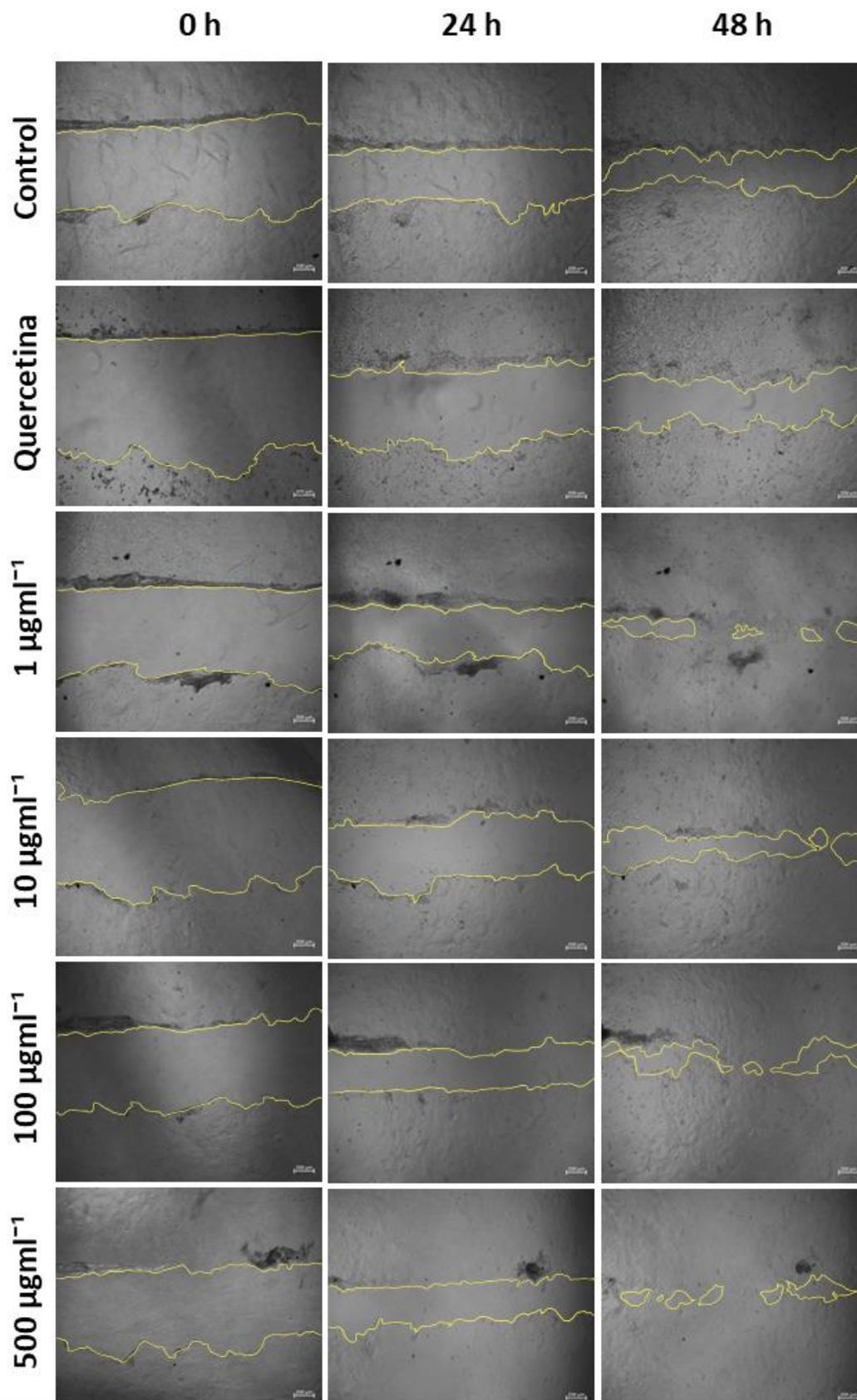


Figura 41. Imágenes tomadas a diferentes tiempos (0, 24 y 48 h) tras la realización de las heridas con un pretratamiento durante 24 h de los extractos PLE-NX

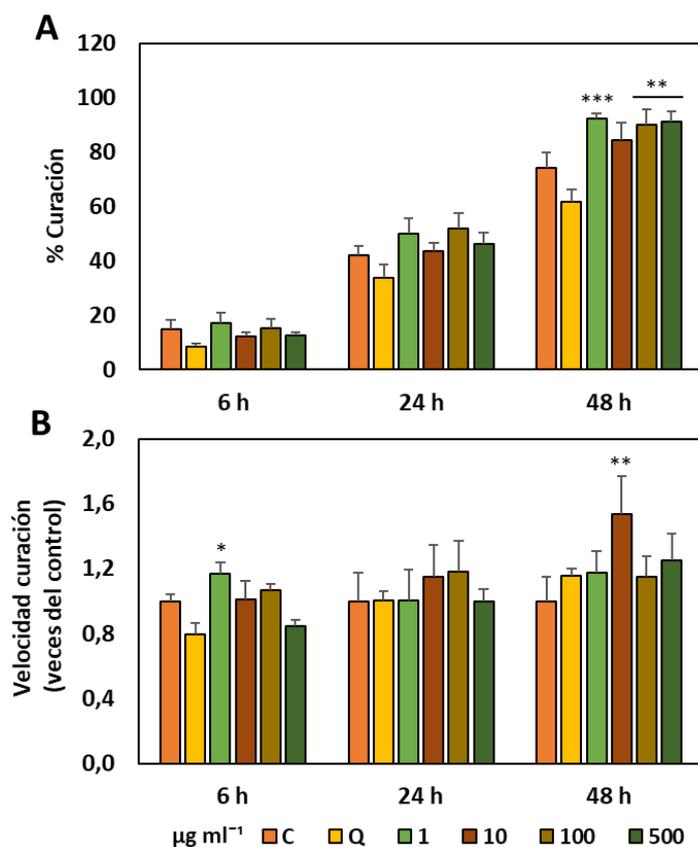


Figura 42. Porcentaje de curación de la herida tras 6, 24 y 48 h con un pretratamiento de 24 h con los extractos PLE-NX antes de la herida (A). Velocidad de migración (veces del control) de las células HaCaT tras 6, 24 y 48 h con un pretratamiento de 24 h con los extractos PLE-NX antes de la herida (B). C, control con medio de cultivo; Q, quercetina (30 µg ml⁻¹). Los datos vienen expresados como la media dos ensayos con cuatro réplicas ± DE. * Coeficientes significativos (* *p*-value<0,05; ** *p*-value<0,01; *** *p*-value<0,001).

Las propiedades de cicatrización de heridas de los glucosinolatos en cultivos de células HaCaT ya han sido estudiadas previamente. Mazumder et al., (2016) evaluaron el efecto de la sinigrina (glucosinolato alifático) sola o formulada en un complejo sinigrina-fitosoma (un sistema de encapsulado vesicular) sobre el proceso de cicatrización en células HaCaT. Los resultados obtenidos mostraron que después de 42 h, el complejo sinigrina-fitosoma curó completamente la herida, mientras que la sinigrina sola mostró solo un 71 % de cierre de la herida, aumentando tanto la cicatrización como la velocidad de migración celular de las mismas. Asimismo, estudios clínicos realizados en ratones deficientes del gen de la queratina 14 (usados como modelos para el estudio de ciertas afecciones de la piel) han demostrado que el SFN es capaz de inducir la expresión de genes que codifican la queratina 17, homóloga a la 14. De esta forma, la aplicación de SFN restauró la integridad de la piel de estos ratones reduciendo las ampollas que presentaban, sugiriendo que los glucosinolatos y sus productos de hidrólisis presentan propiedades beneficiosas para su uso como agentes tópicos en la reparación de la piel (Kerns et al., 2007).

Capítulo 3: Revalorización de los subproductos del
brócoli como ingredientes de la industria
nutracéutica

1. Antecedentes y objetivos

Actualmente predominan las dietas occidentales ricas en grasas y colesterol, las cuales se consideran responsables en gran parte de la obesidad y de síndromes metabólicos y que además, han demostrado aumentar la permeabilidad de la barrera intestinal (Ghosh et al., 2020). Dada la elevada incidencia de estas patologías en la población, una de las afecciones más destacadas hoy en día es la enfermedad inflamatoria intestinal (EII) que se trata de una enfermedad crónica caracterizada por la inflamación de la mucosa del tracto intestinal (Angel-Morales et al., 2012). Esta dolencia comprende principalmente dos afecciones: la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa, ambas caracterizadas por una inflamación gastrointestinal en la que se van alternando periodos de recaídas y remisión (Bian et al., 2019). La EII también está asociada a diferentes alergias alimentarias y enfermedades autoinmunes como la celiaquía e incluso la diabetes mellitus de tipo 1 (Angel-Morales et al., 2012; dos Santos et al., 2015). Algunos mediadores de la inflamación que están implicados en la patogénesis de la EII son TNF- α , IL-1 β , IL-6 y la molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1). De esta forma, un exceso de mediadores de la inflamación en el tejido del colon puede derivar en edema, úlceras e incluso carcinogénesis, por lo que una regulación efectiva de la secreción de estos factores inflamatorios es determinante en el tratamiento de la EII (Bian et al., 2019).

En este escenario es importante destacar la estructura y función del LPS (Figura 43). El lipopolisacárido (o endotoxina) es el componente principal de las membranas externas de las bacterias Gram negativas. Consta de un glucolípido anclado a la membrana celular, denominado lípido A, unido covalentemente a un heteropolisacárido hidrofílico, llamado núcleo. Algunas bacterias expresan un heteropolisacárido compuesto por un oligosacárido central unido a un polímero de oligosacáridos, denominado antígeno O. Se estima que hay aproximadamente 2×10^6 moléculas de LPS por bacteria (Mayeux, 1997).

Cuando el LPS es liberado de la membrana de las bacterias que colonizan el colon es capaz de unirse a receptores en la membrana de las células epiteliales de este órgano y desencadenar una respuesta inflamatoria en la que están implicados mediadores como el TNF- α y citoquinas proinflamatorias, entre ellas IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8 y la IL-10 (Angel-Morales et al., 2012; Kojima et al., 2000; Mayeux, 1997). Además, cuando se da el caso de que la barrera epitelial esté dañada, el LPS también puede atravesarla y penetrar en el torrente sanguíneo, llegando a producir una endotoxemia, e iniciar una respuesta inflamatoria sistémica. Una vez en sangre, el LPS viaja ligado a la proteína de unión al LPS (LBP) o a lipoproteínas y así, interacciona con los

receptores de superficie de las células del sistema inmunológico, lo que inicia una respuesta inflamatoria que finaliza con la activación del factor NF- κ B, lo cual a su vez promueve un aumento de la transcripción de citoquinas proinflamatorias como TNF α , IL-1 β , y IL-6. Es decir, en el caso de una disfunción de la barrera epitelial de la mucosa intestinal, el LPS es capaz de provocar otras patologías relacionadas con la inflamación en otras partes del cuerpo (Angel-Morales et al., 2012; dos Santos et al., 2015; Ghosh et al., 2020; Wu et al., 2019b). Además, cuando la liberación continuada de LPS en el intestino unida al predominio de las dietas mencionadas anteriormente se convierte en una situación crónica, la barrera epitelial del intestino se atrofia puesto que las uniones entre las células de la mucosa epitelial se dañan. Esta disfunción de la barrera intestinal es considerada la causa principal de la EII (Angel-Morales et al., 2012).

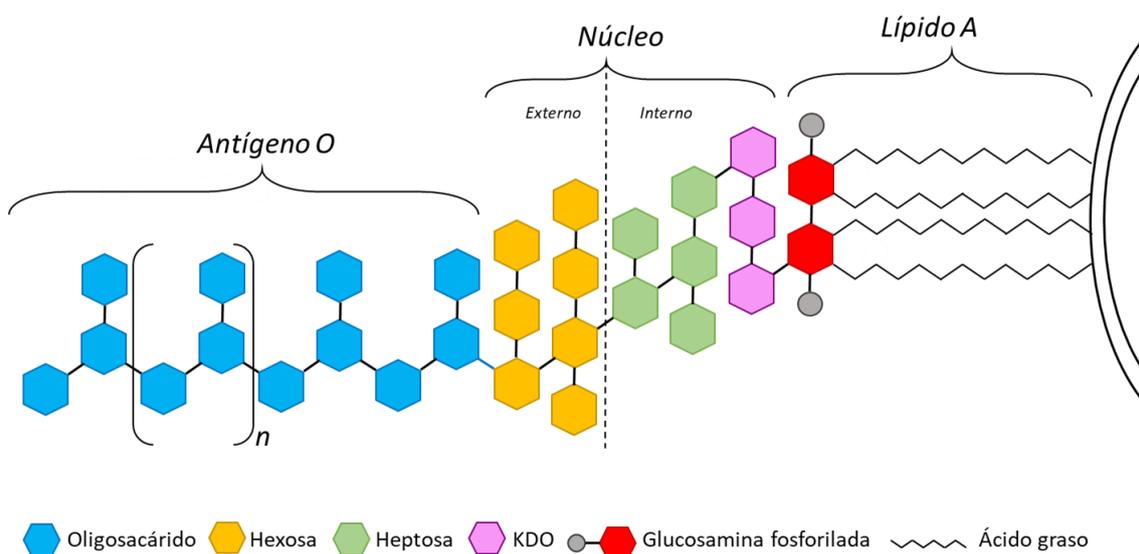


Figura 43. Estructura básica del lipopolisacárido (LPS). KDO: Ácido 3-desoxi-D-manooctulosónico

Existen numerosos estudios que relacionan de manera inversa el consumo de frutas y verduras, sobre todo las de color verde oscuro y en concreto de las brasicáceas ricas en glucosinolatos, y el riesgo de padecer cáncer de colon o enfermedades como la EII (Verkerk et al., 2009). Se ha estudiado el uso de compuestos capaces de revertir esta situación de inflamación crónica en el colon como potenciales ingredientes farmacológicos que sean capaces de aliviar los síntomas de estas dolencias. De esta forma estaría indicada una dieta rica en compuestos antioxidantes para el tratamiento o como paliativo de los síntomas de este tipo de enfermedades. Así una dieta de pak choi (una variedad de col china, rica en glucosinolatos) fue capaz de atenuar de forma significativa la gravedad de la colitis en ratones (Lippmann et al., 2014). Se ha propuesto, además, que el mecanismo de acción de los glucosinolatos frente a estos trastornos del colon viene determinado por la modulación de las enzimas de desintoxicación, que previene el daño al ADN, previniendo así la apoptosis. Además, a pesar de llegar intactos al colon, los

glucosinolatos son capaces de hidrolizarse por la flora intestinal hasta convertirse en sus isotiocianatos que, junto con el resto de los compuestos antioxidantes como carotenoides y la vitamina C, son los responsables de los efectos protectores de estos vegetales (Verkerk et al., 2009).

Con estos antecedentes y para el desarrollo de este capítulo se utilizaron los extractos enriquecidos en glucosinolatos procedentes de los subproductos de brócoli obtenidos mediante tecnologías de extracción “verdes” como un sistema de protección frente a la inflamación intestinal inducida por el LPS en una línea celular de miofibroblastos sanos de colon (CCD-18Co) (Figura 44), por lo que los objetivos generales que se plantean en este capítulo son los siguientes:

1. evaluación de la actividad citotóxica del extracto enriquecido en glucosinolatos obtenido mediante extracción con fluidos presurizados y del LPS sobre la línea celular CCD-18Co.
2. estudio de los mecanismos protectores desencadenados por los extractos enriquecidos en glucosinolatos procedentes de los subproductos de brócoli sobre la línea celular CCD-18Co expuesta al LPS.



Figura 44. Resumen gráfico de los objetivos planteados en este capítulo.

2. Estudios de citotoxicidad de los extractos y del LPS

2.1 Citotoxicidad del extracto enriquecido en glucosinolatos sobre la línea celular CCD-18Co

Los extractos optimizados enriquecidos en glucosinolatos obtenidos a partir de subproductos de brócoli Naxos mediante PLE (PLE-NX) se utilizaron para estudios de citotoxicidad sobre la línea celular de miofibroblastos de colon sanos CCD-18Co (Figura 45), con el fin de determinar aquellas concentraciones de los extractos que provocaban un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de estas células. Esta línea celular se adquirió del servicio de cultivo de tejidos (SCT) del Área Científica y Técnica de Investigación (ACTI) de la Universidad de Murcia. Tras la obtención de los extractos enriquecidos en glucosinolatos mediante PLE, se llevó a cabo la evaluación del efecto citotóxico de diferentes concentraciones de los extractos PLE-NX a lo largo del tiempo. Para ello, los miofibroblastos se sembraron a una densidad inicial de 2.000 células por pocillo en microplacas de 96 pocillos y se incubaron durante 24 h para que se adhirieran a la base del pocillo. Después de 24 h, los extractos PLE-NX se añadieron a los pocillos para lograr concentraciones finales que oscilaron entre 0 y 2.000 μg de extracto ml^{-1} (que se correspondía con 9,06 μg glucosinolatos ml^{-1}). Los extractos se incubaron durante 12, 24 y 48 h antes de determinar la viabilidad celular mediante el ensayo del MTT.

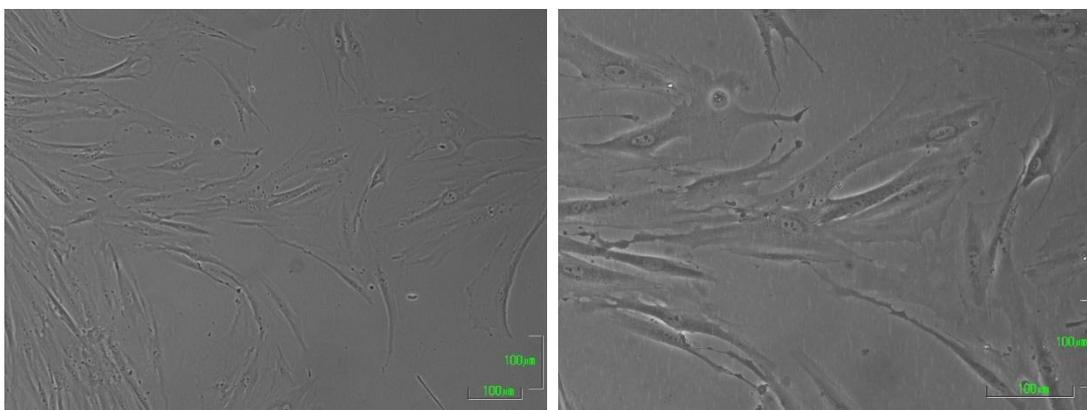


Figura 45. Imagen de miofibroblastos de colon sanos, CCD-18Co. Aumento 10x (A) y 20x (B)

Como se observa en la Figura 46, la viabilidad de la línea celular CCD-18Co se vio significativamente influenciada tanto por la concentración del extracto como por el tiempo, así como por la interacción de ambos factores (valor de $p < 0,001$). Así, en cuanto al tiempo, la viabilidad celular se incrementó significativamente siendo esta máxima tras 48 h. A este tiempo, las células tratadas con las diferentes concentraciones de extracto PLE-NX mostraron una viabilidad igual al control, a excepción del tratamiento con 2.000 μg ml^{-1} que redujo significativamente la viabilidad, mientras que las dos concentraciones más bajas estudiadas (0,1 y 1 μg ml^{-1}), no solo no resultaron citotóxicas, sino que, además, incrementaron la viabilidad

celular de manera significativa llegando a alcanzar hasta un 111 y un 114% de viabilidad, respectivamente.

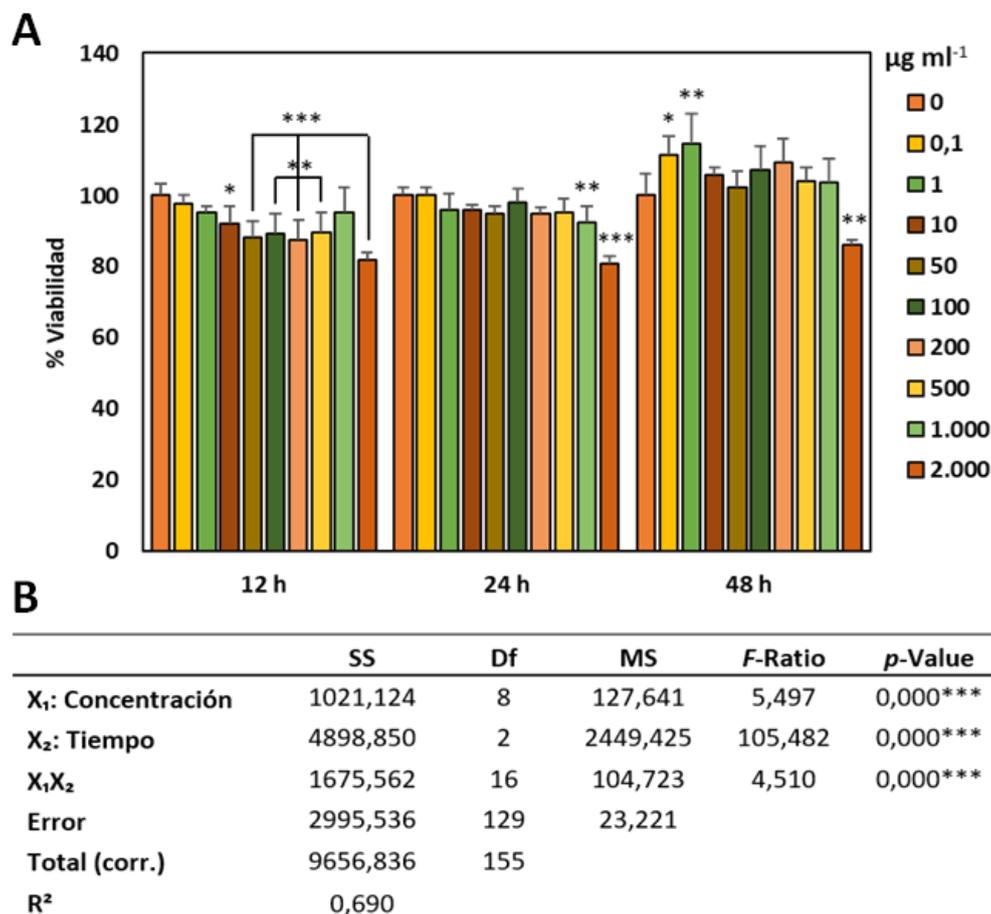


Figura 46. (A) Viabilidad de las células CCD-18Co tras 12, 24 y 48 horas de exposición a los extractos obtenidos mediante fluidos presurizados a partir de subproductos de brócoli Naxos. (B) Análisis de varianza ANOVA de las variables independientes de la viabilidad temporal a diferentes concentraciones de extractos. Los datos muestran la media ± DE de seis réplicas independientes. Los asteriscos indican diferencias significativas * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. SS, suma de cuadrados; Df, grados de libertad; MS, media cuadrada; R², coeficiente de correlación cuadrática.

2.2 Citotoxicidad del LPS

El LPS es considerado uno de los estímulos más potentes de la inflamación, el primer mecanismo de defensa del huésped frente a los agentes infecciosos. Si bien varios estudios han demostrado las actividades antiinflamatorias de los compuestos bioactivos de diferentes alimentos de origen vegetal, los estudios sobre los efectos de los glucosinolatos del brócoli en las vías de señalización celular involucradas en la inflamación intestinal son bastante limitados. Por lo tanto, el propósito de este estudio fue evaluar el efecto del extracto enriquecido en glucosinolatos obtenido mediante PLE a partir de los subproductos del brócoli sobre algunos marcadores proinflamatorios y vías de señalización involucradas en células de miofibroblastos de colon normales CCD-18Co estimuladas con LPS.

Por ello, con la finalidad de evaluar los efectos que se producen tras la liberación del LPS en las células de colon, se llevó a cabo un estudio previo sobre el efecto de diferentes concentraciones de este agente causante de inflamación. Para ello, se sembraron 2.000 células por pocillo en placas de 96 pocillos y se incubaron durante 24 h. Tras este tiempo se adicionaron diferentes concentraciones de LPS (1, 2 y 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$), y las células se mantuvieron en cultivo durante 12, 24 y 48 h. Transcurrido el tiempo correspondiente, se determinó la viabilidad celular mediante el ensayo de MTT. Como se muestra en la Figura 47, la viabilidad de las células de colon se vio significativamente afectada tanto por el tiempo como por la concentración de LPS, pero no así por la interacción de ambos factores, tal y como muestran los resultados del análisis ANOVA. Así, la viabilidad celular se incrementó de forma progresiva hasta las 48 h, alcanzándose en ese punto una viabilidad del 100 %. Asimismo, la viabilidad de las células expuestas a diferentes concentraciones de LPS, aunque se vio ligeramente reducida de manera significativa tras 12 h de exposición en presencia de LPS (1, 2 y 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$), en ningún caso, la viabilidad celular fue inferior al 90 %, indicando que las dosis de LPS empleadas no resultaron ser citotóxicas.

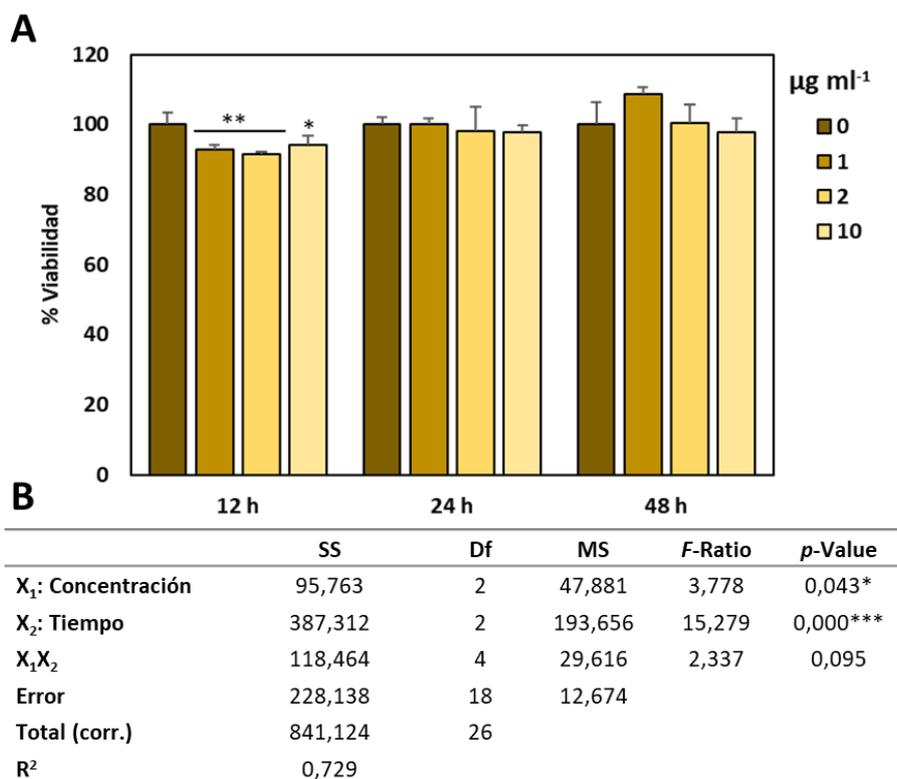


Figura 47. (A) Viabilidad de las células CCD-18Co tras 12, 24 y 48 horas de exposición a diferentes concentraciones a LPS. (B) Análisis de varianza ANOVA de las variables independientes de la viabilidad temporal a diferentes concentraciones de extractos. Los datos muestran la media \pm DE de seis réplicas independientes. Los asteriscos indican diferencias significativas * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. SS, suma de cuadrados; Df, grados de libertad; MS, media cuadrada; R², coeficiente de correlación cuadrática.

3. Aplicaciones nutracéuticas de los extractos enriquecidos en glucosinolatos en células de colon.

3.1 Efecto de los extractos de subproductos de brócoli sobre la producción intracelular de ROS en miofibroblastos CCD-18Co estimulados con lipopolisacárido

El mecanismo molecular de la lesión inflamatoria puede atribuirse, al menos parcialmente, a la generación y liberación de ROS a partir de neutrófilos y macrófagos activados. Esta sobreproducción de ROS puede causar lesiones en los tejidos al dañar las estructuras de la membrana a través de la peroxidación de lípidos aumentando aún más la permeabilidad de la barrera intestinal. Además, las ROS propagan la inflamación al estimular la liberación de citoquinas que promueven el reclutamiento de neutrófilos y macrófagos. Por lo tanto, los radicales libres son mediadores clave que inician o promueven la inflamación y, en consecuencia, la atenuación de la inflamación en términos de reducción de marcadores proinflamatorios está directamente relacionada con la prevención de la enfermedad (Geronikaki & Gavalas, 2006; Hong et al., 2020). Por estas razones se ha considerado la eliminación de las ROS mediante la ingesta de compuestos antioxidantes en la dieta como una estrategia para la mejora de los problemas derivados de la producción de estos compuestos (Angel-Morales et al., 2012; dos Santos et al., 2015). Así, una vez determinadas las concentraciones de extracto PLE-NX (1 - 1.000 $\mu\text{g ml}^{-1}$) que no inhibieron el crecimiento celular de células CCD-18Co de miofibroblastos de colon humano después de 48 h de incubación (Figura 46) y dado que el LPS no afectó significativamente la viabilidad celular de los miofibroblastos (Figura 47), se evaluó la actividad antiinflamatoria de los extractos PLE-NX (1 - 1.000 $\mu\text{g ml}^{-1}$) midiendo sus efectos sobre la producción de ROS intracelulares en las células CCD-18Co estimuladas con LPS (2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) (Figura 48). Los resultados obtenidos mostraron que el tratamiento con el agente LPS durante 4 h incrementó significativamente los niveles intracelulares de ROS en las células CCD-18Co hasta 1,45 veces con respecto al control sin LPS. Sin embargo, en las células pretratadas con los extractos de subproductos de brócoli (PLE-NX) durante 24 h expuestas al LPS, la acumulación intracelular de ROS se redujo significativamente a medida que se incrementaba la concentración de extracto, alcanzando el nivel basal de las células no estimuladas con LPS, en el caso de la concentración más alta de extracto (1.000 $\mu\text{g ml}^{-1}$), la cual reguló a la baja los niveles de ROS hasta 0,71 veces en comparación con las células estimuladas con LPS ($p < 0,05$). En ningún caso, el pretratamiento con los extractos PLE-NX permitió reducir el nivel intracelular de ROS en comparación con la quercetina, con la cual se consiguió reducir los niveles de ROS en 2,4 veces en comparación con las células estimuladas con LPS ($p < 0,05$) (Figura 48).

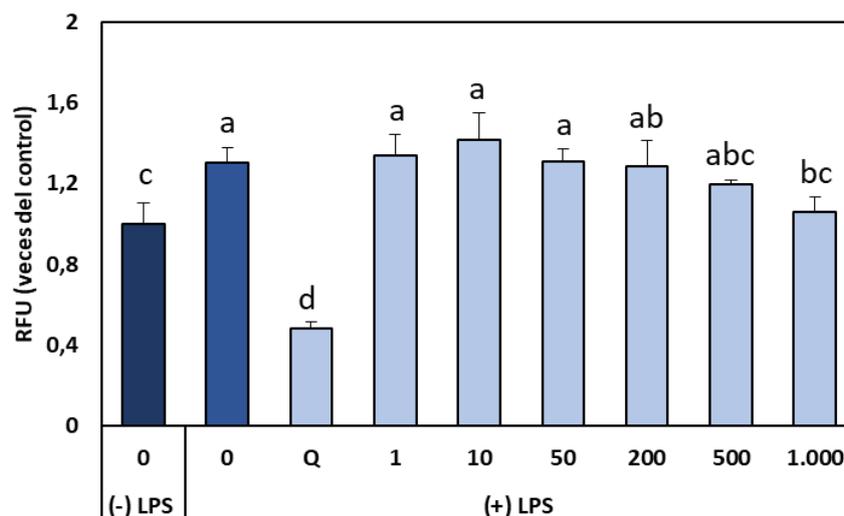


Figura 48. Unidades relativas de fluorescencia (veces del control) de las células CCD-18Co debido a las especies reactivas de oxígeno (ROS) producidas en ausencia y presencia de $2 \mu\text{g ml}^{-1}$ LPS durante 4 horas a sometidas o no a un pretratamiento durante 24 horas con los extractos. Los datos muestran la media \pm DE de seis réplicas independientes. Diferentes letras indican diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ($p < 0,05$).

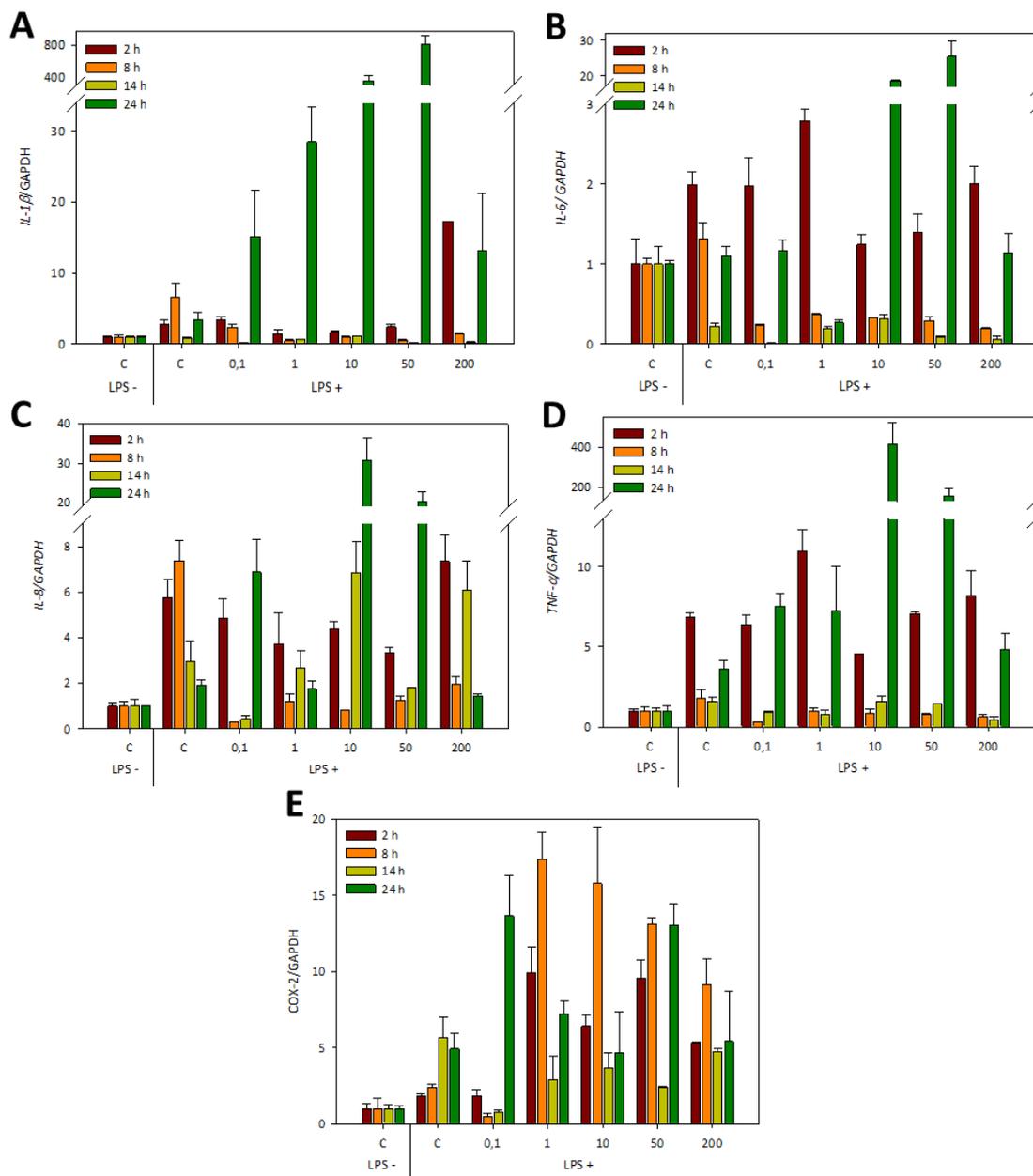
Por lo tanto, los resultados obtenidos sugieren que los glucosinolatos del brócoli pueden proteger los componentes celulares (por ejemplo, el ADN) del daño oxidativo debido a su capacidad para eliminar las ROS, pudiendo de esa forma, desempeñar un papel importante en la prevención de ROS lo cual ayudaría a la prevención de enfermedades intestinales crónicas. La reducción de ROS observada tras el pretratamiento de las células CCD-18Co estimuladas con LPS con el extracto enriquecido en glucosinolatos de brócoli está en concordancia con investigaciones realizadas previamente. En este contexto varias investigaciones han demostrado la eficacia de la adición de compuestos con capacidad antioxidante en la reducción de la producción de ROS en células de colon. Así, los estudios realizados por dos Santos et al. (2015) demostraron que el extracto de açai, rico en polifenoles, revirtió parcialmente la generación de ROS inducida por el LPS del orden de 0,53 veces con respecto al control con LPS. Del mismo modo, Angel-Morales et al. (2012) evaluaron el potencial preventivo de los polifenoles extraídos del vino tinto en células de miofibroblastos CCD-18Co derivadas de colon humano y estimuladas con LPS. Sus resultados mostraron que cuando las células fueron estimuladas con LPS, los niveles de ROS aumentaron 1,5 veces y el tratamiento con los polifenoles del vino evitó esta inducción, disminuyendo los niveles de ROS a 0,58 veces, en comparación con los niveles de ROS encontrados en las células no estimuladas con LPS.

3.2 Efecto de los extractos de subproductos de brócoli sobre la expresión de genes relacionados con la inflamación en miofibroblastos de colon CCD-18Co estimulados con lipopolisacárido

La patogenia de la inflamación es un proceso complejo regulado por redes de citoquinas y la inducción de muchos genes proinflamatorios. Cada vez existen más evidencias de que los miofibroblastos influyen en la integridad de la mucosa intestinal a través de la secreción de citoquinas y quimiocinas, cuando se estimulan con LPS, siendo éste uno de los estímulos más potentes de la inflamación y el primer mecanismo de defensa del huésped contra los agentes infecciosos (Cianciulli et al., 2012). El LPS es reconocido por el receptor tipo Toll (TLR)-4, un receptor de superficie celular proinflamatorio que se expresa en las células del sistema inmunitario innato, así como en las células epiteliales. Tras la activación, TLR-4 induce NF- κ B, que a su vez regula transcripcionalmente la expresión de muchas citoquinas proinflamatorias (TNF- α e IL-6), moléculas de adhesión (molécula de adhesión intracelular-1 (ICAM-1) y moléculas de adhesión de células vasculares-1 (VCAM-1)), y también activa la expresión de COX-2, enzima requerida en la síntesis de PGE2 como mediador proinflamatorio (dos Santos et al., 2015). Estos mediadores de la inflamación actúan como biomarcadores que permiten cuantificar la gravedad de la inflamación celular y la disminución de su expresión se encuentra relacionada con la actividad antiinflamatoria (Venancio et al., 2017).

Tras determinar los efectos del LPS sobre la producción de ROS se estudió el efecto del pretratamiento con diferentes concentraciones de extractos PLE-NX sobre los niveles de expresión de diferentes genes relacionados con los procesos inflamatorios (*IL-1 β* , *IL-6*, *IL-8*, *TNF- α* y *COX-2* en células de colon sano CCD-18Co estimulados con LPS mediante qRT-PCR (Figura 49). El análisis ANOVA mostró que tanto el tratamiento con LPS, la concentración de los extractos como el tiempo, de manera independiente, influyeron de manera estadísticamente significativa en la expresión de los genes analizados, así como la combinación de estos factores (p -value < 0,001).

El análisis del perfil de expresión del gen correspondiente a la citoquina proinflamatoria *IL-1 β* (Figura 49A) mostró un máximo de expresión a las 8 h como consecuencia del tratamiento con LPS, siendo este aumento del orden de 6,6 veces con respecto al control sin tratar. A ese tiempo, el pretratamiento de los miofibroblastos con el extracto PLE-NX a una concentración de 10 μ g ml^{-1} dio lugar a un descenso significativo en la acumulación de transcritos conforme se incrementaba la concentración de extracto, del orden de 14,3 y 2,16 veces inferior, con respecto a las células estimuladas con LPS y sin estimular, respectivamente.



F-Ratio

	<i>IL-1β</i>	<i>IL-6</i>	<i>IL-8</i>	<i>TNF-α</i>	<i>COX-2</i>
X₁: Tiempo	97,414***	114,111***	71,656***	29,115***	31,151***
X₂: LPS	51,927***	4,978***	247,732***	24,268***	98,821***
X₃: Concentración	125,424***	123,192***	60,999***	42,879***	35,890***
X₁X₂	12,780***	26,200***	31,532***	73,256***	11,872***
X₁X₃	128,467***	140,116***	70,194***	47,700***	26,832***

Figura 49. Variación de la expresión relativa (veces del control) de los genes que codifican para citoquinas proinflamatorias *IL-1β* (A) *IL-6* (B), *IL-8* (C), *TNF-α* (D) y *COX-2* (E) en células CCD-18Co pretratadas con diferentes concentraciones de extracto PLE-NX (0,1, 1, 10, 50 y 200 μg extracto mL⁻¹) tras 2, 8, 14 Y 24 h desde la exposición a 2 μg mL⁻¹ de lipopolisacárido (LPS). Los valores muestran la media ± DE de tres réplicas independientes. El control LPS (-) con valor de referencia = 1 se utilizó para normalizar los niveles de expresión relativos de cada gen. Los niveles de transcritos se calcularon usando el gen GAPDH como control interno. Valores F de ANOVA de dos vías significativos al 99,9 % (***)

Curiosamente, tras 24 h se produjo un leve pero significativo aumento tras el tratamiento con LPS, pero este aumento fue mucho mayor en presencia del extracto a todas las concentraciones empleadas que causaron un aumento de manera dependiente de la dosis, siendo solo significativo el aumento en el caso de 10 y 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$, en donde alcanzaron 352 y 807 veces el valor del control, respectivamente, para luego mostrar una caída hasta los niveles del control con la concentración más alta, 200 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (Figura 49A).

En cuanto al análisis del perfil de expresión del gen *IL-6* (Figura 49B), se observó un ligero pero significativo aumento tras 2 h desde la aplicación del LPS, el cual duplicó la acumulación de transcritos con respecto a las células no tratadas. Sin embargo, a ese tiempo, el pretratamiento con 10 y 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de extracto PLE-NX provocó un descenso significativo en el nivel de expresión de este gen, alcanzando en estos casos valores similares al control no estimulado con LPS. Además, como se observa en la Figura 49B, se observó un aumento significativo en el perfil de la expresión del gen *IL-6* tras 8 h desde la estimulación con la endotoxina y el pretratamiento con los extractos PLE-NX enriquecidos en glucosinolatos, a cualquiera de las concentraciones ensayadas provocó un descenso significativo en la acumulación de transcritos con respecto al control sin estimular, e incluso a niveles inferiores a la expresión en células no estimuladas. Este efecto se mantuvo a las 14 h desde la estimulación, aunque en este caso, cabe destacar que ni estimulación con LPS solo, o en combinación con el extracto alteró el perfil de expresión del gen *IL-6*, sino que la acumulación de transcritos fue menor incluso que en el control sin estimular. Finalmente, trascurridas 24 h desde la estimulación con LPS en combinación con el pretratamiento con los extractos, el nivel de expresión de todas las condiciones se igualó a las del control, a excepción de las obtenidas en células expuestas a 10 y 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de extracto PLE-NX, que mostraron una expresión de orden de 18 y 25 veces superior al control, respectivamente (Figura 49B).

Del mismo modo, se evaluó la capacidad del extracto PLE-NX para modular la expresión génica de *IL-8* en miofibroblastos de colon después de la estimulación con LPS (Figura 49C). En este caso, se observó claramente un aumento significativo en la acumulación de transcritos tanto en células control (estimuladas con LPS) como en las tratadas con las diferentes concentraciones de extracto PLE-NX. Así, tras 8 h se observó un máximo de expresión en presencia de LPS del orden de 7,7 veces la expresión del gen en condiciones normales (no estimuladas) y este aumento se alivió tras el pretratamiento con el extracto, siendo este descenso más acusado cuando las células se trataron con 0,1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de extracto, en donde el nivel de expresión fue del orden de 24,8 veces inferior al obtenido en células estimuladas con la endotoxina. Además, al

Capítulo III

igual que ocurría con la expresión del gen *IL-1β*, tras 24 h se produjo un leve pero significativo aumento en el nivel de expresión del gen tras el tratamiento con LPS, pero este aumento fue mucho mayor en presencia de 10 y 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$, en donde alcanzaron 30,7 y 20,4 veces el valor del control, respectivamente.

Por otro lado, también se estudió el nivel de expresión del gen que codifica para la citoquina *TNF-α* (Figura 49D). Como se puede observar en la Figura, el análisis mediante qRT-PCR mostro que, la estimulación con la endotoxina LPS en ausencia de extracto, dio lugar a dos picos máximos de expresión, a las 2 y 24 h desde la estimulación, siendo éstos del orden de 6,8 y 3,6 veces superior al nivel de expresión del control. Solo el pretratamiento con 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de extracto PLE-NX consiguió reducir la expresión de este marcador de inflamación hasta 1,5 veces la expresión en células estimuladas con LPS tras 2 h. Por el contrario, el aumento en la acumulación de transcritos observado tras 24 h desde la estimulación con LPS no se consiguió revertir tras el pretratamiento con ninguna de las concentraciones de extracto PLE-NX ensayadas sino todo lo contrario, ya que se observó un fuerte incremento en la expresión del gen *TNF-α* tras la aplicación de 10 y 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ cuya expresión se vio incrementada en torno a 414 y 157 veces respectivamente con respecto al control.

Por último, se determinó el perfil de expresión del gen que codifica para *COX-2* (Figura 49E). Como puede apreciarse, la estimulación con LPS incrementó considerablemente el nivel de expresión del gen *COX-2* tras 14 h desde la aplicación, alcanzándose en ese punto, una acumulación de transcritos del orden de 5,7 veces superior a las células no estimuladas y este efecto se mantuvo hasta las 24 h. En este mismo tiempo, la sobreexpresión producida por el LPS se vio significativamente reducida hasta alcanzar los niveles del control en las células pretratadas con 0,1, 1 y 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ del extracto PLE-NX. Sin embargo, se observó un aumento generalizado en la expresión del gen *COX-2* con respecto al control sin estimular cuando las células se expusieron a todas las concentraciones de los extractos de PLE-NX, con excepción de la concentración más baja (0,1 $\mu\text{g ml}^{-1}$).

A partir de los modelos tanto *in vitro* como *in vivo* con animales de experimentación se ha conseguido comprender los mecanismos inflamatorios que ocurren a nivel intestinal en condiciones como la EII. Estos mecanismos se centran sobre todo en la pérdida de la integridad de la membrana y la acumulación de ROS y citoquinas. Así, en trastornos del intestino como la colitis ulcerosa existe un aumento de mediadores inflamatorios como la *IL-1β*, *IL-6*, *IL-8* o el *TNF-α* (Wang et al., 2018). Además, estos estados de inflamación crónica se encuentran fuertemente asociados con el desarrollo del cáncer (Jeffery & Araya, 2009). En este escenario, se ha

establecido también una conexión entre la expresión de COX-2 (y por tanto de la producción de PGE2) en líneas celulares de carcinoma de colon estimuladas con LPS. La producción de PGE2 se encuentra también asociada a la activación del factor nuclear NF- κ B. Así, el LPS puede actuar como un factor estimulante del crecimiento autocrino que provoque la aparición de células tumorales por la exposición a la flora colónica o por endotoxemia (Kojima et al., 2000).

Teniendo esto en cuenta, se han reportado numerosos beneficios de la toma de fármacos antiinflamatorios no esteroideos, capaces de aliviar el estrés oxidativo en el carcinoma de colon (Huls et al., 2003), por lo que la toma de compuestos antioxidantes que mejoren estados de inflamación podrían ser considerados como terapia para algunos tipos de cáncer. En este sentido, varias investigaciones han establecido el papel de los factores nutricionales en la mejora de la permeabilidad intestinal, como nutrientes con actividad antioxidante (curcumina, quercetina, extractos de ginkgo biloba, N-acetil cisteína) así como los pro- y pre-bióticos (Ghosh et al., 2020). Como se ha comprobado, la relación entre la producción de ROS y la expresión génica de diferentes moléculas relacionadas con la inflamación (Herr & Büchler, 2010) los mismos extractos que presentaron una inducción de la reducción de ROS también hicieron lo propio con factores y citocinas proinflamatorias, como NF- κ B y VCAM-1 en el caso de polifenoles del vino (Angel-Morales et al., 2012) o de TNF- α , COX-2, NF- κ B, VCAM-1 e ICAM-1, en el caso de polifenoles de açai (dos Santos et al., 2015). También el kaempferol ha demostrado ser un inhibidor de la expresión de genes inflamatorios como TNF- α , IL-1 β , interleucina-6, ICAM-1 y VCAM-1 inducidos por LPS en un modelo celular de inflamación intestinal (RIMVEC) al inhibir la señalización de NF- κ B (Bian et al., 2019). Otros compuestos con capacidad antioxidante como las antocianinas extraídas de *Chrysobalanus icaco* L. también han demostrado su capacidad para disminuir la expresión de TNF- α , IL-1 β , IL-6 y NF- κ B en células tumorales de colon así como de la producción de ROS (Venancio et al., 2017) o la paeoniflorina (compuesto bioactivo mayoritario obtenido de la planta *Paeonia lactiflora* Pallas) que también demostró ser un buen candidato como ingrediente terapéutico en la EII, puesto que tras su aplicación en células de colon estimuladas con LPS provocaron un aumento significativo del valor de la resistencia eléctrica transepitelial (TEER, un indicador de la integridad de la barrera epitelial intestinal), así como una inhibición de la expresión de COX-2 (también inducida por LPS), de TNF- α y de IL-6 (Wu et al., 2019b). Otros compuestos puros como la vitamina A (He et al., 2019) o extractos de diversas especies vegetales como las del género *Potentilla* L. (Tomczyk et al., 2013), extractos de *Chrysobalanus icaco* L. (Venancio et al., 2017) o de *Curcuma longa* y de *Boswellia serrata* (Governa et al., 2018) también han mostrado mejorar el estado de la barrera epitelial y reducir

Capítulo III

la expresión de diferentes marcadores de inflamación como NF- κ B, IL-1 β , IL-6 e IL-8, reduciendo además la producción de ROS.

Con relación al brócoli, los estudios realizados en este ámbito han sido varios. En ese sentido, Samuel et al. (2015) observaron una disminución en el nivel de IL-8 en suero de ratones alimentados con jugo de brócoli cocinado al vapor, probablemente debido al contenido del brócoli en SFN que es capaz de inhibir NF- κ B, y por tanto, disminuir la expresión de este tipo de mediadores de inflamación. Asimismo, dietas ricas en extractos de brócoli promovieron la salud intestinal mejorando la barrera intestinal en modelos de EII murinos, además de reducir mediadores inflamatorios entre los que se encuentra COX-2 (Mueller et al., 2013). Por otro lado, Domínguez-Perles et al. (2012) exploraron el uso de extractos de hojas de brócoli para enriquecer infusiones de té verde. La combinación de los compuestos bioactivos de ambas especies (glucosinolatos, ácidos hidroxicinámicos y flavonoles y catequinas) dio lugar a un aumento en la actividad antitumoral en cultivos de cáncer de colon. En cuanto al efecto de la cocción del brócoli también se ha estudiado sobre modelos de ratón con enfermedad intestinal (Wang et al., 2018). Los resultados mostraron que, aunque la cantidad de mirosinasa vegetal fue menor al cocinar ligeramente este vegetal, los efectos fueron los mismos que cuando se consumía brócoli crudo. El consumo de brócoli en cualquiera de las dos formas evidenció una actividad disminuida de la enfermedad, mostrando una menor reducción de la longitud colon, una menor fuga de LPS en la sangre y lesiones de colon menos graves que las que mostraron los ratones afectados por la enfermedad. Además, la expresión de *IL-6* también se vio disminuida en los grupos de animales que consumieron brócoli tanto crudo como cocinado. Estos resultados sugieren la posible conversión efectiva de los glucosinolatos a sus isotiocianatos, por parte de la microbiota intestinal.

Basándonos en estos estudios y a la vista de los resultados obtenidos, los extractos enriquecidos en glucosinolatos obtenidos de subproductos de brócoli mediante PLE podrían considerarse como potenciales ingredientes para la obtención de nuevos fármacos para el tratamiento de la EII. Así, el efecto observado tras los análisis de los diferentes marcadores inflamatorios en respuesta a la estimulación con LPS podrían deberse al elevado contenido en glucorafanina y en neoglucobrasicina, glucosinolatos mayoritarios presentes en los extractos PLE-NX. En este sentido, estudios llevados a cabo por Tian et al. (2022) mostraron que la suplementación con glucorafanina en la dieta de ratones, usados como modelo de colitis, redujo la expresión de las citoquinas inflamatorias IL-1 β , IL-18 y TNF- α , activó Nrf2 y alivió el estrés oxidativo, por lo que se sugirió que el uso de este glucosinolato era capaz de proteger la estructura del colon y de

prevenir la respuesta inflamatoria de esta enfermedad. De la misma forma, el indol-3-carbinol (indol resultante de la hidrólisis de la glucobrasicina) fue capaz de disminuir significativamente la expresión intestinal de NF- κ B y de varios factores inflamatorios como el TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8 en ratones con colitis (Peng et al., 2021). Por otra parte, existen numerosos estudios sobre la potencialidad del SFN, que es el isotiocianato más prometedor, concretamente sobre el efecto del SFN en la salud intestinal. Estos estudios sugieren que el mecanismo de acción del SFN implica la traslocación del factor Nrf2 al núcleo celular, donde se une a los elementos de respuesta antioxidantes (ARE) en la región promotora de varias enzimas de desintoxicación de fase II (Jeffery & Araya, 2009; Zhao et al., 2018). Este compuesto ha demostrado inhibir, de manera dependiente de la dosis, la producción de citoquinas inflamatorias como TNF- α , IL-1 β e IL-6 en cultivos celulares de cáncer de colon (Bessler & Djaldetti, 2018). También ha demostrado erradicar cepas de *Helicobacter pylori* causantes de daño intestinal como la gastritis y úlceras pépticas (Fahey et al., 2002), así como de inhibir la proliferación de células de cáncer colorrectal humano HCT-116 (Bertl et al., 2006). Wei et al. (2020) también estudiaron el uso del SFN como tratamiento contra lesiones intestinales causadas por el uso de tratamientos antitumorales. Sus resultados mostraron que la suplementación de SFN en la dieta de ratones tratados con 5-fluorouracilo mejoró la lesión intestinal causada por el tratamiento, además de aliviar la pérdida de peso, reparar la estructura del epitelio dañado tanto en el yeyuno como en el colon, reducir la inflamación intestinal (disminuyendo la expresión de NF- κ B y aumentando la de Nrf2) y curar la permeabilidad intestinal.

Conclusiones

1. Se ha establecido como procesado óptimo, el triturado de los tallos y las hojas en fresco a un tamaño de 100 μm y su posterior secado a 55 °C durante 24 h para la obtención de subproductos en seco y la posterior realización de los diferentes procedimientos de extracción de compuestos bioactivos.
2. La aplicación de técnicas de extracción avanzadas con solventes respetuosos con el medio ambiente para evaluar la revalorización de los subproductos de brócoli, en comparación con la extracción convencional, ha permitido desarrollar un diseño experimental basado en el modelo de superficie de respuesta (RSM) para optimizar y validar los procedimientos de extracción de compuestos bioactivos basados en fluidos supercríticos (SFE) y fluidos presurizados (PLE) en los subproductos de brócoli.
3. La optimización de la extracción de compuestos bioactivos a partir de subproductos de brócoli basada en SFE mostró que la temperatura, la presión, el tiempo de procesamiento, el flujo y el porcentaje de etanol influyeron significativamente en la extracción de compuestos bioactivos. Las condiciones óptimas de la SFE para maximizar la recuperación de β -caroteno fueron: 40 °C, 443 bar, etanol al 7%, 31 g min^{-1} de caudal y 68 min dando como resultado un extracto mucho más rico en compuestos bioactivos totales (β -caroteno, compuestos fenólicos totales, clorofilas, fitoesteroles y α -tocoferol) que los extractos convencionales, lo que a su vez se correlacionó con una mayor actividad antioxidante.
4. Se ha desarrollado y optimizado un procedimiento de extracción eficiente de glucosinolatos a partir de subproductos de brócoli basado en PLE (utilizando etanol/agua como disolvente) siendo los valores óptimos de las condiciones PLE para la extracción de glucosinolatos: 53 °C, 8 min y 83 % de etanol, demostrando de esta forma, la eficiencia de PLE como una alternativa ambientalmente sostenible para extraer glucosinolatos a partir de los subproductos del brócoli.
5. El extracto enriquecido en compuestos bioactivos mediante SFE obtenido a partir de subproductos de brócoli exhibió una alta actividad antioxidante y un efecto citoprotector sobre la línea celular de queratinocitos (HaCaT) expuestos a la luz UV-B permitiendo reducir eficazmente el contenido intracelular de ROS inducidas por este tipo de radiación, así como revertir eficazmente el aumento de las citoquinas proinflamatorias inducidas por la radiación UV-B (IL-1 β , IL-6, IL-78, TNF- α y COX-2) en las células HaCaT.
6. Los extractos enriquecidos en compuestos bioactivos y en glucosinolatos obtenidos mediante SFE y PLE, procedentes de los subproductos de brócoli podrían ser un excelente agente terapéutico potencial para la reparación de heridas en la piel, tal y como demuestran los resultados del estudio de la cicatrización de heridas en queratinocitos pretratados con los diferentes extractos.

Conclusiones

7. El extracto enriquecido en glucosinolatos obtenido mediante PLE a partir de subproductos de brócoli posee propiedades antiinflamatorias en células de colon CCD-18Co estimuladas con LPS, y presenta capacidad potencial para atenuar la producción de algunos marcadores proinflamatorios (IL-1 β , IL-6, IL-8 y COX-2), además de ser un potencial antioxidante, capaz de revertir la acumulación intracelular de ROS. No obstante, se requieren estudios complementarios que corroboren dicha aplicación, para que pueda ser considerado como un prometedor componente dietético antiinflamatorio.

Estos resultados demuestran que los extractos procedentes de subproductos de brócoli tienen una utilidad potencial como aditivos de productos cosméticos y nutracéuticos que ofrecen protección contra el daño por estrés oxidativo, proporcionando una base sólida para estudios más profundos con el fin de evaluar su eficacia en la prevención del daño y el fotoenvejecimiento causado por los rayos UV-B, así como contra la inflamación intestinal y enfermedades asociadas. Además, permitirá a la empresa AGRÍCOLA SANTA EULALIA dar un importante salto cualitativo en su gama de productos, al especializarse en la generación de nuevos ingredientes con mejor (bio) disponibilidad y actividad funcional y antioxidante, revalorizando a su vez un subproducto agroindustrial derivado de su propio proceso de producción.

Bibliografía

- Afaq, F., & Mukhtar, H. (2006). Botanical antioxidants in the prevention of photocarcinogenesis and photoaging. *Experimental Dermatology*, *15*(9), 678-684. doi: 10.1111/j.1600-0625.2006.00466.x
- Agulló-Chazarra, L., Borrás-Linares, I., Lozano-Sánchez, J., Segura-Carretero, A., Micol, V., Herranz-López, M., & Barrajon-Catalán, E. (2020). Sweet cherry byproducts processed by green extraction techniques as a source of bioactive compounds with antiaging properties. *Antioxidants*, *9*(5), 418. doi: 10.3390/antiox9050418
- Aizpurua-Olaizola, O., Ormazabal, M., Vallejo, A., Olivares, M., Navarro, P., Etxebarria, N., & Usobiaga, A. (2015). Optimization of Supercritical Fluid Consecutive Extractions of Fatty Acids and Polyphenols from *Vitis Vinifera* Grape Wastes. *Journal of Food Science*, *80*(1), E101-E107. doi: 10.1111/1750-3841.12715
- Alzate, L. M., Gonzalez, D., & Londoño-Londoño, J. (2013). Recovery of carotenoids from agroindustrial by-products using clean extraction techniques: supercritical fluid extraction and ultrasound assisted extraction. *III Iberoamerican Conference on Supercritical Fluids*, 1-5. Recuperado a partir de <http://www.nupeg.ufrn.br/prosciba/prosciba2013/Papers/T2-59.pdf>
- Ameer, K., Shahbaz, H. M., & Kwon, J. H. (2017). Green Extraction Methods for Polyphenols from Plant Matrices and Their Byproducts: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *16*(2), 295-315. doi: 10.1111/1541-4337.12253
- Angel-Morales, G., Noratto, G., & Mertens-Talcott, S. (2012). Red wine polyphenolics reduce the expression of inflammation markers in human colon-derived CCD-18Co myofibroblast cells: Potential role of microRNA-126. *Food and Function*, *3*(7), 745-752. doi: 10.1039/c2fo10271d
- Anjum, N. A., Gill, S. S., Ahmad, I., Pacheco, M., Duarte, A. C., Umar, S., Khan, N. A., & Pereira, M. E. (2012). The Plant Family Brassicaceae: An Introduction. En *The plant family Brassicaceae: contribution towards phytoremediation* (pp. 1-33). Springer, Dordrecht. doi: 10.1007/978-94-007-3913-0_1
- Ansary, T. M., Hossain, M. R., Kamiya, K., Komine, M., & Ohtsuki, M. (2021). Inflammatory molecules associated with ultraviolet radiation-mediated skin aging. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(8), 3974. doi: 10.3390/ijms22083974

Bibliografía

- 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. doi: 10.1016/j.chroma.2013.07.051
- Arnáiz, E., Bernal, J., Martín, M. T., Diego, J. C., Bernal, J. L., & Recio, L. T. (2016). Optimisation of the Supercritical Fluid Extraction of Antioxidants from Broccoli Leaves. *Food Analytical Methods*, *9*(8), 2174-2181. doi: 10.1007/s12161-016-0399-4
- Arnáiz, E., Bernal, J., Martín, M. T., García-Viguera, C., Bernal, J. L., & Toribio, L. (2011). Supercritical fluid extraction of lipids from broccoli leaves. *European Journal of Lipid Science and Technology*, *113*(4), 479-486. doi: 10.1002/ejlt.201000407
- Arnáiz, E., Bernal, J., Martín, M. T., Nozal, M. J., Bernal, J. L., & Toribio, L. (2012). Supercritical fluid extraction of free amino acids from broccoli leaves. *Journal of Chromatography A*, *1250*, 49-53. doi: 10.1016/j.chroma.2012.04.066
- Avato, P., & Argentieri, M. P. (2015). Brassicaceae: a rich source of health improving phytochemicals. *Phytochemistry Reviews*, *14*(6), 1019-1033. doi: 10.1007/s11101-015-9414-4
- Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M. H. A., Ghafoor, K., Norulaini, N. A. N., & Omar, A. K. M. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*, *117*(4), 426-436. doi: 10.1016/J.JFOODENG.2013.01.014
- Bahadoran, Z., Tohidi, M., Nazeri, P., Mehran, M., Azizi, F., & Mirmiran, P. (2012). Effect of broccoli sprouts on insulin resistance in type 2 diabetic patients: A randomized double-blind clinical trial. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, *63*(7), 767-771. doi: 10.3109/09637486.2012.665043
- Baixauli Soria, C., & Maroto Borrego, J. V. (2017). Bróculis, coliflores y coles. En *Cultivos hortícolas al aire libre* (pp. 371-434).
- Banerjee, J., Singh, R., Vijayaraghavan, R., MacFarlane, D., Patti, A. F., & Arora, A. (2017). Bioactives from fruit processing wastes: Green approaches to valuable chemicals. *Food Chemistry*, *225*, 10-22. doi: 10.1016/j.foodchem.2016.12.093
- Banerjee, R., Verma, A. K., Das, A. K., Rajkumar, V., Shewalkar, A. A., & Narkhede, H. P. (2012).

- Antioxidant effects of broccoli powder extract in goat meat nuggets. *Meat Science*, 91(2), 179-184. doi: 10.1016/J.MEATSCI.2012.01.016
- Barbulova, A., Colucci, G., & Apone, F. (2015). New trends in cosmetics: By-products of plant origin and their potential use as cosmetic active ingredients. *Cosmetics*, 2(2), 82-92. doi: 10.3390/cosmetics2020082
- Bashir, M. M., Sharma, M. R., & Werth, V. P. (2009). UVB and proinflammatory cytokines synergistically activate TNF- α production in keratinocytes through enhanced gene transcription. *Journal of Investigative Dermatology*, 129(4), 994-1001. doi: 10.1038/jid.2008.332
- Baysal, T., Ersus, S., & Starmans, D. A. J. (2000). Supercritical CO₂ Extraction of β -Carotene and Lycopene from. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 5507-5511.
- Bertl, E., Bartsch, H., & Gerhäuser, C. (2006). Inhibition of angiogenesis and endothelial cell functions are novel sulforaphane-mediated mechanisms in chemoprevention. *Molecular Cancer Therapeutics*, 5(3), 575-585. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-05-0324
- Bessler, H., & Djaldetti, M. (2018). Broccoli and human health: immunomodulatory effect of sulforaphane in a model of colon cancer. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 69(8), 946-953. doi: 10.1080/09637486.2018.1439901
- Bian, Y., Liu, P., Zhong, J., Hu, Y., Fan, Y., Zhuang, S., & Liu, Z. (2019). Kaempferol inhibits multiple pathways involved in the secretion of inflammatory mediators from LPS-induced rat intestinal microvascular endothelial cells. *Molecular Medicine Reports*, 19(3), 1958-1964. doi: 10.3892/mmr.2018.9777
- Boddupalli, S., Mein, J. R., Lakkanna, S., & James, D. R. (2012). Induction of phase 2 antioxidant enzymes by broccoli sulforaphane: Perspectives in maintaining the antioxidant activity of vitamins A, C, and E. *Frontiers in Genetics*, 3, 7. doi: 10.3389/FGENE.2012.00007/BIBTEX
- Bojorquez-Rodríguez, E. M., Guajardo-flores, D., Jacobo-Velázquez, D. A., & Serna-Saldívar, S. O. (2022). Evaluation of the Effects of Process Conditions on the Extraction of Glucosinolates from Broccoli Sprouts. *Horticulturae*, 8(11), 1090.
- Bousquet, J., Le Moing, V., Blain, H., Czarlewski, W., Zuberbier, T., de la Torre, R.,... Anto, J. M. (2021). Efficacy of broccoli and glucoraphanin in COVID-19: From hypothesis to proof-of-

Bibliografía

- concept with three experimental clinical cases. *World Allergy Organization Journal*, 14(1), 100498. doi: 10.1016/J.WAOJOU.2020.100498
- Bouzroud, S., El Maaiden, E., Sobeh, M., Merghoub, N., Boukcm, H., Kouisni, L., & El Kharrassi, Y. (2023). Biotechnological Approaches to Producing Natural Antioxidants: Anti-Ageing and Skin Longevity Prospects. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(2), 1397. doi: 10.3390/ijms24021397
- Brown, A. F., Yousef, G. G., Jeffery, E. H., Klein, B. P., Wallig, M. A., Kushad, M. M., & Juvik, J. A. (2002). Glucosinolate profiles in broccoli: Variation in levels and implications in breeding for cancer chemoprotection. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 127(5), 807-813. doi: 10.21273/jashs.127.5.807
- Calò, R., & Marabini, L. (2014). Protective effect of *Vaccinium myrtillus* extract against UVA- and UVB-induced damage in a human keratinocyte cell line (HaCaT cells). *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 132, 27-35. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2014.01.013
- Campos, D., Chirinos, R., Barreto, O., Noratto, G., & Pedreschi, R. (2013). Optimized methodology for the simultaneous extraction of glucosinolates, phenolic compounds and antioxidant capacity from maca (*Lepidium meyenii*). *Industrial Crops and Products*, 49, 747-754. doi: 10.1016/j.indcrop.2013.06.021
- Cano-Lamadrid, M., & Artés-Hernández, F. (2022). By-products revalorization with non-thermal treatments to enhance phytochemical compounds of fruit and vegetables derived products: A review. *Foods*, 11(1), 59. doi: 10.3390/foods11010059
- Cartea, M. E., Francisco, M., Abilleira, R., & Velasco, P. (2008). Los glucosinolatos como factor de calidad en las brásicas: degradación desde el campo hasta la mesa. En *Horticultura, Distribución y Alimentación*.
- Cartea, M. E., Francisco, M., Soengas, P., & Velasco, P. (2011). Phenolic compounds in Brassica vegetables. *Molecules*, 16(1), 251-280. doi: 10.3390/molecules16010251
- Castelão-Baptista, J. P., Barros, A., Martins, T., Rosa, E., & Sardão, V. A. (2021). Three in one: The potential of brassica by-products against economic waste, environmental hazard, and metabolic disruption in obesity. *Nutrients*, 13(12), 4194. doi: 10.3390/nu13124194

- Cea Pavez, I., Lozano-Sánchez, J., Borrás-Linares, I., Nuñez, H., Robert, P., & Segura-Carretero, A. (2019). Obtaining an Extract Rich in Phenolic Compounds from Olive Pomace by Pressurized Liquid Extraction. *Molecules*, *24*(17), 3108. Recuperado a partir de <https://doi.org/10.3390/molecules24173108>
- Chemat, F., Vian, M. A., & Cravotto, G. (2012). Green extraction of natural products: Concept and principles. *International Journal of Molecular Sciences*, *13*(7), 8615-8627. doi: 10.3390/ijms13078615
- Chiocchio, I., Mandrone, M., Tomasi, P., Marincich, L., & Poli, F. (2021). Plant secondary metabolites: An opportunity for circular economy. *Molecules*, *26*(2), 495. doi: 10.3390/MOLECULES26020495
- Chiron de la Casinière, A., & Cachorro Revilla, V. E. (2008). La radiación solar en el sistema Tierra-Atmósfera. En Universidad de Valladolid (Número 5).
- Cho, J.-W., Lee, K.-S., & Kim, C.-W. (2007). Curcumin attenuates the expression of IL-1 β , IL-6, and TNF- α as well as cyclin E in TNF- α -treated HaCaT cells; NF- κ B and MAPKs as potential upstream targets. *International Journal of Molecular Medicine*, *19*(3), 469-474. doi: 10.3892/ijmm.19.3.469
- Cianciulli, A., Calvello, R., Cavallo, P., Dragone, T., Carofiglio, V., & Panaro, M. A. (2012). Modulation of NF- κ B activation by resveratrol in LPS treated human intestinal cells results in downregulation of PGE2 production and COX-2 expression. *Toxicology in Vitro*, *26*(7), 1122-1128. doi: 10.1016/j.tiv.2012.06.015
- Colombo, I., Sangiovanni, E., Maggio, R., Mattozzi, C., Zava, S., Corbett, Y., Fumagalli, M., Carlino, C., Corsetto, P. A., Scaccabarozzi, D., Calvieri, S., Gismondi, A., Taramelli, D., & Dell'Agli, M. (2017). HaCaT Cells as a Reliable in Vitro Differentiation Model to Dissect the Inflammatory/Repair Response of Human Keratinocytes. *Mediators of Inflammation*, *2017*. doi: 10.1155/2017/7435621
- Coman, V., Teleky, B. E., Mitrea, L., Martău, G. A., Szabo, K., Călinoiu, L. F., & Vodnar, D. C. (2020). Bioactive potential of fruit and vegetable wastes. *Advances in Food and Nutrition Research*, *91*, 157-225. doi: 10.1016/bs.afnr.2019.07.001
- Costa-Pérez, A., Moreno, D. A., Periago, P. M., & Garc, C. (2022). A New Food Ingredient Rich in Bioaccessible (Poly) Phenols (and Glucosinolates) Obtained from Stabilized Broccoli

Bibliografía

- Stalks. *Foods*, 11(12), 1734.
- Costa, C., Lucera, A., Marinelli, V., Del Nobile, M. A., & Conte, A. (2018). Influence of different by-products addition on sensory and physicochemical aspects of Primosale cheese. *Journal of Food Science and Technology*, 55(10), 4174-4183. doi: 10.1007/s13197-018-3347-z
- da Silva, R. P. F. F., Rocha-Santos, T. A. P., & Duarte, A. C. (2016). Supercritical fluid extraction of bioactive compounds. *Trends in Analytical Chemistry*, 76, 40-51. doi: 10.1016/j.trac.2015.11.013
- Dang, Y., Zhou, T., Hao, L., Cao, J., Sun, Y., & Pan, D. (2019). In Vitro and in Vivo Studies on the Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitory Activity Peptides Isolated from Broccoli Protein Hydrolysate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67(24), 6757-6764. doi: 10.1021/acs.jafc.9b01137
- De La Fuente, B., López-García, G., Mániz, V., Alegría, A., Barberá, R., & Cilla, A. (2020). Antiproliferative Effect of Bioaccessible Fractions of Four Brassicaceae Microgreens on Human Colon Cancer Cells Linked to Their Phytochemical Composition. *Antioxidants*, 9(5), 368. doi: 10.3390/ANTIOX9050368
- De Melo, M. M. R., Silvestre, A. J. D., & Silva, C. M. (2014). Supercritical fluid extraction of vegetable matrices: Applications, trends and future perspectives of a convincing green technology. *Journal of Supercritical Fluids*, 92, 115-176. doi: 10.1016/j.supflu.2014.04.007
- Deng, Q., Zinoviadou, K. G., Galanakis, C. M., Orlie, V., Grimi, N., Vorobiev, E., Lebovka, N., & Barba, F. J. (2015). The Effects of Conventional and Non-conventional Processing on Glucosinolates and Its Derived Forms, Isothiocyanates: Extraction, Degradation, and Applications. *Food Engineering Reviews*, 7, 357-381. doi: 10.1007/s12393-014-9104-9
- Denizot, F., & Lang, R. (1986). Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *Journal of Immunological Methods*, 89(2), 271-277. doi: 10.1016/0022-1759(86)90368-6
- Díaz-Reinoso, B., & Domínguez, H. (2022). Challenges in the extraction of antiinflammatory and antioxidant compounds from new plant sources. En *Current Advances for Development of Functional Foods Modulating Inflammation and Oxidative Stress* (pp. 427-446). doi: 10.1016/b978-0-12-823482-2.00006-6

- Dickinson, S. E., Melton, T. F., Olson, E. R., Zhang, J., Saboda, K., & Bowden, G. T. (2009). Inhibition of activator protein-1 by sulforaphane involves interaction with cysteine in the cFos DNA-binding domain: Implications for chemoprevention of UVB-induced skin cancer. *Cancer Research*, *69*(17), 7103-7110. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-0770/655255/P/INHIBITION-OF-ACTIVATOR-PROTEIN-1-BY-SULFORAPHANE
- Dinkova-Kostova, A. T., & Kostov, R. V. (2012). Glucosinolates and isothiocyanates in health and disease. *Trends in Molecular Medicine*, *18*(6), 337-347. doi: 10.1016/j.molmed.2012.04.003
- Domínguez-Perles, R., Moreno, D. A., & García-Viguera, C. (2012). Analysis of the tumoral cytotoxicity of green tea-infusions enriched with broccoli. *Food Chemistry*, *132*(3), 1197-1206. doi: 10.1016/j.foodchem.2011.11.076
- dos Santos Dias, M. M., Martino, H. S. D., Noratto, G., Roque-Andrade, A., Stringheta, P. C., Talcott, S., Ramos, A. M., & Mertens-Talcott, S. U. (2015). Anti-inflammatory activity of polyphenolics from açai (*Euterpe oleracea* Martius) in intestinal myofibroblasts CCD-18Co cells. *Food and Function*, *6*(10), 3249-3256. doi: 10.1039/c5fo00278h
- Drabińska, N., Ciska, E., Szmatowicz, B., & Krupa-Kozak, U. (2018). Broccoli by-products improve the nutraceutical potential of gluten-free mini sponge cakes. *Food Chemistry*, *267*, 170-177. doi: 10.1016/j.foodchem.2017.08.119
- Eggersdorfer, M., & Wyss, A. (2018). Carotenoids in human nutrition and health. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *652*, 18-26. doi: 10.1016/j.abb.2018.06.001
- Engel, K., Schmidt, U., Reuter, J., Weckesser, S., Simon-Haarhaus, B., & Schempp, C. M. (2007). Usnea barbata extract prevents ultraviolet-B induced prostaglandin E2 synthesis and COX-2 expression in HaCaT keratinocytes. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, *89*(1), 9-14. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2007.08.002
- Esposito, B., Sessa, M. R., Sica, D., & Malandrino, O. (2020). Towards circular economy in the agri-food sector. A systematic literature review. *Sustainability*, *12*(18), 7401. doi: 10.3390/SU12187401
- Fahey, J. W., Haristoy, X., Dolan, P. M., Kensler, T. W., Scholtus, I., Stephenson, K. K., Talalay, P., & Lozniewski, A. (2002). Sulforaphane inhibits extracellular, intracellular, and antibiotic-resistant strains of *Helicobacter pylori* and prevents benzo[a]pyrene-induced stomach

Bibliografía

- tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(11), 7610-7615. doi: 10.1073/pnas.112203099
- FAO. (2015). Food wastage footprint & Climate Change. En Fao (Número 1). Recuperado a partir de <http://www.fao.org/3/a-bb144e.pdf>
- Food and agriculture organization corporate statistical database (FAOSTAT). (s.f.). Recuperado el 14 de julio de 2022 de <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>
- Farnham, M. W., & Kopsell, D. A. (2009). Importance of genotype on carotenoid and chlorophyll levels in broccoli heads. *HortScience*, 44(5), 1248-1253. doi: 10.21273/hortsci.44.5.1248
- Fernandes, F. A., Heleno, S. A., Pinela, J., Caroch, M., Prieto, M. A., Ferreira, I. C. F. R., & Barros, L. (2022). Recovery of Citric Acid from Citrus Peels: Ultrasound-Assisted Extraction Optimized by Response Surface Methodology. *Chemosensors*, 10(7), 257. doi: 10.3390/chemosensors10070257
- Ferreira, S. S., Passos, C. P., Cardoso, S. M., Wessel, D. F., & Coimbra, M. A. (2018). Microwave assisted dehydration of broccoli by-products and simultaneous extraction of bioactive compounds. *Food Chemistry*, 246, 386-393. doi: 10.1016/j.foodchem.2017.11.053
- Ferruzzi, M. G., & Blakeslee, J. (2007). Digestion, absorption, and cancer preventative activity of dietary chlorophyll derivatives. *Nutrition Research*, 27(1), 1-12. doi: 10.1016/J.NUTRES.2006.12.003
- Finley, J. W. (2005). Proposed Criteria for Assessing the Efficacy of Cancer Reduction by Plant Foods Enriched in Carotenoids, Glucosinolates, Polyphenols and Selenocompounds. *Annals of Botany*, 95(7), 1075-1096. doi: 10.1093/AOB/MCI123
- Fraga-Corral, M., Otero, P., Echave, J., Garcia-Oliveira, P., Carpena, M., Jarboui, A., Nuñez-Estevez, B., Simal-Gandara, J., & Prieto, M. A. (2021). By-Products of Agri-Food Industry as Tannin-Rich Sources: A Review of Tannins: Biological Activities and Their Potential for Valorization. *Foods*, 10(1), 137. doi: 10.3390/FOODS10010137
- Franzke, A., Lysak, M. A., Al-Shehbaz, I. A., Koch, M. A., & Mummenhoff, K. (2011). Cabbage family affairs: The evolutionary history of Brassicaceae. *Trends in Plant Science*, 16(2), 108-116. doi: 10.1016/j.tplants.2010.11.005
- Freitas, L. C., Barbosa, J. R., da Costa, A. L. C., Bezerra, F. W. F., Pinto, R. H. H., & Carvalho Junior,

- R. N. de. (2021). From waste to sustainable industry: How can agro-industrial wastes help in the development of new products? *Resources, Conservation and Recycling*, *169*, 105466. doi: 10.1016/j.resconrec.2021.105466
- García, P., Fredes, C., Cea, I., Lozano-Sánchez, J., Leyva-Jiménez, F. J., Robert, P., Vergara, C., & Jimenez, P. (2021). Recovery of Bioactive Compounds from Pomegranate (*Punica granatum* L.) Peel Using Pressurized Liquid Extraction. *Foods*, *10*(2), 203. doi: 10.3390/foods100
- 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. doi: 10.1016/j.foodres.2012.08.010
- Gęgotek, A., & Skrzydlewska, E. (2015). The role of transcription factor Nrf2 in skin cells metabolism. *Archives of Dermatological Research*, *307*(5), 385-396. doi: 10.1007/s00403-015-1554-2
- Geronikaki, A. A., & Gavalas, A. M. (2006). Antioxidants and Inflammatory Disease: Synthetic and Natural Antioxidants with Anti-Inflammatory Activity. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, *9*(6), 425-442. doi: 10.2174/138620706777698481
- Ghosh, S. S., Wang, J., Yannie, P. J., & Ghosh, S. (2020). Intestinal barrier dysfunction, LPS translocation, and disease development. *Journal of the Endocrine Society*, *4*(2), bvz039. doi: 10.1210/jendso/bvz039
- Giada, M. de L. R. (2013). Food Phenolic Compounds: Main Classes, Sources and Their Antioxidant Power. En *Oxidative Stress and Chronic Degenerative Diseases - A Role for Antioxidants* (pp. 87-112). InTech. doi: 10.5772/51687
- Gil, K. A., & Tuberoso, C. I. G. (2021). Crucial challenges in the development of green extraction technologies to obtain antioxidant bioactive compounds from agro-industrial by-products. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, *35*(2), 105-138. doi: 10.15255/CABEQ.2021.1923
- Giroto, F., Alibardi, L., & Cossu, R. (2015). Food waste generation and industrial uses: A review. *Waste Management*, *45*, 32-41. doi: 10.1016/J.WASMAN.2015.06.008
- Godar, D. (2005). UV Doses Worldwide. *Photochemistry and Photobiology*, *81*, 736-749. doi: 10.1562/2004-09-07-ir-308

Bibliografía

- Governa, P., Marchi, M., Cocetta, V., De Leo, B., Saunders, P. T. K., Catanzaro, D., Miraldi, E., Montopoli, M., & Biagi, M. (2018). Effects of *Boswellia Serrata* Roxb. and *Curcuma longa* L. in an In Vitro Intestinal Inflammation Model Using Immune Cells and Caco-2. *Pharmaceuticals*, *11*(4), 126. doi: 10.3390/PH11040126
- Gudiño, I., Martín, A., Casquete, R., Prieto, M. H., Ayuso, M. C., & Córdoba, M. G. (2022). Evaluation of broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) crop by-products as sources of bioactive compounds. *Scientia Horticulturae*, *304*, 111284. doi: 10.1016/J.SCIENTA.2022.111284
- Gupta, P., Ray, J., Aggarwal, B. K., & Goyal, P. (2015). Food Processing Residue Analysis and its Functional Components as Related to Human Health : Recent Developments. *Austin Journal Nutrition and Food Sciences*, *3*(3), 1068.
- Gupta, S., Burman, S., Nair, A. B., Chauhan, S., Sircar, D., Roy, P., Dhanwat, M., Lahiri, D., Mehta, D., Das, R., & Khalil, H. E. (2022). Brassica oleracea Extracts Prevent Hyperglycemia in Type 2 Diabetes Mellitus. *Preventive Nutrition and Food Science*, *27*(1), 50-62. Recuperado a partir de <https://medium.com/@arifwicaksanaa/pengertian-use-case-a7e576e1b6bf>
- Gustinelli, G., Eliasson, L., Svelander, C., Andlid, T., Lundin, L., Ahrné, L., & Alminger, M. (2018). Supercritical Fluid Extraction of Berry Seeds: Chemical Composition and Antioxidant Activity. *Journal of Food Quality*, *2018*, 1-10. doi: 10.1155/2018/6046074
- Guzmán-Pérez, V., Bumke-Vogt, C., Schreiner, M., Mewis, I., Borchert, A., & Pfeiffer, A. F. H. (2016). BenzylglucosinolateDerived Isothiocyanate from *Tropaeolum majus* Reduces Gluconeogenic Gene and Protein Expression in Human Cells. *PLoS ONE*, *11*(9), e0162397. doi: 10.1371/journal.pone.0162397
- Guzman, I., Yousef, G. G., & Brown, A. F. (2012). Simultaneous extraction and quantitation of carotenoids, chlorophylls, and tocopherols in Brassica vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *60*(29), 7238-7244. doi: 10.1021/jf302475d
- Halder, M., Petsophonsakul, P., Akbulut, A. C., Pavlic, A., Bohan, F., Anderson, E., Maresz, K., Kramann, R., & Schurgers, L. (2019). Vitamin K: Double bonds beyond coagulation insights into differences between vitamin K1 and K2 in health and disease. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(4), 896. doi: 10.3390/ijms20040896
- He, C., Deng, J., Hu, X., Zhou, S., Wu, J., Xiao, D., Darko, K. O., Huang, Y., Tao, T., Peng, M., Wang,

- Z., & Yang, X. (2019). Vitamin A inhibits the action of LPS on the intestinal epithelial barrier function and tight junction proteins. *Food and Function*, *10*(2), 1235-1242. doi: 10.1039/c8fo01123k
- Hellin, P., Novo-Uzal, E., Pedreño, M. A., Cava, J., Garrido, I., Molina, M. V., Fenoll, J., & Flores, P. (2016). Impact of plant biostimulants on the production of glucosinolates in broccoli. *Acta Horticulturae*, *1194*, 99-103. doi: 10.17660/ActaHortic.2018.1194.16
- Herr, I., & Büchler, M. W. (2010). Dietary constituents of broccoli and other cruciferous vegetables: Implications for prevention and therapy of cancer. *Cancer Treatment Reviews*, *36*(5), 377-383. doi: 10.1016/j.ctrv.2010.01.002
- Hong, S., Pangloli, P., Perumal, R., Cox, S., Noronha, L. E., Dia, V. P., & Smolensky, D. (2020). A comparative study on phenolic content, antioxidant activity and anti-inflammatory capacity of aqueous and ethanolic extracts of sorghum in lipopolysaccharide-induced raw 264.7 macrophages. *Antioxidants*, *9*(12), 1297. doi: 10.3390/antiox9121297
- Hooper, L., & Cassidy, A. (2006). A review of the health care potential of bioactive compounds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *86*(12), 1805-1813. doi: 10.1002/JSFA.2599
- Huls, G., Koornstra, J. J., & Kleibeuker, J. H. (2003). Non-steroidal anti-inflammatory drugs and molecular carcinogenesis of colorectal carcinomas. *Lancet*, *362*(9379), 230-232. doi: 10.1016/S0140-6736(03)13915-3
- Hussein, M. R. (2005). Ultraviolet radiation and skin cancer: Molecular mechanisms. *Journal of Cutaneous Pathology*, *32*(3), 191-205. doi: 10.1111/j.0303-6987.2005.00281.x
- Hwang, J.-H., & Lim, S.-B. (2015). Antioxidant and anticancer activities of broccoli by-products from different cultivars and maturity stages at harvest. *Preventive Nutrition and Food Science*, *20*(1), 8-14. doi: 10.3746/pnf.2015.20.1.8
- Ishida, M., Hara, M., Fukino, N., Kakizaki, T., & Morimitsu, Y. (2014). Glucosinolate metabolism, functionality and breeding for the improvement of brassicaceae vegetables. *Breeding Science*, *64*(1), 48-59. doi: 10.1270/jsbbs.64.48
- Ismail, T., Calcabrini, C., Diaz, A. R., Fimognari, C., Turrini, E., Catanzaro, E., Akhtar, S., & Sestili, P. (2016). Ellagitannins in cancer chemoprevention and therapy. *Toxins*, *8*(5), 151. doi: 10.3390/toxins8050151

Bibliografía

- Jahangir, M., Kim, H. K., Choi, Y. H., & Verpoorte, R. (2009). Health-Affecting Compounds in *Brassicaceae*. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 8(2), 31-43. doi: 10.1111/j.1541-4337.2008.00065.x
- Jaisin, Y., Ratanachamnong, P., Wongsawatkul, O., Watthammawut, A., Malaniyom, K., & Natewong, S. (2020). Antioxidant and anti-inflammatory effects of piperine on UV-B-irradiated human HaCaT keratinocyte cells. *Life Sciences*, 263, 118607. doi: 10.1016/j.lfs.2020.118607
- Jang, H. W., Moon, J. K., & Shibamoto, T. (2015). Analysis and antioxidant activity of extracts from broccoli (*Brassica oleracea* L.) sprouts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(4), 1169-1174. doi: 10.1021/jf504929m
- Jeffery, E. H., Brown, A. F., Kurilich, A. C., Keck, A. S., Matusheski, N., Klein, B. P., & Juvik, J. A. (2003). Variation in content of bioactive components in broccoli. *Journal of Food Composition and Analysis*, 16(3), 323-330. doi: 10.1016/S0889-1575(03)00045-0
- Jeffery, Elizabeth H., & Araya, M. (2009). Physiological effects of broccoli consumption. *Phytochemistry Reviews*, 8, 283-298. doi: 10.1007/s11101-008-9106-4
- Kammeyer, A., & Luiten, R. M. (2015). Oxidation events and skin aging. *Ageing Research Reviews*, 21, 16-29. doi: 10.1016/j.arr.2015.01.001
- Keck, A. S., & Finley, J. W. (2004). Cruciferous Vegetables: Cancer Protective Mechanisms of Glucosinolate Hydrolysis Products and Selenium. En *Integrative Cancer Therapies* (Vol. 3, Número 1, pp. 5-12). doi: 10.1177/1534735403261831
- Kerns, M. L., DePianto, D., Dinkova-Kostova, A. T., Talalay, P., & Coulombe, P. A. (2007). Reprogramming of keratin biosynthesis by sulforaphane restores skin integrity in epidermolysis bullosa simplex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(36), 14460-14465. doi: 10.1073/pnas.0706486104
- Kim, M. (2022). Anti-inflammatory Effect of Broccoli Leaf Hexane Fraction in LPS-stimulated RAW264.7 Cells. *Journal of The Korea Society of Computer and Information*, 27(1), 175-181.
- Koh, E., Wimalasiri, K. M. S., Chassy, A. W., & Mitchell, A. E. (2009). Content of ascorbic acid, quercetin, kaempferol and total phenolics in commercial broccoli. *Journal of Food Composition and Analysis*, 22(7-8), 637-643. doi: 10.1016/j.jfca.2009.01.019

- Kojima, M., Morisaki, T., Izuhara, K., Uchiyama, A., Matsunari, Y., Katano, M., & Tanaka, M. (2000). Lipopolysaccharide increases cyclo-oxygenase-2 expression in a colon carcinoma cell line through nuclear factor- κ B activation. *Oncogene*, *19*(9), 1225-1231. doi: 10.1038/sj.onc.1203427
- Krupa-Kozak, U., Drabińska, N., Baczek, N., Šimková, K., Starowicz, M., & Jeliński, T. (2021). Application of broccoli leaf powder in gluten-free bread: An innovative approach to improve its bioactive potential and technological quality. *Foods*, *10*(4), 819. doi: 10.3390/foods10040819
- Kubo, E., Chhunchha, B., Singh, P., Sasaki, H., & Singh, D. P. (2017). Sulforaphane reactivates cellular antioxidant defense by inducing Nrf2/ARE/Prdx6 activity during aging and oxidative stress. *Scientific Reports*, *7*(1), 1-17. doi: 10.1038/s41598-017-14520-8
- Kumar, A., Agarwal, K., Singh, M., Saxena, A., Yadav, P., Maurya, A. K., Yadav, A., Tandon, S., Chanda, D., & Bawankule, D. U. (2018). Essential oil from waste leaves of *Curcuma longa* L. alleviates skin inflammation. *Inflammopharmacology*, *26*(5), 1245-1255. doi: 10.1007/s10787-018-0447-3
- Lafarga, T., Gallagher, E., Bademunt, A., Viñas, I., Bobo, G., Villaró, S., & Aguiló-Aguayo, I. (2019b). Bioaccessibility, physicochemical, sensorial, and nutritional characteristics of bread containing broccoli co-products. *Journal of Food Processing and Preservation*, *43*(2), e13861. doi: 10.1111/jfpp.13861
- Lafarga, T., Gallagher, E., Bademunt, A., Viñas, I., Bobo, G., Villaró, S., & Aguiló-Aguayo, I. (2019a). Physicochemical and nutritional characteristics, bioaccessibility and sensory acceptance of baked crackers containing broccoli co-products. *International Journal of Food Science and Technology*, *54*(3), 634-640. doi: 10.1111/ijfs.13908
- Lanfer-Marquez, U. M., Barros, R. M. C., & Sinnecker, P. (2005). Antioxidant activity of chlorophylls and their derivatives. *Food Research International*, *38*(8-9), 885-891. doi: 10.1016/J.FOODRES.2005.02.012
- Le, T. N., Chiu, C., & Hsieh, P. (2020a). Bioactive Compounds and Bioactivities of *Brassica oleracea* L. var. *Italica* Sprouts and Microgreens: An Updated Overview from a Nutraceutical Perspective. *Plants*, *9*(8), 946.
- Le, T. N., Sakulsataporn, N., Chiu, C. H., & Hsieh, P. C. (2020). Polyphenolic Profile and Varied

Bibliografía

- Bioactivities of Processed Taiwanese Grown Broccoli: A Comparative Study of Edible and Non-Edible Parts. *Pharmaceuticals*, 13(5), 82. doi: 10.3390/PH13050082
- Lee, K. B., Kim, Y. J., Kim, H. J., Choi, J., & Kim, J. K. (2018). Phytochemical profiles of Brassicaceae vegetables and their multivariate characterization using chemometrics. *Applied Biological Chemistry*, 61(2), 131-144. doi: 10.1007/s13765-017-0340-6
- Lee, K. S., Cho, E., Weon, J. B., Park, D., Fréchet, M., Chajra, H., & Jung, E. (2020). Inhibition of UVB-induced inflammation by laminaria japonica extract via regulation of nc886-PKR pathway. *Nutrients*, 12(7), 1958. doi: 10.3390/nu12071958
- Lee, Y.-S., Ku, K.-M., Becker, T. M., & Juvik, J. A. (2017). Chemopreventive glucosinolate accumulation in various broccoli and collard tissues: Microfluidic-based targeted transcriptomics for by-product valorization. *PLoS ONE*, 12(9), e0185112. doi: 10.1371/journal.pone.0185112
- Lei, P., Tian, S., Teng, C., Huang, L., Liu, X., Wang, J., Zhang, Y., Li, B., & Shan, Y. (2019). Sulforaphane Improves Lipid Metabolism by Enhancing Mitochondrial Function and Biogenesis In Vivo and In Vitro. *Molecular Nutrition and Food Research*, 63(4), 1800795. doi: 10.1002/mnfr.201800795
- Lembo, S., Balato, A., Di Caprio, R., Cirillo, T., Giannini, V., Gasparri, F., & Monfrecola, G. (2014). The modulatory effect of ellagic acid and rosmarinic acid on ultraviolet-B-induced cytokine/chemokine gene expression in skin keratinocyte (HaCaT) cells. *BioMed Research International*, 2014. doi: 10.1155/2014/346793
- Leyva-Jiménez, F. J., Fernández-Ochoa, Á., Cádiz-Gurrea, M. de la L., Lozano-Sánchez, J., Oliver-Simancas, R., Alañón, M. E., Castangia, I., Segura-Carretero, A., & Arráez-Román, D. (2022). Application of Response Surface Methodologies to Optimize High-Added Value Products Developments: Cosmetic Formulations as an Example. *Antioxidants*, 11(8), 1552. doi: 10.3390/antiox11081552
- Li, H. Y., Zhang, F. R., & Deng, D. Q. (2015). Relationship between UV-irradiated HaCaT cell cytokines and Th1/Th2 imbalance. *Genetics and Molecular Research*, 14(3), 7976-7985. doi: 10.4238/2015.July.17.5
- Li, Y., Won, K. J., Kim, D. Y., Kim, H. Bin, Kang, H. M., Lee, S. Y., & Lee, H. M. (2021). Positive Promoting Effects of Smilax China Flower Absolute on the Wound Healing/Skin Barrier

- Repair-Related Responses of HaCaT Human Skin Keratinocytes. *Chemistry and Biodiversity*, 18(4), e2001051. doi: 10.1002/cbdv.202001051
- Ligęza, M., Wyglądacz, D., Tobiasz, A., Jaworecka, K., & Reich, A. (2016). Natural cold pressed oils as cosmetic products. *Family Medicine and Primary Care Review*, 18(4), 443-447. doi: 10.5114/fmpcr.2016.63699
- Lin, J. Y., Tournas, J. A., Burch, J. A., Monteiro-Riviere, N. A., & Zielinski, J. (2008). Topical isoflavones provide effective photoprotection to skin. *Photodermatology Photoimmunology and Photomedicine*, 24(2), 61-66. doi: 10.1111/j.1600-0781.2008.00329.x
- Lippmann, D., Lehmann, C., Florian, S., Barknowitz, G., Haack, M., Mewis, I., Wiesner, M., Schreiner, M., Glatt, H., Brigelius-Flohé, R., & Kipp, A. P. (2014). Glucosinolates from pak choi and broccoli induce enzymes and inhibit inflammation and colon cancer differently. *Food and Function*, 5(6), 1073-1081. doi: 10.1039/c3fo60676g
- Liu, M., Zhang, L., Ser, S. L., Cumming, J. R., & Ku, K. M. (2018). Comparative phytonutrient analysis of broccoli by-products: The potentials for broccoli by-product utilization. *Molecules*, 23(4), 900. doi: 10.3390/molecules23040900
- Liu, S., Guo, C., Wu, D., Ren, Y., Sun, M. Z., & Xu, P. (2012). Protein indicators for HaCaT cell damage induced by UVB irradiation. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 114, 94-101. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2012.05.015
- Liyana-Pathirana, C., & Shahidi, F. (2005). Optimization of extraction of phenolic compounds from wheat using response surface methodology. *Food Chemistry*, 93(1), 47-56. doi: 10.1016/j.foodchem.2004.08.050
- López-Berenguer, C., Martínez-Ballesta, M. D. C., Moreno, D. A., Carvajal, M., & García-Viguera, C. (2009). Growing hardier crops for better health: Salinity tolerance and the nutritional value of broccoli. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(2), 572-578. doi: 10.1021/jf802994p
- Lucera, A., Costa, C., Marinelli, V., Saccotelli, M. A., Del Nobile, M. A., & Conte, A. (2018). Fruit and Vegetable By-Products to Fortify Spreadable Cheese. *Antioxidants*, 7(5), 61. doi: 10.3390/ANTIOX7050061

Bibliografía

- Lysak, M. A., & Koch, M. A. (2010). Phylogeny, Genome, and Karyotype Evolution of Crucifers (Brassicaceae). En *Genetics and Genomics of the Brassicaceae* (pp. 1-31). doi: 10.1007/978-1-4419-7118-0
- Ma, H., Huang, Q., Qu, W., Li, L., Wang, M., Li, S., & Chu, F. (2018). In vivo and in vitro anti-inflammatory effects of *Sophora flavescens* residues. *Journal of Ethnopharmacology*, 224, 497-503. doi: 10.1016/j.jep.2018.06.019
- Manna, L., Bugnone, C. A., & Banchemo, M. (2015). Valorization of hazelnut, coffee and grape wastes through supercritical fluid extraction of triglycerides and polyphenols. *Journal of Supercritical Fluids*, 104, 204-211. doi: 10.1016/j.supflu.2015.06.012
- Mansuri, R., Diwan, A., Kumar, H., Dangwal, K., & Yadav, D. (2021). Potential of Natural Compounds as Sunscreen Agents. *Pharmacognosy Reviews*, 15(29), 47-56. doi: 10.5530/phrev.2021.15.5
- Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA). (s.f.) Recuperado el 16 de julio de 2022 de <https://www.mapa.gob.es/es/estadistica/temas/estadisticas-agrarias/agricultura/superficies-producciones-anuales-cultivos/>
- Martínez-Ballesta, M. C., Dominguez-Perles, R., Moreno, D. A., Muries, B., Alcaraz-López, C., Bastías, E., García-Viguera, C., & Carvajal, M. (2010). Minerals in plant food: Effect of agricultural practices and role in human health. A review. En *Agronomy for Sustainable Development* (Vol. 30, Número 2, pp. 295-309). doi: 10.1051/agro/2009022
- Martinez-Gonzalez, M. A., & Martín-Calvo, N. (2016). Mediterranean diet and life expectancy; beyond olive oil, fruits and vegetables. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*, 19(6), 401-407. doi: 10.1097/MCO
- Martins, T., Colaço, B., Venâncio, C., Pires, M. J., Oliveira, P. A., Rosa, E., & Antunes, L. M. (2018). Potential effects of sulforaphane to fight obesity. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98(8), 2837-2844. doi: 10.1002/jsfa.8898
- Mateos-Aparicio, I. (2020). Plant-based by-products. En *Food Waste Recovery* (pp. 367-397). INC. doi: 10.1016/B978-0-12-820563-1.00022-6
- Mayeux, P. R. (1997). Pathobiology of lipopolysaccharide. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 51(5), 415-435. doi: 10.1080/00984109708984034

- Mazumder, A., Dwivedi, A., Du Preez, J. L., & Du Plessis, J. (2016). In vitro wound healing and cytotoxic effects of sinigrin-phytosome complex. *International Journal of Pharmaceutics*, 498(1-2), 283-293. doi: 10.1016/j.ijpharm.2015.12.027
- Mi, L., Wang, X., Govind, S., Hood, B. L., Veenstra, T. D., Conrads, T. P., Saha, D. T., Goldman, R., & Chung, F. L. (2007). The Role of Protein Binding in Induction of Apoptosis by Phenethyl Isothiocyanate and Sulforaphane in Human Non-Small Lung Cancer Cells. *Cancer Research*, 67(13), 6409-6416. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-0340
- Miras-Moreno, B., Sabater-Jara, A. B., Pedreno, M. A., & Almagro, L. (2016). Bioactivity of Phytosterols and Their Production in Plant in Vitro Cultures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(38), 7049-7058. doi: 10.1021/ACS.JAFC.6B02345/ASSET/IMAGES/MEDIUM/JF-2016-02345M_0004.GIF
- Mishra, V. K., Kumar Bachheti, R., Husen, A., Mishra, V. K., & Bacheti, R. K. (2011). Medicinal Uses of Chlorophyll: A Critical Overview. En *Chlorophyll: Structure, function and medicinal uses* (pp. 177-196). Recuperado a partir de https://www.novapublishers.com/catalog/product_info.php?products_id=22468
- Mithen, R. F., Dekker, M., Verkerk, R., Rabot, S., & Johnson, I. T. (2000). The nutritional significance, biosynthesis and bioavailability of glucosinolates in human foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(7), 967-984. doi: 10.1002/(sici)1097-0010(20000515)80:7<967::aid-jsfa597>3.3.co;2-m
- Monfrecola, G., Gaudiello, F., Cirillo, T., Fabbrocini, G., Balato, A., & Lembo, S. (2013). Nicotinamide downregulates gene expression of interleukin-6, interleukin-10, monocyte chemoattractant protein-1, and tumour necrosis factor- α gene expression in HaCaT keratinocytes after ultraviolet B irradiation. *Clinical and Experimental Dermatology*, 38(2), 185-188. doi: 10.1111/ced.12018
- Monllor, P., Romero, G., Muelas, R., Sandoval-Castro, C. A., Sendra, E., & Díaz, J. R. (2020). Ensiling process in commercial bales of horticultural by-products from artichoke and broccoli. *Animals*, 10(5), 831. doi: 10.3390/ani10050831
- 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. doi:

Bibliografía

10.1016/j.jpba.2006.04.003

Moreno, D. A., & Garcia-Viguera, C. (2008). El brócoli fuente de ingredientes funcionales: glucosinolatos. *ALIMENTACION, NUTRICION Y SALUD*, 15(2), 49-53. Recuperado a partir de <https://www.researchgate.net/publication/28227811>

Mueller, K., Blum, N. M., & Mueller, A. S. (2013). Examination of the Anti-Inflammatory, Antioxidant, and Xenobiotic-Inducing Potential of Broccoli Extract and Various Essential Oils during a Mild DSS-Induced Colitis in Rats. *International Scholarly Research Notices Gastroenterology*, 2013. doi: 10.1155/2013/710856

Muniandy, K., Gothai, S., Tan, W. S., Suresh Kumar, S., Mohd Esa, N., Chandramohan, G., Al-Numair, K. S., & Arulsevan, P. (2018). In Vitro Wound Healing Potential of Stem Extract of *Alternanthera sessilis*. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2018. doi: 10.1155/2018/3142073

Murray, J. C., Burch, J. A., Streilein, R. D., Iannacchione, M. A., Hall, R. P., & Pinnell, S. R. (2008). A topical antioxidant solution containing vitamins C and E stabilized by ferulic acid provides protection for human skin against damage caused by ultraviolet irradiation. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 59(3), 418-425. doi: 10.1016/j.jaad.2008.05.004

Nagraj, G. S., Chouksey, A., Jaiswal, S., & Jaiswal, A. K. (2020). Broccoli. En *Nutritional Composition and Antioxidant Properties of Fruits and Vegetables* (pp. 5-17). doi: 10.1016/B978-0-12-812780-3.00001-5

Narayanan, D. L., Saladi, R. N., & Fox, J. L. (2010). Ultraviolet radiation and skin cancer. *International Journal of Dermatology*, 49(9), 978-986. doi: 10.1111/j.1365-4632.2010.04474.x

Nastić, N., Borrás-Linares, I., Lozano-Sánchez, J., Švarc-Gajić, J., & Segura-Carretero, A. (2020). Comparative Assessment of Phytochemical Profiles of Comfrey (*Symphytum officinale* L.) Root Extracts Obtained by Different Extraction Techniques. *Molecules*, 25(4), 837. doi: 10.3390/molecules25040837

Nicolas-Espinosa, J., Yepes-Molina, L., & Carvajal, M. (2022). Bioactive peptides from broccoli stems strongly enhance regenerative keratinocytes by stimulating controlled proliferation. *Pharmaceutical Biology*, 60(1), 235-246. doi: 10.1080/13880209.2021.2009522/SUPPL_FILE/IPHB_A_2009522_SM4544.DOCX

- Nishigori, C., Hattori, Y., & Toyokuni, S. (2004). Role of Reactive Oxygen Species in Skin Carcinogenesis. *Antioxidants and Redox Signaling*, 6(3), 561-570. doi: 10.1111/j.1475-4959.2010.00371.x
- Oh, J. H., Karadeniz, F., Lee, J. I., Seo, Y., & Kong, C. S. (2019). Protective effect of 3,5-dicaffeoyl-epi-quinic acid against UVB-induced photoaging in human HaCaT keratinocytes. *Molecular Medicine Reports*, 20(1), 763-770. doi: 10.3892/mmr.2019.10258
- Osorio, L. L. D. R., Flórez-López, E., & Grande-Tovar, C. D. (2021). The potential of selected agri-food loss and waste to contribute to a circular economy: Applications in the food, cosmetic and pharmaceutical industries. *Molecules*, 26(2). doi: 10.3390/molecules26020515
- Owis, A. I. (2015). Broccoli; The Green Beauty: A Review. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 7(9), 696-703.
- Park, E. K., Lee, H. J., Lee, H., Kim, J. H., Hwang, J., Koo, J. Il, & Kim, S. H. (2018). The anti-wrinkle mechanism of melatonin in UVB treated HaCaT keratinocytes and hairless mice via inhibition of ROS and sonic hedgehog mediated inflammatory proteins. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(7), 1995. doi: 10.3390/ijms19071995
- Park, J., Seok, J. K., Suh, H. J., & Boo, Y. C. (2014). Gardenia jasminoides extract attenuates the UVB-induced expressions of cytokines in keratinocytes and indirectly inhibits matrix metalloproteinase-1 expression in human dermal fibroblasts. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2014. doi: 10.1155/2014/429246
- Park, K., & Lee, J. H. (2008). Protective effects of resveratrol on UVB-irradiated HaCaT cells through attenuation of the caspase pathway. *Oncology Reports*, 19(2), 413-417. doi: 10.3892/or.19.2.413
- Park, Y., & Jang, B. C. (2014). UVB-induced anti-survival and pro-apoptotic effects on HaCaT human keratinocytes via caspase- and PKC-dependent downregulation of PKB, HIAP-1, Mcl-1, XIAP and ER stress. *International Journal of Molecular Medicine*, 33(3), 695-702. doi: 10.3892/ijmm.2013.1595
- Pellicanò, T. M., Sicari, V., Loizzo, M. R., Leporini, M., Falco, T., & Poiana, M. (2019). Optimizing the supercritical fluid extraction process of bioactive compounds from processed tomato skin by-products. *Food Science and Technology*, 40(3), 692-697. doi: 10.1590/fst.16619

Bibliografía

- Peng, C., Wu, C., Xu, X., Pan, L., Lou, Z., Zhao, Y., Jiang, H., He, Z., & Ruan, B. (2021). Indole-3-carbinol ameliorates necroptosis and inflammation of intestinal epithelial cells in mice with ulcerative colitis by activating aryl hydrocarbon receptor. *Experimental Cell Research*, *404*(2), 112638. doi: 10.1016/j.yexcr.2021.112638
- Piechowiak, T., Skóra, B., Grzelak-Błaszczak, K., & Sójka, M. (2021). Extraction of Antioxidant Compounds from Blueberry Fruit Waste and Evaluation of Their In Vitro Biological Activity in Human Keratinocytes (HaCaT). *Food Analytical Methods*, *14*(11), 2317-2327. doi: 10.1007/S12161-021-02056-7/FIGURES/2
- Podsdek, A. (2007). Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: A review. *Lwt*, *40*(1), 1-11. doi: 10.1016/j.lwt.2005.07.023
- Porter, Y. (2012). Antioxidant properties of green broccoli and purple-sprouting broccoli under different cooking conditions. *Bioscience Horizons: The International Journal of Student Research*, *5*. doi: 10.1093/biohorizons/hzs004
- Proexport. (s.f.). Recuperado el 17 de julio 2022 de <https://www.proexport.es/agrocifras-coles/>
- Raiola, A., Errico, A., Petruk, G., Monti, D. M., Barone, A., & Rigano, M. M. (2018). Bioactive compounds in brassicaceae vegetables with a role in the prevention of chronic diseases. *Molecules*, *23*(1), 15. doi: 10.3390/molecules23010015
- Ramírez, D., Abellán-Victorio, A., Beretta, V., Camargo, A., & Moreno, D. A. (2020). Functional Ingredients From Brassicaceae Species: Overview and Perspectives. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(6), 1998. doi: 10.3390/IJMS21061998
- Ranaweera, S. S., Natraj, P., Rajan, P., Dayarathne, L. A., Mihindukulasooriya, S. P., Dinh, D. T. T., Jee, Y., & Han, C. H. (2022). Anti-obesity effect of sulforaphane in broccoli leaf extract on 3T3-L1 adipocytes and ob/ob mice. *Journal of Nutritional Biochemistry*, *100*, 108885. doi: 10.1016/j.jnutbio.2021.108885
- Reche, C., Rosselló, C., Umaña, M. M., Eim, V., & Simal, S. (2021). Mathematical modelling of ultrasound-assisted extraction kinetics of bioactive compounds from artichoke by-products. *Foods*, *10*(5), 931. doi: 10.3390/foods10050931
- Región de Murcia Digital. (s.f.). Recuperado el 16 de julio de 2022 de <https://www.regmurcia.com/servlet/s.SI?sit=c,543,m,2714&r=ReP-20160->

[DETALLE REPORTAJESPADRE](#)

- Rizvi, S., Raza, S. T., Ahmed, F., Ahmad, A., Abbas, S., & Mahdi, F. (2014). The role of Vitamin E in human health and some diseases. *Sultan Qaboos University Medical Journal*, 14(2), 157-165.
- Rodríguez García, S. L., & Raghavan, V. (2022). Microwave-Assisted Extraction of Phenolic Compounds from Broccoli (*Brassica oleracea*) Stems, Leaves, and Florets: Optimization, Characterization, and Comparison with Maceration Extraction. *Recent Progress in Nutrition*, 2(2), 1-20. doi: 10.21926/rpn.2202011
- Ryšavá, A., Čížková, K., Franková, J., Roubalová, L., Ulrichová, J., Vostálová, J., Vrba, J., Zálešák, B., & Rajnochová Svobodová, A. (2020). Effect of UVA radiation on the Nrf2 signalling pathway in human skin cells. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 209, 111948. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2020.111948
- Sabater-Jara, A. B., & Pedreño, M. A. (2013). Use of b-cyclodextrins to enhance phytosterol production in cell suspension cultures of carrot (*Daucus carota* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 114, 249-258. doi: 10.1007/s11240-013-0320-4
- Sammulia, S. F., Almahdy, A., & Rezky, A. W. (2020). Effect of Broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*) Extract on Bleeding Time in Male White Mice (*Mus musculus* L.). *Borneo Journal of Pharmacy*, 3(1), 1-6. doi: 10.33084/bjop.v3i1.1246
- Samuel, L. M., As, F., & Khiong, K. (2015). Effect of steamed broccoli juice (*Brassica oleracea* L. var. *italica*) to the serum interleukin 8 level in colitis murine model. *The Indonesian Journal of Gastroenterology, Hepatology, and Digestive Endoscopy*, 16(3), 148-152.
- Sánchez-Mesa, N., Sepúlveda-Valencia, J. U., Ciro-Velásquez, H. J., & Meireles, M. A. (2020). Bioactive compounds from mango peel (*Mangifera indica* L. var. Tommy Atkins) obtained by supercritical fluids and pressurized liquids extraction. *Revista Mexicana de Ingeniera Quimica*, 19(2), 755-766. doi: 10.24275/rmiq/Alim657
- Sánchez-Pujante, P. J., Borja-Martínez, M., Pedreño, M. Á., & Almagro, L. (2017). Biosynthesis and bioactivity of glucosinolates and their production in plant in vitro cultures. *Planta*, 246(1), 19-32. doi: 10.1007/s00425-017-2705-9
- Sangeetha, R. K., & Baskaran, V. (2010). Carotenoid composition and retinol equivalent in plants

Bibliografía

- of nutritional and medicinal importance: Efficacy of β -carotene from *Chenopodium album* in retinol-deficient rats. *Food Chemistry*, 119(4), 1584-1590. doi: 10.1016/j.foodchem.2009.09.047
- Sanlier, N., & Guler, S. M. (2018). The Benefits of Brassica Vegetables on Human Health. *Journal of Human Health Resesearch*, 1(1), 104. Recuperado a partir de www.scholarena.com
- Scarano, P., Sciarrillo, R., Tartaglia, M., Zuzolo, D., & Guarino, C. (2022). Circular economy and secondary raw materials from fruits as sustainable source for recovery and reuse. A review. *Trends in Food Science and Technology*, 122, 157-170. doi: 10.1016/j.tifs.2022.02.003
- Selvamuthukumar, M., & Shi, J. (2017). Recent advances in extraction of antioxidants from plant by-products processing industries. *Food Quality and Safety*, 1(1), 61-81. doi: 10.1093/fqs/fyx004
- Senthilkumar, K., Naveen Kumar, M., Chitra Devi, V., Saravanan, K., & Easwaramoorthi, S. (2020). Agro-Industrial Waste Valorization to Energy and Value Added Products for Environmental Sustainability. En *Biomass valorization to bioenergy* (pp. 1-9). doi: 10.1007/978-981-15-0410-5_1
- Seo, S. H., & Jeong, G. S. (2015). Fisetin inhibits TNF- α -induced inflammatory action and hydrogen peroxide-induced oxidative damage in human keratinocyte HaCaT cells through PI3K/AKT/Nrf-2-mediated heme oxygenase-1 expression. *International Immunopharmacology*, 29(2), 246-253. doi: 10.1016/j.intimp.2015.11.014
- Shi, M., Hlaing, M. M., Ying, D. Y., Ye, J. H., Sanguansri, L., & Augustin, M. A. (2019). New food ingredients from broccoli by-products: physical, chemical and technological properties. *International Journal of Food Science and Technology*, 54(4), 1423-1432. doi: 10.1111/ijfs.14111
- Shibata, A., Nakagawa, K., Yamanoi, H., Tsuduki, T., Sookwong, P., Higuchi, O., Kimura, F., & Miyazawa, T. (2010). Sulforaphane suppresses ultraviolet B-induced inflammation in HaCaT keratinocytes and HR-1 hairless mice. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 21(8), 702-709. doi: 10.1016/j.jnutbio.2009.04.007
- Shin, S. W., Jung, E., Kim, S., Kim, J. H., Kim, E. G., Lee, J., & Park, D. (2013). Antagonizing Effects and Mechanisms of Afzelin against UVB-Induced Cell Damage. *PLOS ONE*, 8(4), e61971. doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0061971

- Simitzis, P. E. (2018). Agro-industrial by-products and their bioactive compounds-An ally against oxidative stress and skin aging. *Cosmetics*, 5(4), 58. doi: 10.3390/cosmetics5040058
- Singh, J., Upadhyay, A. K., Prasad, K., Bahadur, A., & Rai, M. (2007). Variability of carotenes, vitamin C, E and phenolics in Brassica vegetables. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20(2), 106-112. doi: 10.1016/j.jfca.2006.08.002
- Singh, K., Connors, S. L., Macklin, E. A., Smith, K. D., Fahey, J. W., Talalay, P., & Zimmerman, A. W. (2014). Sulforaphane treatment of autism spectrum disorder (ASD). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(43), 15550-15555. doi: 10.1073/pnas.1416940111
- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152-178. doi: 10.1016/S0076-6879(99)99017-1
- Singu, S., Malgi, R. S., Panigrahy, P., & Konde, A. (2019). Formulation and Evaluation of Herbal Lipstick from Broccoli Flower Extract and Analytical Bioactive Characterization and Quantification. *International Journal of Innovative Science and Research Technology*, 4(11), 407-414. Recuperado a partir de www.ijisrt.com407
- Song, J.-L., & Gao, Y. (2014). Protective Effects of *Lindera coreana* on UVB-induced Oxidative Stress in Human HaCaT Keratinocytes. *Iranian journal of pharmaceutical research*, 13(4), 1369-1378. Recuperado a partir de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25587326><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4232803>
- Spigno, G., Tramelli, L., & De Faveri, D. M. (2007). Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *Journal of Food Engineering*, 81(1), 200-208. doi: 10.1016/J.JFOODENG.2006.10.021
- Strati, I. F., & Oreopoulou, V. (2014). Recovery of carotenoids from tomato processing by-products - A review. *Food Research International*, 65, 311-321. doi: 10.1016/J.FOODRES.2014.09.032
- Sultana, B., Anwar, F., & Ashraf, M. (2009). Effect of Extraction Solvent/Technique on the Antioxidant Activity of Selected Medicinal Plant Extracts. *Molecules*, 14(6), 2167-2180. doi: 10.3390/MOLECULES14062167

Bibliografia

- Sumanta, N., Imranul Haque, C., Nishika, J., & Suprakash, R. (2014). Spectrophotometric Analysis of Chlorophylls and Carotenoids from Commonly Grown Fern Species by Using Various Extracting Solvents. *Research Journal of Chemical Sciences*, *4*(9), 63-69.
- Sun, Y., Liu, D., Chen, J., Ye, X., & Yu, D. (2011). Effects of different factors of ultrasound treatment on the extraction yield of the all-trans- β -carotene from citrus peels. *Ultrasonics Sonochemistry*, *18*(1), 243-249. doi: 10.1016/J.ULTSONCH.2010.05.014
- Svobodova, A., Walterova, D., & Vostalova, J. (2006). Ultraviolet light induced alteration to the skin. *Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacký, Olomouc, Czechoslovakia*, *150*(1), 25-38. doi: 10.5507/bp.2006.003
- Takasawa, R., Nakamura, H., Mori, T., & Tanuma, S. (2005). Differential apoptotic pathways in human keratinocyte HaCaT cells exposed to UVB and UVC. *Apoptosis*, *10*(5), 1121-1130. doi: 10.1007/s10495-005-0901-8
- Tanaka, T., Horiuchi, G., Matsuoka, M., Hirano, K., Tokumura, A., Koike, T., & Satouchi, K. (2009). Formation of lysophosphatidic acid, a wound-healing lipid, during digestion of cabbage leaves. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, *73*(6), 1293-1300. doi: 10.1271/bbb.80813
- Thomas, M., Badr, A., Desjardins, Y., Gosselin, A., & Angers, P. (2018). Characterization of industrial broccoli discards (*Brassica oleracea* var. *italica*) for their glucosinolate, polyphenol and flavonoid contents using UPLC MS/MS and spectrophotometric methods. *Food Chemistry*, *245*, 1204-1211. doi: 10.1016/j.foodchem.2017.11.021
- Tian, Q., Xu, Z., Sun, Q., Bravo Iniguez, A., Du, M., & Zhu, M. (2022). Broccoli-Derived Glucoraphanin Activates AMPK / PGC1 α / NRF2 Pathway and Ameliorates Dextran-Sulphate-Sodium-Induced Colitis in Mice. *Antioxidants*, *11*, 2404.
- Tomczyk, M., Paduch, R., Wiater, A., Pleszczynska, M., Kandefer-Szerszen, M., & Szczodrak, J. (2013). The influence of extracts from *Potentilla* species on normal human colon cells. *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research*, *70*(3), 523-531. doi: 10.1055/s-0031-1282911
- Tumer, T. B., Rojas-Silva, P., Poulev, A., Raskin, I., & Waterman, C. (2015). Direct and Indirect Antioxidant Activity of Polyphenol- and Isothiocyanate-Enriched Fractions from *Moringa oleifera*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *63*(5), 1505-1513. doi: 10.1021/jf505014n.Direct

- Turkoglu, M., Pekmezci, E., Kilic, S., Dundar, C., & Sevinc, H. (2017). Effect of *Ficus carica* leaf extract on the gene expression of selected factors in HaCaT cells. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 16(4), e54-e58. doi: 10.1111/jocd.12344
- United States Department of Agriculture, [USDA]. Recuperado el 27 de octubre de 2022 de <https://fdc.nal.usda.gov/fdc-app.html#/food-details/170379/nutrients>
- United States Environmental Protection Agency [EPA] (s.f.). Recuperado el 15 de mayo 2022 de <https://www.epa.gov/greenchemistry/basics-green-chemistry#definition>
- United States Food and Drug Administration [FDA], 2004. Recuperado el 13 de agosto de 2022 de <https://www.cfsanappsexternal.fda.gov/scripts/fdcc/?set=GRASNotices>
- Valcárcel, J. A. (1767). Agricultura general y gobierno de la casa de campo... en que por estenso se trata de todos lo bienes del campo: con los nuevos descubrimientos y metodos de cultivo para la multiplicacion de los granos, del aumento en la cria de ganados y en lo demas dependiente de una casa de campo (Vol. 3). por Joseph Estevan Donz.
- Vallejo, F., Tomás-Barberán, F. A., & García-Viguera, C. (2002). Potential bioactive compounds in health promotion from broccoli cultivars grown in Spain. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82(11), 1293-1297. doi: 10.1002/jsfa.1183
- Vargas-Rincón, C., Sánchez-León, G., & Jiménez-Morales, P. (2014). La Producción de Metabolitos Secundarios en la Familia Brassicaceae. *Revista Facultad de Ciencias Básicas*, 9(2), 282-305. doi: 10.18359/rfcb.388
- Varvara, M., Bozzo, G., Celano, G., Disanto, C., Pagliarone, C. N., & Celano, G. V. (2016). The use of ascorbic acid as a food additive: technical-legal issues. *Italian Journal of Food Safety*, 5, 4313. doi: 10.4081/ijfs.2016.4313
- Vasanthi, H. R., Mukherjee, S., & Das, D. K. (2009). Potential Health Benefits of Broccoli- A Chemico-Biological Overview. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 9(6), 749-759.
- Vega, P. J., Balaban, M. O., Sims, C. A., O'Keefe, S. F., & Cornell, J. A. (1996). Supercritical carbon dioxide extraction efficiency for carotenes from carrots by RSM. *Journal of Food Science*, 61(4), 757-759. doi: 10.1111/j.1365-2621.1996.tb12198.x
- Venancio, V. P., Cipriano, P. A., Kim, H., Antunes, L. M. G., Talcott, S. T., & Mertens-Talcott, S. U. (2017). *Cocoplum (Chrysobalanus icaco L.)* anthocyanins exert anti-inflammatory activity

Bibliografía

- in human colon cancer and non-malignant colon cells. *Food and Function*, 8(1), 307-314. doi: 10.1039/c6fo01498d
- Verkerk, R., Schreiner, M., Krumbein, A., Ciska, E., Holst, B., Rowland, I., de Schrijver, R., Hansen, M., Gerhäuser, C., Mithen, R., & 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(S2), S219-S265. doi: 10.1002/mnfr.200800065
- Vostálová, J., Zdařilová, A., & Svobodová, A. (2010). Prunella vulgaris extract and rosmarinic acid prevent UVB-induced DNA damage and oxidative stress in HaCaT keratinocytes. *Archives of Dermatological Research*, 302(3), 171-181. doi: 10.1007/s00403-009-0999-6
- Wang, Y., Jeffery, E. H., Miller, M. J., Wallig, M. A., & Wu, Y. (2018). Lightly cooked broccoli is as effective as raw broccoli in mitigating dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. *Nutrients*, 10(6), 748. doi: 10.3390/nu10060748
- Wei, L., Wang, J., Yan, L., Shui, S., Wang, L., Zheng, W., Liu, S., Liu, C., & Zheng, L. (2020). Sulforaphane attenuates 5-fluorouracil induced intestinal injury in mice. *Journal of Functional Foods*, 69, 103965. doi: 10.1016/j.jff.2020.103965
- Wijngaard, H., Hossain, M. B., Rai, D. K., & Brunton, N. (2012). Techniques to extract bioactive compounds from food by-products of plant origin. *Food Research International*, 46(2), 505-513. doi: 10.1016/j.foodres.2011.09.027
- Wu, X.-X., Huang, X.-L., Chen, R.-R., Li, T., Ye, H.-J., Xie, W., Huang, Z.-M., & Cao, G.-Z. (2019b). Paeoniflorin Prevents Intestinal Barrier Disruption and Inhibits Lipopolysaccharide (LPS)-Induced Inflammation in Caco-2 Cell Monolayers. *Inflammation*, 42, 2215-2225. doi: 10.1007/s10753-019-01085-z
- Wu, X., Zhao, Y., Haytowitz, D. B., Chen, P., & Pehrsson, P. R. (2019a). Effects of domestic cooking on flavonoids in broccoli and calculation of retention factors. *Heliyon*, 5(3), e01310. doi: 10.1016/j.heliyon.2019.e01310
- Wunderlich, S. M., Feldman, C., Kane, S., & Hazhin, T. (2008). Nutritional quality of organic, conventional, and seasonally grown broccoli using vitamin C as a marker. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 59(1), 34-45. doi: 10.1080/09637480701453637
- Xiao, T., Chen, Y., Song, C., Xu, S., Lin, S., Li, M., Chen, X., & Gu, H. (2021). Possible treatment for

- UVB-induced skin injury: Anti-inflammatory and cytoprotective role of metformin in UVB-irradiated keratinocytes. *Journal of Dermatological Science*, 102(1), 25-35. doi: 10.1016/j.jdermsci.2021.02.002
- Yaashikaa, P. R., Senthil Kumar, P., & Varjani, S. (2022). Valorization of agro-industrial wastes for biorefinery process and circular bioeconomy: A critical review. *Bioresource Technology*, 343(August 2021), 126126. doi: 10.1016/j.biortech.2021.126126
- Yang, J.-H., Hwang, Y. H., Gu, M. J., Cho, W. K., & Ma, J. Y. (2015). Ethanol extracts of *Sanguisorba officinalis* L. suppress TNF- α /IFN- γ -induced pro-inflammatory chemokine production in HaCaT cells. *Phytomedicine*, 22(14), 1262-1268. doi: 10.1016/j.phymed.2015.09.006
- Zaid, M. A., Afaq, F., Syed, D. N., Dreher, M., & Mukhtar, H. (2007). Inhibition of UVB-mediated oxidative stress and markers of photoaging in immortalized HaCaT keratinocytes by pomegranate polyphenol extract POMx. *Photochemistry and Photobiology*, 83(4), 882-888. doi: 10.1111/j.1751-1097.2007.00157.x
- Zare, M., Norouzi Roshan, Z., Assadpour, E., & Jafari, S. M. (2020). Improving the cancer prevention/treatment role of carotenoids through various nano-delivery systems. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 61(3), 522-534. doi: 10.1080/10408398.2020.1738999
- Zhang, Y., Jiang, Z., Wang, L., & Xu, L. (2017). Extraction optimization, antioxidant, and hypoglycemic activities in vitro of polysaccharides from broccoli byproducts. *Journal of Food Biochemistry*, 41(5), e12387. doi: 10.1111/jfbc.12387
- Zhao, F., Zhang, J., & Chang, N. (2018). Epigenetic modification of Nrf2 by sulforaphane increases the antioxidative and anti-inflammatory capacity in a cellular model of Alzheimer's disease. *European Journal of Pharmacology*, 824, 1-10. doi: 10.1016/j.ejphar.2018.01.046
- Zhao, S., Baik, O.-D., Choi, Y.-J., & Kim, S.-M. (2014). Pretreatments for the Efficient Extraction of Bioactive Compounds from Plant-Based Biomaterials. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 54(10), 1283-1297. doi: 10.1080/10408398.2011.632698
- Zhou, B., Zhang, J., Zhang, Q., Permatasari, F., Xu, Y., Wu, D., Yin, Z., & Luo, D. (2013). Palmitic Acid Induces Production of Proinflammatory Necrosis Factor- via a NF- B-Dependent Mechanism in HaCaT Keratinocytes. *Mediators of Inflammation*, 2013.

Bibliografía

Zhou, J., Gullón, B., Wang, M., Gullón, P., Lorenzo, J. M., & Barba, F. J. (2021). The application of supercritical fluids technology to recover healthy valuable compounds from marine and agricultural food processing by-products: A review. *Processes*, *9*(2), 357. doi: 10.3390/pr9020357

Anexo

1. Aplicación de los extractos en el sector de la alimentación

Generalmente, se conoce como alimento funcional, al alimento comercializado que contiene ingredientes agregados desarrollados tecnológicamente y que aportan algún beneficio específico para la salud (Siró et al., 2008). Existe, además, una creciente demanda de nuevos productos en el mercado de alimentos. Sin embargo, a la hora de la introducción de nuevos alimentos en el mercado, así como de nuevas técnicas de producción de alimentos debemos tener en cuenta la neofobia (Siegrist & Hartmann, 2020), que hace que estos nuevos productos causen cierto rechazo y se eviten por temor a que tengan mal sabor. Esta razón es por la que hasta un 80 % de los nuevos alimentos funcionales fracasan. Algunos de los factores que hacen que estos nuevos alimentos no sean aceptados por los consumidores son la falta de garantía de su seguridad para la salud humana y el medio ambiente, lo que genera desconfianza en el consumidor. Así, existe una tendencia a elegir alimentos que consideran sanos entre los que se incluyen alimentos frescos, sobre todo aquellos con una mayor proporción de frutas y verduras (Siddiqui et al., 2022). Es por esto, que los nuevos productos son sometidos a diferentes pruebas de aceptabilidad o hedónicas que evalúan el grado de aceptación de posibles nuevos productos. En estos test de aceptabilidad, los catadores evalúan cuanto les gusta o les disgusta la muestra en términos de propiedades sensoriales específicas como pueden ser la apariencia, sabor, color, olor o textura, así como la aceptación general (Fiorentini et al., 2020).

Teniendo en cuenta las dificultades que presenta la introducción de un nuevo alimento, y por lo tanto, su éxito en el mercado, se han desarrollado las escalas hedónicas y las pruebas de preferencia, que son instrumentos imprescindibles que se utilizan a la hora de la toma de decisiones sobre la introducción en el mercado de nuevos alimentos (Hersleth et al., 2005). Por ello, se llevaron cabo sendas pruebas de aceptación para el humus y la crema de verduras elaboradas a partir de los extractos de los subproductos de brócoli. La evaluación sensorial y aceptación de nuevos alimentos por parte del consumidor se encuentra influenciada no solo por las características del producto sino también por factores relacionados con las personas que pueden actuar como impulsores o detractores a la hora de aceptar nuevos productos. Uno de los factores clave a la hora de la aceptabilidad de los alimentos es la falta de familiaridad con los nuevos alimentos, que puede afectar de forma negativa a la percepción sensorial y al gusto en general (Fiorentini et al., 2020). Las pruebas hedónicas llevadas a cabo en laboratorio son las más recomendadas puesto que el entorno está más controlado y existe menos probabilidad de que las variables ambientales o el estímulo social alteren la percepción del producto. De esta

Anexo

forma se permite al panelista centrarse en las características sensoriales de la muestra (Hersleth et al., 2005).

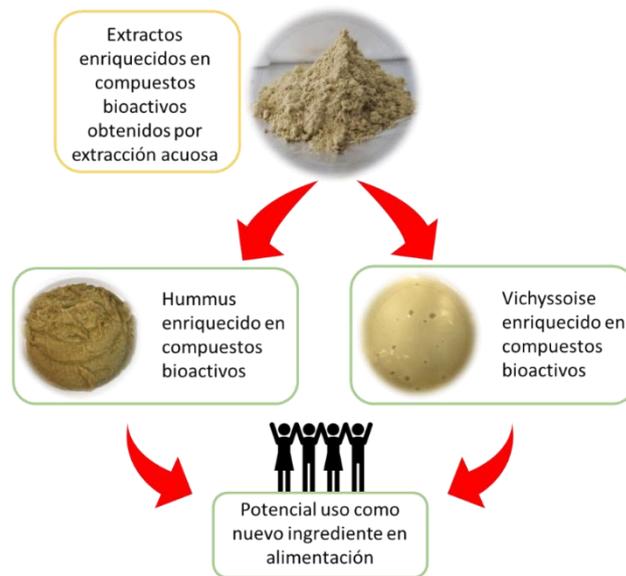


Figura 1. Resumen gráfico de los objetivos planteados en este anexo.

2. Extracción y cuantificación de los compuestos bioactivos hidrosolubles sin el uso de disolventes orgánicos

Actualmente, se están investigando nuevas tecnologías y métodos de extracción de productos naturales bioactivos para promover la calidad y la cantidad de estos compuestos con la finalidad de minimizar los problemas ambientales. En este sentido, la extracción de compuestos hidrosolubles sin el uso de disolventes orgánicos, a partir de los subproductos que se generan en la industria del procesado de brócoli en fresco, constituye una alternativa a los procesos de extracción convencionales.

Para este tipo de extracción se utilizaron los subproductos frescos de brócoli de la variedad Bellaverde, sin secar siguiendo la metodología descrita en el Capítulo 1. Para ello, los tallos y hojas se cortaron en dados de 10x10 mm y mezclaron en proporción 3:1, hoja/tallo, obteniéndose 16 kg de muestra cortada. Una vez realizado el proceso de extracción acuosa se obtuvieron 6,32 Kg con 6 °Brix. Las condiciones del proceso de obtención del extracto seco de esta variedad se describen en la Tabla 1 siendo el rendimiento de esta extracción del 0,76 %.

Tabla 1. Peso de los subproductos de brócoli de la variedad Bellaverde sometidos a la extracción acuosa antes y después de la extracción, tras su concentración y tras su atomización.

Parámetros	Bellaverde
Peso de subproducto (kg)	16
Líquido sin concentrar (kg)	62
Peso concentrado (kg)	6,32
Peso atomizado (g)	121,2

Finalmente, el extracto se atomizó, obteniéndose 121,2 gramos de extracto polvo (Figura 2).



Figura 2. Extracto atomizado de los subproductos de brócoli de la variedad Bellaverde obtenido mediante la extracción sin el uso de disolventes orgánicos.

2.1 Análisis nutricional del extracto obtenido mediante extracción sin el uso de disolventes orgánicos

Una vez obtenido el extracto enriquecido en compuestos hidrosolubles, tras la extracción sin el uso de disolventes orgánicos de los subproductos de brócoli Bellaverde, se llevó a cabo un análisis de los componentes nutricionales (Tabla 2). Como se puede observar, el análisis nutricional del extracto reveló que el subproducto de brócoli de la variedad Bellaverde presenta un elevado contenido en fibra alimentaria (28,4 g 100 g⁻¹) que fue del orden de 3,2 veces superior a las otras variedades analizadas en el Capítulo 1 (8,9 y 8,2 g 100 g⁻¹ en brócoli Parthenon y Naxos, respectivamente).

Tabla 2. Composición nutricional de los extractos enriquecidos en compuestos bioactivos hidrosolubles

Composición (g 100g ⁻¹)	Bellaverde
Ácidos grasos saturados	< 0,1
Azúcares totales	14,2
Fibra alimentaria	28,4
Cenizas totales	41,1
Cloruro sódico	16,80
Grasa	1,0
Hidratos de carbono	39,6
Humedad	1,5
Proteínas	16,8
Vitamina C (mg kg ⁻¹)	87
Valor energético (kcal/kj)	178/740

obtenidos a partir de los subproductos de brócoli Bellaverde.

Este elevado contenido en fibra alimentaria hace interesante su recuperación tanto por sus propiedades nutricionales como por sus propiedades gelificantes que permitirían el uso de este componente como sustitutivo de los aditivos gelificantes que se utilizan hoy en día para la elaboración de alimentos en distintos sectores que van desde las bebidas, hasta los productos de repostería y de origen cárnico (Cañas et al., 2011). Por ello, se llevaron a cabo pruebas de elaboración de nuevos alimentos funcionales que incorporasen el extracto hidrosoluble obtenido a partir de los subproductos de la variedad Bellaverde con potencial para su incorporación como nuevo ingrediente en alimentos funcionales (Figura 1). Para ello se seleccionaron para su elaboración dos tipos de alimentos en los que incluir estos extractos: un humus y una crema de verduras.

3. Incorporación de los extractos procedentes de la extracción sin el uso de disolventes orgánicos de los subproductos de brócoli en alimentos

Para la elaboración de alimentos se utilizaron los extractos procedentes de la extracción sin el uso de disolventes orgánicos de los subproductos de brócoli de la variedad Bellaverde. Todos los ensayos se realizaron en colaboración con el Centro Tecnológico Nacional de la Conserva (CTC). Los dos productos elaborados con los extractos acuosos de subproductos de brócoli Bellaverde fueron evaluados por un panel compuesto por 60 participantes no entrenados. El diseño experimental para el estudio de aceptación de alimentos entre los consumidores fue diseñado de acuerdo con las siguientes normas: UNE-ISO 6658:2019, UNE-ISO 4121:2006 y UNE-EN-ISO 5492:2010. La prueba se realizó en una sala de catas, conforme a UNE-EN-ISO 8589:2010, para que todos los consumidores se encontraran en igualdad de condiciones (misma cantidad de muestra del producto, misma temperatura de la muestra y mismos utensilios para el desarrollo de la prueba). Los panelistas evaluaron, sin límite de tiempo, cada uno de los atributos de los productos (color, olor, sabor, textura y valoración global) en una escala hedónica de 5 puntos, en donde 1 significó “Me desagrada mucho” y 5 correspondía a “Me gusta mucho”. Al final del cuestionario se dejó un espacio en blanco para que los consumidores pudieran, en caso de desearlo, dejar algún dato o sugerencia que considerase interesante señalar, así como que indicaran si creyeron que se había dejado olvidado algún otro atributo que fuera importante considerar en este tipo de productos.

3.1 Elaboración de un humus con extracto de subproductos de brócoli

Los extractos hidrosolubles de brócoli Bellaverde se utilizaron en la elaboración de un humus. Para su preparación se introdujeron los siguientes ingredientes en un procesador de alimentos: garbanzo cocido, sésamo, zumo de limón, aceite, extracto de brócoli (8 %), comino, sal y ajo y posteriormente, se batieron todos juntos hasta obtener una masa fina y homogénea (Figura 3).



Figura 3. Humus con extracto de subproducto de brócoli Bellaverde.

Una vez elaborado el humus, se determinó la composición nutricional de este (Tabla 3).

Tabla 3. Composición nutricional del humus relaborado con extracto de subproductos de brócoli de la variedad Bellaverde como ingrediente.

Determinación (g 100 g ⁻¹)	Humus + extracto brócoli
Vitamina C (mg kg ⁻¹)	<55
Ácidos grasos saturados	2,6
Azúcares totales	2,5
Fibra alimentaria	5,7
Cenizas totales	3,8
Cloruro sódico	1,89
Grasa	19,3
Hidratos de carbono	12,8
Humedad	53,2
Proteínas	5,2
Valor energético (kcal 100 g ⁻¹)	257
Valor energético (kJ 100 g ⁻¹)	1066

Una vez elaborado el humus con el extracto acuoso de brócoli de la variedad Bellaverde se realizó el análisis sensorial en la sala de catas en el que los 60 panelistas respondieron a las cuestiones planteadas en cuanto al color, olor, sabor y textura. Las puntuaciones obtenidas fueron las siguientes:

Parámetro	Puntuación
Color	3,68
Olor	3,40
Sabor	3,65
Textura	3,80
Valoración global	3,53

Como se observa en los resultados obtenidos de la valoración de los diferentes parámetros, todos obtuvieron una evaluación superior a 3 (siendo 5 la máxima puntuación), el mínimo

aceptable. Esto indica que, en general, la población aceptaría este nuevo alimento. Además, la calificación global del producto fue de 3,53, es decir, se superó el valor mínimo de aceptabilidad. Resultados similares se obtuvieron en los ensayos de Losano et al., (2021), quienes introdujeron subproductos de garbanzo en la elaboración de un humus con efecto prebiótico que también consiguió la aceptación general del grupo de panelistas que realizaron la cata. Finalmente, la aceptabilidad del producto se estableció observando el porcentaje de consumidores que evaluó globalmente el producto por encima de 3 (valor mínimo de aceptabilidad), que fue del 82 % de los encuestados. Es decir, el 82 % de los panelistas que probaron el humus elaborado con subproductos de brócoli lo calificaron como aceptable.

3.2 Elaboración de una crema de verduras con subproductos de brócoli

Con el extracto hidrosoluble obtenido de subproductos de brócoli Bellaverde también se elaboró una crema de puerro (*vichyssoise*) con los siguientes ingredientes: puerro, mantequilla, nata, agua, sal y extracto de brócoli (1,2 %). Todos los ingredientes se introdujeron en un procesador de alimentos y se batieron hasta que quedó una crema homogénea (Figura 4).



Figura 4. Crema de puerro realizada con extracto de brócoli obtenido de la variedad Bellaverde.

Tras la elaboración de la crema vegetal con extracto de brócoli se determinó la composición nutricional (Tabla 4).

Tabla 4. Composición nutricional de la crema vegetal elaborada con extracto de subproductos de brócoli de la variedad Bellaverde como ingrediente.

Determinación (g 100 g ⁻¹)	Vichysoise + extracto brócoli
Vitamina C (mg kg ⁻¹)	<55
Ácidos grasos saturados	2,9
Azúcares totales	3,1
Fibra alimentaria	2,3
Cenizas totales	1,8
Cloruro sódico	0,90
Grasa	5,1
Hidratos de carbono	10,9
Humedad	80,7
Proteínas	1,5
Valor energético (kcal 100 g ⁻¹)	91
Valor energético (kJ 100 g ⁻¹)	379

Una vez elaborada la vichysoise con el extracto hidrosoluble procedente de subproductos de brócoli Bellaverde se llevó a cabo el mismo análisis sensorial que con el humus. 60 panelistas respondieron el cuestionario que se les entregó previamente y los resultados obtenidos se muestran a continuación:

Parámetro	Puntuación
Color	4,27
Olor	4,22
Sabor	4,70
Textura	4,60
Valoración global	4,48

Como se observa en los resultados obtenidos de la valoración de los diferentes parámetros, todos obtuvieron una evaluación superior a la aceptable (mínimo de 3) en todos los atributos evaluados. Esto indica que, en general, la población también aceptaría este nuevo alimento. Además, la calificación global del producto fue de 4,48, superando el valor mínimo de aceptabilidad. En el caso de la aceptabilidad del producto, se determinó comprobando el porcentaje de consumidores que evaluaron por encima de 3 la valoración global de la crema de verduras, que en este caso fue del 100 % de consumidores. En todos los casos estudiados los coeficientes de variación fueron menores al 50 % lo que garantiza la fiabilidad de los resultados.

Con estos resultados podemos asegurar que la inclusión de estos subproductos en nuevos alimentos sería bien recibida por el público puesto que, en ambos casos, la elaboración del humus y de la crema vegetal, la aceptación fue positiva para la mayoría de los consumidores que realizaron la cata.

Bibliografía Anexo

- Cañas Ángel, Z., Restrepo Molina, D. A., & Cortés Rodríguez, M. (2011). Vegetable products as source of dietary fiber in the food industry: a review. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, *64*(1), 6023-6035.
- Fiorentini, M., Kinchla, A. J., & Nolden, A. A. (2020). Role of sensory evaluation in consumer acceptance of plant-based meat analogs and meat extenders: a scoping review. *Foods*, *9*(9). doi: 10.3390/foods9091334
- Hersleth, M., Ueland, Ø., Allain, H., & Næs, T. (2005). Consumer acceptance of cheese, influence of different testing conditions. *Food Quality and Preference*, *16*(2), 103-110. doi: 10.1016/J.FOODQUAL.2004.02.009
- Losano Richard, P., Steffolani, M. E., Allende, M. J., Carreras, J., & León, A. E. (2021). By-products of the classification of chickpea as an alternative in the production of hummus. *International Journal of Food Science and Technology*, *56*(4), 1759-1765. doi: 10.1111/ijfs.14801
- Siddiqui, S. A., Zannou, O., Karim, I., Kasmia, Awad, N. M. H., Gołaszewski, J., Heinz, V., & Smetana, S. (2022). Avoiding Food Neophobia and Increasing Consumer Acceptance of New Food Trends—A Decade of Research. *Sustainability*, *14*(16), 10391. doi: 10.3390/su141610391
- Siegrist, M., & Hartmann, C. (2020). Consumer acceptance of novel food technologies. *Nature Food*, *1*(6), 343-350. doi: 10.1038/s43016-020-0094-x
- Siró, I., Kápolna, E., Kápolna, B., & Lugasi, A. (2008). Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance—A review. *Appetite*, *51*(3), 456-467. doi: 10.1016/J.APPET.2008.05.060

