



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior  
d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica  
y del Medio Natural

OBTENCIÓN DE INGREDIENTES EN POLVO A PARTIR  
DE TALLOS DE BRÓCOLI. ESTUDIO DE LAS ETAPAS  
DE FERMENTACIÓN Y SECADO, Y RESPUESTA A LA  
DIGESTIÓN SIMULADA IN VITRO

Trabajo Fin de Grado

Grado en Biotecnología

AUTOR/A: Paredes Ortega, Paloma

Tutor/a: Seguí Gil, Lucía

Cotutor/a: Barrera Puigdollers, María Cristina

CURSO ACADÉMICO: 2022/2023



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



Escuela Técnica Superior  
de Ingeniería Agronómica  
y del Medio Natural

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural

**OBTENCIÓN DE INGREDIENTES EN POLVO A  
PARTIR DE TALLOS DE BRÓCOLI. ESTUDIO DE  
LAS ETAPAS DE FERMENTACIÓN Y SECADO, Y  
RESPUESTA A LA DIGESTIÓN SIMULADA *IN  
VITRO***

Trabajo de Fin de Grado

Grado en Biotecnología

AUTORA: Paredes Ortega, Paloma

Tutora: Seguí Gil, Lucía

Cotutora: Barrera Puigdollers, María Cristina

CURSO ACADÉMICO 2022-2023

## RESUMEN

El desperdicio y la generación de residuos alimentarios son grandes desafíos para la industria alimentaria. La valorización de estos se plantea como una alternativa que fomenta la economía circular y contribuye a sistemas alimentarios más sostenibles. Los desechos de frutas y hortalizas son generalmente tratados como material de bajo valor, pese a ser una fuente importante de nutrientes y compuestos bioactivos. Particularmente, el brócoli es rico en vitaminas, fibra, compuestos fenólicos, glucosinolatos y sus productos de hidrólisis, los isotiocianatos. La obtención de ingredientes en polvo a partir de frutas y hortalizas ha cobrado interés en los últimos años debido a su estabilidad y versatilidad; así como la tendencia por su obtención a partir de desechos o residuos alimentarios comestibles. Por otro lado, la fermentación es una operación unitaria que permite conservar eficientemente alimentos gracias a la formación de ácidos orgánicos y metabolitos con carácter antimicrobiano y antioxidante. Además, los microorganismos utilizados en la fermentación liberan enzimas que degradan el sustrato, mejorando así su composición nutricional. El uso de microorganismos probióticos podría dar lugar a un producto beneficioso para la salud si se ingiere en cantidades adecuadas. Finalmente, la valoración funcional de un alimento requiere del estudio de su respuesta a la digestión *in vitro*, lo que permite determinar su potencial una vez ingerido. Así pues, el presente trabajo fin de grado tiene como objetivo la obtención de polvos a partir de residuos de tallo de brócoli y la evaluación del efecto del procesado, fundamentalmente las etapas de fermentación y secado, sobre las propiedades de los productos en polvo obtenidos, así como la respuesta de estos a la digestión simulada *in vitro*.

Para tal fin, el residuo de brócoli fue triturado, pasteurizado y sometido a las operaciones de fermentación con *Lactobacillus plantarum* (24 h), secado por aire caliente (50, 60, 70 y 70-50 °C) o liofilización, y molienda final para obtener un polvo fino. Del mismo modo, se obtuvieron productos en polvo a partir de residuo no fermentado. Los productos en polvo obtenidos se caracterizaron en cuanto a sus propiedades fisicoquímicas y antioxidantes: humedad, actividad de agua, sólidos solubles totales, fenoles totales, flavonoides totales y actividad antioxidante por DPPH y ABTS, así como, en los polvos fermentados, su contenido en microorganismo probiótico. También se analizó la liberación de compuestos antioxidantes durante la digestión *in vitro* y la viabilidad del microorganismo.

Los resultados del presente trabajo confirmaron que las operaciones aplicadas sobre el tallo de brócoli permitieron obtener productos en polvo con propiedades mejoradas. Estos productos son estables y adecuados para su uso como ingrediente funcional para la fortificación de alimentos. Concretamente, el secado por aire caliente a 60 °C y la liofilización presentaron resultados prometedores y su respuesta a la digestión simulada *in vitro* confirma la bioaccesibilidad de sus compuestos bioactivos. En definitiva, los productos en polvo obtenidos a partir de residuos de brócoli podrían ser reincorporados a la cadena alimentaria como ingredientes funcionales.

Este trabajo se relaciona con los siguientes ODS de la Agenda 2030: 2, 3 y 12.

**Palabras clave:** brócoli, digestión *in vitro*, fermentación, ingredientes en polvo, *Lactobacillus plantarum*, propiedades antioxidantes, secado por aire caliente, liofilización, valorización de residuos

## ABSTRACT

Food waste is a major challenge for the food industry. Waste recovery is seen as an alternative that promotes the circular economy and contributes to more sustainable food systems. Fruit and vegetable waste is generally treated as low-value material, despite being an important source of nutrients and bioactive compounds. Broccoli is rich in vitamins, fibre, phenolic compounds, glucosinolates and their hydrolysis products, isothiocyanates. The production of powdered ingredients from fruits and vegetables has gained interest in recent years due to their stability and versatility, as well as the trend towards obtaining them from waste or edible food waste. On the other hand, fermentation is a unitary operation that allows efficient food preservation thanks to the formation of organic acids and metabolites with antimicrobial and antioxidant properties. In addition, the microorganisms used in fermentation release enzymes that degrade the substrate, thus improving its nutritional composition. The use of probiotic microorganisms could result in a health-promoting product if ingested in adequate amounts. Finally, the functional assessment of a food requires the study of its response to *in vitro* digestion, which makes it possible to determine its potential once ingested. Thus, the aim of this final degree project is to obtain powders from broccoli stalk residues and to evaluate the effect of processing, mainly the fermentation and drying stages, on the properties of the powdered products obtained, as well as their response to simulated *in vitro* digestion.

For this purpose, the broccoli residue was grinded, pasteurised and subjected to the operations of fermentation with *Lactobacillus plantarum* (24 h), hot air drying (50, 60, 70 and 70-50 °C) or freeze-drying, and final grinding to obtain a fine powder. Similarly, powdered products were obtained from unfermented residue. The powdered products obtained were characterised in terms of their physicochemical and antioxidant properties: moisture, water activity, total soluble solids, total phenols, total flavonoids, and antioxidant activity by DPPH and ABTS, as well as, in the fermented powders, their probiotic microorganism content. The release of antioxidant compounds during *in vitro* digestion and the viability of the microorganism were also analysed.

The results of the present work confirmed that the operations applied on broccoli stalk allow obtaining powdered products with improved properties depending on the process variables. These are stable and suitable for use as functional ingredients in food fortification. In particular, hot air drying at 60 °C and freeze-drying showed promising results and their response to *in vitro* simulated digestion confirms their bioaccessibility. Ultimately, powdered products obtained from broccoli waste could be reintroduced into the food chain as functional ingredients.

This work relates to the following SDGs of the 2030 Agenda: 2, 3 and 12.

**Keywords:** antioxidant properties, broccoli, fermentation, freeze-drying, hot air drying, *in vitro* digestion, *Lactobacillus plantarum*, powdered ingredients, waste valorization

## AGRADECIMIENTOS

Tras finalizar la elaboración de este trabajo, me gustaría dar las gracias a todas las personas que han contribuido para que pudiese lograrlo.

Agradezco enormemente a mis tutoras, Lucía y Cristina, por su dedicación, confianza y conocimientos que han sabido transmitirme desde el principio.

También a Claudia y Stevens, por su constante atención y ayuda en el laboratorio. Sin olvidarme de mis compañeros, Mar y Simone, que han estado presentes durante este proceso.

A mis amigas de clase, por lo que hemos aprendido juntas durante estos años. Y sobre todo a mi familia y amigos, por ser mi apoyo incondicional.

## ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1 GENERACIÓN DE RESIDUOS EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA.....	1
1.2 OBTENCIÓN DE INGREDIENTES FUNCIONALES EN POLVO .....	2
1.3 PROPIEDADES FUNCIONALES DEL BRÓCOLI .....	3
1.4 FERMENTACIÓN Y POTENCIAL PROBIÓTICO.....	5
1.5 DIGESTIÓN SIMULADA <i>IN VITRO</i> .....	5
2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO .....	7
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	8
3.1 MATERIA PRIMA .....	8
3.2 MANEJO Y PREPARACIÓN DEL INÓCULO BACTERIANO .....	8
3.3 PROCESO DE OBTENCIÓN DE POLVOS A PARTIR DEL RESIDUO DE BRÓCOLI .....	8
3.4 DETERMINACIONES ANALÍTICAS .....	10
3.4.1 Propiedades fisicoquímicas .....	10
3.4.1.1 Actividad del agua .....	10
3.4.1.2 Humedad .....	10
3.4.1.3 Sólidos solubles totales .....	11
3.4.2 Propiedades antioxidantes .....	11
3.4.2.1 Contenido en fenoles totales .....	11
3.4.2.2 Contenido en flavonoides totales.....	12
3.4.2.3 Capacidad antioxidante: métodos DPPH y ABTS .....	12
3.4.3 Recuento microbiano .....	13
3.5 ENSAYO DE DIGESTIÓN SIMULADA <i>IN VITRO</i> .....	13
3.5.1 Valoración de la respuesta a la digestión simulada <i>in vitro</i> .....	14
3.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	15
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	16
4.1 ESTUDIO DE LA CINÉTICA DE SECADO .....	16
4.2 CARACTERIZACIÓN DEL RESIDUO DE BRÓCOLI Y DE LOS PRODUCTOS EN POLVO OBTENIDOS .....	19
4.2.1 Propiedades fisicoquímicas .....	19
4.2.2 Propiedades antioxidantes .....	20
4.2.3 Crecimiento microbiano .....	24
4.4 RESPUESTA DE LOS POLVOS A LA DIGESTIÓN SIMULADA <i>IN VITRO</i> .....	26
4.4.1 Propiedades antioxidantes de los polvos de residuo de brócoli tras la digestión simulada <i>in vitro</i> .....	26
4.4.2 Recuentos microbianos .....	30
5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS DE FUTURO .....	31
6. BIBLIOGRAFÍA .....	32
ANEXO I: Relación del trabajo con los objetivos de desarrollo sostenible de la agenda 2030.....	41

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Diagrama de flujo del proceso de transformación de los tallos de brócoli en los diferentes productos en polvo. SAC: Secado por Aire Caliente; LIO: Liofilización; F: Fermentación.....	9
<b>Figura 2.</b> Curvas de secado (A) y de velocidad de secado (B) de tallo de brócoli triturado, pasteurizado y no fermentado (PAST), secado con aire caliente a 50, 60 y 70 °C.....	16
<b>Figura 3.</b> Curvas de secado (A) y de velocidad de secado (B) de tallo de brócoli triturado, pasteurizado y fermentado (PAST+FERM), secado con aire a 50, 60 y 70 °C.....	17
<b>Figura 4.</b> Efecto de la fermentación sobre el contenido en fenoles (mg EAG /g <sub>ms</sub> ) y flavonoides (mg EQ/g <sub>ms</sub> ) totales y la actividad antioxidante por los métodos DPPH y ABTS (mg ET/g <sub>ms</sub> ). Relación entre la propiedad antioxidante en el residuo de brócoli fermentado frente al residuo sin fermentar. Cada punto representa un lote/fermentación (10 en total), de modo que la desviación corresponde a tres replicados por cada lote. Las barras representan el valor promedio de todos los lotes. <sup>a,b,c...</sup> Diferentes superíndices en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas con un nivel de confianza del 95% (p-valor <0,05).....	21
<b>Figura 5.</b> Recuento de viables en el tallo de brócoli recién inoculado, tras 24 h de fermentación con <i>L. plantarum</i> y en los polvos obtenidos a partir de éste. Las barras de error representan la desviación estándar de dos repeticiones (2 replicados/repetición). <sup>a,b,c...</sup> Diferentes superíndices en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas con un nivel de confianza del 95% (p-valor < 0,05).....	25
<b>Figura 6.</b> Índice de recuperación (%) del contenido en fenoles y flavonoides, y de la capacidad antioxidante por DPPH y ABTS tras la digestión simulada <i>in vitro</i> en las fases gástrica (FG) e intestinal (FI). Media ± desviación estándar de tres repeticiones. Las barras de error representan la desviación estándar de dos repeticiones (3 replicados/repetición). <sup>a,b,c...</sup> Diferentes superíndices en la misma serie indican diferencias estadísticamente significativas con un nivel de confianza del 95% (p-valor <0,05).....	29

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Concentración (mol/L) de sales recomendada para las disoluciones stock y volumen (mL) necesario para 500 mL en la preparación de la simulación de los fluidos gástricos (SGF) e intestinales (SIF), (Minekus <i>et al.</i> , 2014). .....	13
<b>Tabla 2.</b> Valores de actividad de agua ( $a_w$ ), contenido en humedad ( $x_w$ ) y sólidos solubles totales ( $x_{ss}$ ) del tallo de brócoli obtenidos para cada tratamiento. Media $\pm$ desviación estándar de tres repeticiones.....	19
<b>Tabla 3.</b> Efecto del secado sobre el contenido en fenoles (mg EAG / $g_{ms}$ ) y flavonoides (mg EQ / $g_{ms}$ ) totales y sobre la actividad antioxidante medida por los métodos DPPH y ABTS (mg ET/ $g_{ms}$ ) de los polvos de tallo de brócoli obtenidos, así como la variación con respecto al residuo inicial pasteurizado (valores entre paréntesis). Los valores absolutos son la media $\pm$ desviación estándar de dos lotes (3 replicados/lote). Para los incrementos se ha tenido en cuenta el valor inicial (pasteurizado) correspondiente a cada lote. ....	23
<b>Tabla 4.</b> Respuesta a la digestión simulada <i>in vitro</i> de las fases gástrica (FG) e intestinal (FI) sobre el contenido en fenoles (mg EAG/ $g_{ms}$ ) y flavonoides (mg EQ / $g_{ms}$ ) totales y la actividad antioxidante por los métodos DPPH y ABTS (mg ET/ $g_{ms}$ ) de los polvos obtenidos mediante secado por aire caliente a 60 °C y liofilización, fermentados y sin fermentar. Media $\pm$ desviación estándar de tres repeticiones.....	27



# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 GENERACIÓN DE RESIDUOS EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA

El sistema alimentario se rige por un mercado lineal que utiliza los recursos naturales sin aprovechar su potencial de reutilización o reciclaje (Rico-Lugo *et al.*, 2023) dando lugar a un sistema agrícola insostenible en el que aumentan las emisiones de carbono, la pérdida de biodiversidad y el agotamiento de los recursos naturales (Campbell *et al.*, 2017), algo que sitúa al sector alimentario como responsable del 30% del consumo de energía total en el mundo (Moran, 2015).

Según la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), un sistema alimentario debe garantizar la seguridad alimentaria y nutrición sin poner en riesgo las bases económicas sociales y ambientales de éstas para futuras generaciones. De esta forma, asegura la sostenibilidad socioeconómica protegiendo la del medio ambiente. Sin embargo, se sabe que un tercio de la producción mundial anual de alimentos se pierde como desperdicio o pérdida a lo largo del proceso de producción, equivalente al 8% total de las emisiones de gases de efecto invernadero (FAO, 2014). Este término engloba tanto la clasificación de pérdida comestible/no comestible, como evitable/no evitable que quedan descartadas en cualquier punto de la cadena alimentaria provocando un impacto medioambiental innecesario, aunque luego se pueda destinar a un uso no alimentario (piensos animal o bioenergía) (Östergren *et al.*, 2014).

Por un lado, las pérdidas en la producción primaria y el procesado, especialmente de frutas y hortalizas, suponen alrededor del 50% de las pérdidas totales (Caminos de acción Food, 2030). Por otro lado, la última estimación de FUSIONS (2016) revela que el desperdicio alimentario se da principalmente en las últimas fases de la cadena de suministro, en los servicios domésticos y de restauración o minoristas (Corrado y Sala, 2018). Además, la persistencia de estos desechos en vertederos también es perjudicial para el medio ambiente, ya que se caracterizan por tener un alto contenido en agua y en componentes orgánicos con poca estabilidad biológica (Gonçalves *et al.*, 2023). Esto provoca su putrefacción, sirviendo como caldo de cultivo para microorganismos (Bisht *et al.*, 2023). Los motivos expuestos tienen un sustancial impacto sobre el medioambiente y la salud humana si se tiene en cuenta que, en España, la producción de frutas y hortalizas superó los 29 millones de toneladas durante el año 2021 (FAO, 2021). Además, la industria alimentaria debe lidiar con la inseguridad alimentaria y malnutrición por las que en el último año más de 250 millones de personas padecieron hambre aguda. Mientras que, paralelamente, se prevé una expansión de la población y, por tanto, también de la demanda de alimentos y su consecuente generación de residuos (ONU, 2023).

Por tanto, el impacto medioambiental y social ocasionado por la industria alimentaria ha generado una acentuada preocupación por la seguridad alimentaria (Lombardi *et al.*, 2019). Así, surge el concepto de economía alimentaria circular basado en construir un entorno socioeconómico sostenible, que promueve una explotación de los recursos responsable y la reutilización de los subproductos o residuos generados como nuevos recursos, eliminando el enfoque lineal (Santagata *et al.*, 2021), además de prevenir y reducir los desperdicios alimentarios a través del control de la eficacia y gestión del proceso de producción (Abbate *et al.*, 2023). Por ende, algunos de los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) definidos por la Organización de las Naciones Unidas (ONU) se centran en coordinar estas actividades para garantizar la sostenibilidad de los sistemas alimentarios bajo las cuatro prioridades: nutrición y

salud, clima y sostenibilidad, circularidad y uso de recursos, e innovación y las comunidades (Anexo I). En concreto, alguna de las metas propuestas en los ODS son reducir al 50% el desperdicio de alimentos (ODS 12.3), así como poner fin al hambre y asegurar el acceso a la alimentación a todas las personas (ODS 2.1).

## 1.2 OBTENCIÓN DE INGREDIENTES FUNCIONALES EN POLVO

Los subproductos o residuos generados en la industria alimentaria contienen generalmente un elevado valor nutricional y compuestos bioactivos que pueden utilizarse para el desarrollo de nuevos productos con valor añadido (de la Rosa *et al.*, 2019). En concreto, las frutas y verduras se cultivan de forma estacional satisfaciendo la demanda diaria y son considerados alimentos esenciales para un estilo de vida saludable por su contenido nutricional basado en fibras dietéticas, antioxidantes, fitonutrientes y minerales (Vargas *et al.*, 2022). En los últimos años, la transformación de los residuos ha despertado interés para el desarrollo de productos alimentarios sostenibles de gran aplicabilidad, destacando la obtención de productos intermedios, aditivos alimentarios o agentes aromatizantes en la industria alimentaria; cosméticos, nutracéuticos o probióticos en la farmacéutica y sanitaria (Sagar *et al.*, 2018). En este contexto, el residuo generado por las industrias podría ser utilizado como materia prima para la obtención en polvo como ingrediente funcional rico en compuestos bioactivos y de mayor estabilidad fisicoquímica y microbiológica (Neacsu *et al.*, 2015).

La fabricación de polvos requiere de etapas de lavado, molienda y secado. Teniendo en cuenta la heterogeneidad del residuo, el estudio de los parámetros óptimos (temperatura, presión, velocidad del aire, humedad relativa, etc) de las operaciones unitarias es fundamental con el fin de preservar las características funcionales de los polvos (Karam *et al.*, 2016; Bas-Bellver *et al.*, 2022). En concreto, la etapa de secado es uno de los métodos de conservación más conocidos capaz de prolongar la vida útil y mejorar la estabilidad de los alimentos (Chou y Chua 2001). Este método consigue detener la descomposición microbiana y distintas reacciones químicas mediante la eliminación total o parcial de la disponibilidad del agua para participar en ellas (Chua *et al.*, 2001). En este sentido, el objetivo es reducir la actividad del agua ( $a_w$ ), conocida como una medida indirecta del contenido en agua biodisponible en el producto y capaz de participar en las reacciones de deterioro que vendrá acompañado por un cambio de fase, ya sea evaporación o sublimación (Fito *et al.*, 2001; Vargas *et al.*, 2022). Así, se obtiene un producto de menor peso y volumen que reduce los costes de envasado, transporte y almacenamiento (Vargas *et al.*, 2022).

Actualmente, existen diferentes técnicas de secado que permiten reducir la  $a_w$  a niveles seguros y que modifican no solo a las propiedades antioxidantes sino también el tamaño, forma, sabor y textura del producto (Fito *et al.*, 2001). En particular, el secado por aire caliente (SAC) es una técnica ampliamente utilizada en la industria, conocida por su fácil manejo, bajo coste y alto rendimiento. Sin embargo, suele requerir elevadas temperaturas y largos tiempos, lo que explica el deterioro de las propiedades funcionales del producto tras su exposición a reacciones de oxidación (Karam *et al.*, 2016; Vargas *et al.*, 2022). Durante el SAC, la matriz se expone a una corriente de aire caliente con una humedad relativa inferior a la  $a_w$  del producto, de manera que se genera un gradiente de  $a_w$  responsable del secado. A medida que el agua se elimina del producto, ésta se transfiere por el interior de este por diversos mecanismos, hasta alcanzar la superficie, desde donde se evapora. El aumento de la temperatura interna del sólido facilita la transferencia de agua desde el interior hacia la superficie de este. Los mecanismos de transporte

por difusión tienen un papel crucial en este comportamiento (Ahmed, 2018). En una primera etapa, el agua libre se desplaza a la superficie del sólido, donde se elimina por evaporación; posteriormente, parte del agua restante, ligada a la matriz, se transfiere más lentamente a través del producto hacia la superficie, siendo este mecanismo el predominante en hasta dos tercios del tiempo de secado total (Andrés *et al.*, 2004).

Por otro lado, la liofilización representa el proceso óptimo para la obtención de productos deshidratados de alta calidad, minimizando las reacciones de degradación gracias a la menor exposición al oxígeno, baja temperatura y presión. No obstante, también es conocida por su elevado coste de inversión y procesado, lo que limita su utilización a escala industrial (Karam *et al.*, 2016). Tras la congelación del producto, este proceso se lleva a cabo en dos etapas: la sublimación del disolvente congelado, en la que el agua pasa de estado sólido a vapor, y la posterior evaporación de parte del agua ligada (etapa de desorción), ambas en condiciones de vacío (Vargas *et al.*, 2022).

Finalmente, la etapa de molienda permite la reducción del tamaño de partícula de productos sólidos al ser sometidos a una tensión mecánica que provoca la ruptura de las fuerzas de unión molecular internas con respecto a las externas. Para generar la fragmentación, la energía necesaria es proporcional a la superficie del material y es llevada a cabo por diversos procedimientos, como molienda convencional, micronización o molienda criogénica (Karam *et al.*, 2016). Además, estas operaciones pueden realizarse de forma aislada o en combinación con otras operaciones unitarias como es el secado, es decir, la molienda se puede realizar antes y/o después de la deshidratación (Baudelaire, 2013). De hecho, existe una interdependencia de estas operaciones, ya que un triturado previo condicionará el comportamiento de la matriz durante el secado, lo cual a su vez determinará las características del producto deshidratado y su respuesta a la molienda post-secado. La elección del tipo de molienda y su intensidad será determinante para la reducción del contenido en agua, ya que la disrupción previa ayuda a reducir el consumo de energía necesario en la etapa de deshidratación (Baudelaire, 2013). En cuanto a la molienda del producto seco, dependiendo del tamaño de partícula del polvo obtenido, las propiedades funcionales pueden verse modificadas.

Por tanto, la calidad del polvo estará estrechamente relacionadas con las condiciones aplicadas en las etapas de disrupción (triturado), secado y molienda, lo que a su vez determinará las propiedades funcionales del polvo (Chan *et al.*, 2009).

### 1.3 PROPIEDADES FUNCIONALES DEL BRÓCOLI

El género *Brassica* comprende una gran variedad de hortalizas, entre las que se encuentra el brócoli. La producción mundial de brócoli y coliflor alcanzó 2.000.000 millones de toneladas en 2021 (FAO, 2021). No obstante, solo los brotes y ramilletes del brócoli suelen ser usados para el consumo, mientras que otras partes como los tallos, que constituyen el 21% del peso fresco, son desperdiciadas (Liu *et al.*, 2018). Los tallos y hojas constituyen en todo caso un residuo del proceso de fabricación de brócoli de IV gama, bandejas o brócoli congelado, entre otros. El brócoli comprende una fuente de nutrientes (vitaminas A, E, K y C, minerales y fibras dietéticas) y de fitoquímicos (glucosinolatos y compuestos fenólicos) con grandes beneficios para la salud humana, por lo que el interés por su consumo ha aumentado en los últimos años (Zandani *et al.*, 2021; Li *et al.*, 2022).

Una de las características destacables es la síntesis de metabolitos secundarios denominados glucosinolatos. Su estructura molecular básica consiste en una estructura conservada, una molécula de  $\beta$ -D-tioglucofuranosa unida por un enlace de azufre y una cadena lateral variable derivada de varios aminoácidos (Ishida *et al.*, 2014). Estos compuestos bioactivos son precursores del sabor amargo del brócoli, pero también desempeñan un papel importante en la defensa de las plantas contra herbívoros y microorganismos (Huang *et al.*, 2022; Vargas *et al.*, 2022). De forma natural, se encuentran inactivos, y tras la disrupción tisular, son hidrolizados por el contacto con enzimas endógenas de tipo mirosinasa (tioglucofuranosidas) liberando productos con diversas actividades biológicas (Halkier, 2016), destacando la presencia de isotiocianatos de mayor bioactividad (Rungapamestry *et al.*, 2007).

Asimismo, otra propiedad a remarcar es el contenido en compuestos fenólicos sintetizados a través de la vía del ácido shikímico, la del acetato o una combinación de ambas en respuesta al estrés de la planta para protegerse frente a los ataques bióticos y abióticos mediante su actividad antibacteriana y antioxidante (Thomas *et al.*, 2018). No obstante, estos compuestos están presentes en las plantas tanto libres como unidos a la pared celular (Harbaum *et al.*, 2008). Algunos son liberados mediante la oxidación enzimática o no enzimática de lasas y óxidos respectivamente, así como son vulnerables a las variaciones de pH del medio. Por lo que los tratamientos de obtención serán determinantes en la biodisponibilidad de los compuestos fenólicos del brócoli. En concreto, en el brócoli abundan tanto los compuestos fenólicos simples como los ácidos fenólicos y polifenoles, tales como los flavonoides (Radünz *et al.*, 2020).

Varios estudios *in vitro* e *in vivo* han confirmado la influencia de estos compuestos bioactivos en la salud humana, ya que actúan como un sistema de defensa. Entre los efectos beneficiosos destacan su actividad preventiva contra el cáncer a través de su acción antioxidante, inmunomoduladora y antiinflamatoria, especialmente el de pulmón, mama y colorrectal (García-Tirado *et al.*, 2012; Kaiser *et al.*, 2021; Li *et al.*, 2022). También presentan funciones vasodilatadoras y son capaces de proteger frente a enfermedades como la diabetes o cardiopatías (Radünz *et al.*, 2020), además de ejercer actividad antimicrobiana frente a otros patógenos. Por tanto, se confirma su posible aplicación en el desarrollo de productos farmacéuticos y sanitarios (Esparza *et al.*, 2020). De igual forma, puede ser utilizado en la industria alimentaria para la preservación de las propiedades del alimento y para la fabricación de derivados con mayor aporte nutricional que puedan sustituir ingredientes en harinas, bebidas o *snacks* (Li *et al.*, 2022).

Cabe destacar que el contenido nutricional no es el mismo en todas las porciones del brócoli. Por otro lado, a pesar de que los tallos de brócoli tienen una menor concentración de estos productos hidrolíticos, existen pretratamientos capaces de aumentar la conversión (Li *et al.*, 2022). Además, gran parte de los desperdicios de los tallos se produce después de la etapa de lavado y desinfección, por lo que estarían listos para ser utilizados (Corrado *et al.*, 2019). Wang *et al.* (2020b) han comprobado que el método de disrupción elegido también puede afectar al contenido final del isotiocianato, que a su vez depende de la actividad enzimática. En este sentido, la fermentación puede ser considerada un pretratamiento que promueve la liberación de los compuestos fitoquímicos del brócoli (García y Remize, 2022).

## 1.4 FERMENTACIÓN Y POTENCIAL PROBIÓTICO

La fermentación es un proceso mediante el cual los microorganismos (levaduras, bacterias y mohos), descomponen los azúcares presentes en la matriz dando lugar a la formación de ácidos orgánicos, principalmente ácido láctico, y a la formación de metabolitos con múltiples aplicaciones, como exopolisacáridos con efectos antioxidantes e inmunomoduladores, bacteriocinas y compuestos antimicrobianos, o enzimas (amilasas, glucosidasas, proteasas, lipasas, etc.) capaces de romper la estructura del sustrato facilitando la liberación de nutrientes y, por lo tanto, su bioaccesibilidad. La fermentación se ha utilizado fundamentalmente como técnica de conservación por su capacidad de aumentar la vida útil de las matrices de los alimentos, influyendo en su calidad y funcionalidad. Además, esta operación previene el crecimiento de microorganismos patógenos promoviendo la seguridad alimentaria (Mathur *et al.*, 2020). De entre los microorganismos fermentativos, destacan las bacterias ácido lácticas ya que son un grupo diverso de Gram positivas anaerobias aerotolerantes homofermentativas, siendo *Lactobacillus* el género predominante presente en fermentados lácteos. Sin embargo, también tiene potencial en la fermentación de vegetales, como es el caso de *Lactobacillus plantarum* (*L. plantarum*), empleado ampliamente en la fermentación industrial y en el procesado de alimentos crudos (Behera *et al.*, 2018).

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), el término probiótico se aplica a aquellos microorganismos vivos que confieren un efecto beneficioso para la salud si son administrados en cantidades adecuadas. Tras ser ingeridos, son capaces de proteger el aparato digestivo mediante el mantenimiento del microbioma intestinal, así como incrementar la síntesis de compuestos antimicrobianos y bloquear el lugar de adhesión de patógenos, lo que contribuye en la prevención y tratamiento de enfermedades (Bodke y Jogdand, 2022). Para ello, diversos estudios confirman que la cantidad mínima de probiótico vivo en el momento del consumo debe ser igual o superior a  $10^8$ – $10^{10}$  UFC/día, que corresponde con  $10^6$ – $10^8$  UFC/g en el momento de consumo para lograr beneficios para el organismo (Champagne *et al.*, 2011). Con el fin de utilizarlo como probiótico, es importante conocer la inocuidad del microorganismo y su habilidad de supervivencia y adhesión al tracto gastrointestinal tras la ingesta (Touret *et al.*, 2018). En este sentido, es importante tener en cuenta que la técnica de deshidratación empleada puede comprometer la viabilidad del microorganismo probiótico, debido fundamentalmente a la  $a_w$  del producto y la temperatura y tiempo de exposición al secado. Chirife y Fontana, (2020) establecieron un intervalo de  $a_w$  entre 0,2 y 0,4 como aquél que permite la conservación de los polvos probióticos.

## 1.5 DIGESTIÓN SIMULADA *IN VITRO*

La caracterización funcional de un producto o ingrediente alimentario no debe limitarse a analizar su contenido en compuestos bioactivos, sino que debe completarse mediante el estudio del impacto de la digestión sobre los compuestos presentes y la liberación de otros unidos a la matriz. Durante el proceso de digestión, los alimentos ingeridos sufren una serie de transformaciones mecánicas y enzimáticas, que se inician en la boca y en el estómago con la masticación y movimientos peristálticos reduciendo el tamaño del bolo, y continúan hasta el intestino gracias a la acción de enzimas encargadas de degradar las macromoléculas en moléculas de menor tamaño (Alminger *et al.*, 2014; Lucas-González *et al.*, 2018).

Una de las aplicaciones del estudio de la digestión es el análisis del perfil de los compuestos bioactivos presentes en la materia prima, en este caso del residuo de brócoli (Lucas-González *et al.*, 2018). La cinética de hidrólisis de los macronutrientes, su bioaccesibilidad (cantidad de compuesto soluble liberado de la matriz disponible para su absorción por el intestino delgado) y la biodisponibilidad (cantidad de un compuesto liberado que accede al torrente sanguíneo y puede alcanzar su lugar de acción) son algunos de los parámetros que pueden obtenerse a partir de la simulación del proceso de digestión y que son modificados por las propiedades fisicoquímicas del alimento o ingrediente (Ortega *et al.*, 2011; Le Feunteun *et al.*, 2021). El análisis *in vivo* de estos parámetros es complicado y costoso, además de presentar una serie de limitaciones y restricciones éticas.

Con el fin de eliminar estas limitaciones técnicas y éticas, se han desarrollado simulaciones de la digestión *in vitro*, que tratan de mimetizar las condiciones *in vivo*, teniendo en cuenta la presencia de las distintas enzimas y las condiciones de concentración de sales, pH y tiempo de digestión que se dan en el tracto gastrointestinal de humanos (Minekus *et al.*, 2014). Estos métodos se clasifican en estáticos y dinámicos, cuya principal diferencia es el estudio en condiciones fisicoquímicas constantes por parte de los estáticos, que no pueden tener en cuenta las variables respuestas fisiológicas que se dan durante la respuesta al bolo alimenticio introducido (variación del pH, secreción de enzimas, etc.) (Alminger *et al.*, 2014). A pesar de que no se ha llegado a un consenso en el protocolo dinámico, el protocolo estático sí se ha conseguido estandarizar. Así pues, Minekus *et al.* (2014) propusieron una manera estática y sencilla de estudiar las fases (oral, gástrica e intestinal) por las que atraviesa el alimento a lo largo del tracto gastrointestinal humano. Desde su propuesta y hasta la actualidad, este protocolo se ha venido utilizando habitualmente para el estudio de la digestión simulada *in vitro* de alimentos.

## 2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

El objetivo principal del presente trabajo fue obtener ingredientes funcionales en polvo a partir del residuo de confección de brócoli de IV gama, fermentado y sin fermentar, y su caracterización fisicoquímica y funcional, incluida su respuesta a la digestión simulada *in vitro*.

Para la consecución del objetivo principal se llevaron a cabo los siguientes objetivos específicos:

- Evaluar el crecimiento del microorganismo probiótico *Lactobacillus plantarum* (*L. plantarum*) en residuo de brócoli, y el efecto de la fermentación sobre sus propiedades antioxidantes.
- Obtener ingredientes en polvo a partir de residuo de brócoli mediante el empleo de las operaciones de fermentación y deshidratación (secado por aire caliente a varias temperaturas o liofilización) hasta una actividad del agua ( $a_w$ ) que asegure su estabilidad, combinados con operaciones de triturado previo y molienda final.
- Caracterizar el residuo de brócoli fermentado y sin fermentar los productos en polvo obtenidos en base a sus propiedades fisicoquímicas y antioxidantes.
- Evaluar el efecto de la digestión simulada *in vitro* sobre las propiedades antioxidantes de los productos en polvo y la viabilidad del microorganismo con el fin de evaluar su viabilidad como ingrediente funcional.

Para alcanzar dichos objetivos se diseñó el siguiente plan de trabajo:

- Estudio del crecimiento de *L. plantarum* sobre el residuo de brócoli (tallos y hojas) triturados y su efecto sobre las propiedades antioxidantes del residuo.
- Estudio de las cinéticas de secado por aire caliente a 50, 60 y 70 °C del residuo de brócoli triturado.
- Obtención de productos en polvo a partir de tallos del brócoli mediante secado por aire caliente (SAC) a temperaturas de 50, 60, 70 °C y rampa decreciente de 70 a 50 °C o liofilización (LIO) combinadas con etapas de molienda, para obtener un polvo fino con una  $a_w$  que asegure su estabilidad (0,2-0,4).
- Obtención de productos en polvo a partir de tallos de brócoli enriquecidos con *L. plantarum* mediante operaciones de deshidratación por secado por aire caliente (SAC) a temperaturas de 50; 60; 70 °C y rampa decreciente de 70 a 50 °C o liofilización (LIO) combinada con etapas de molienda, para obtener un polvo fino con una  $a_w$  que asegure su estabilidad (0,2-0,4).
- Caracterización fisicoquímica de los residuos y de los polvos obtenidos en términos de contenido en humedad ( $x_w$ ), actividad del agua ( $a_w$ ) y contenido en sólidos solubles totales ( $x_{ss}$ ); así como sus propiedades antioxidantes con respecto al contenido en fenoles y flavonoides totales, y capacidad antioxidante por los métodos DPPH y ABTS.
- Simulación de las digestiones *in vitro* en fase oral, gástrica e intestinal de los polvos obtenidos y evaluación de las propiedades antioxidantes de los polvos digeridos, así como recuento de viables en los polvos fermentados previo a la deshidratación.

### 3. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.1 MATERIA PRIMA

El brócoli empleado como materia prima para llevar a cabo el estudio fue adquirido en un supermercado de la ciudad de Valencia (España) y conservado en refrigeración a 4 °C durante 24-48 h. Para su utilización, el primer paso consistió en la separación mediante corte con cuchillo de las flores y troceado de los tallos en cuartos. Una vez realizado esto, se procedió al lavado y desinfección de los tallos por inmersión en una disolución al 1% (v/v) de hipoclorito de sodio en agua durante 1 min y posterior enjuagado con agua del grifo. Seguidamente, el residuo separado se trituró en un procesador de alimentos (Thermomix® TM6, Vorwerck®) a 10.000 rpm durante 10 s y se pasteurizó. Para ello, el residuo triturado se distribuyó a razón de 200 g de material vegetal por tarro en tarros de vidrio con cierre Twist-Off que se mantuvieron sumergidos en un baño de agua caliente hasta que el centro geométrico de cada bote alcanzó la temperatura de 72 °C, la cual se mantuvo durante 1 min. Este tratamiento térmico tuvo como finalidad reducir la carga microbiana del residuo vegetal y favorecer el crecimiento del microorganismo inoculado posteriormente.

#### 3.2 MANEJO Y PREPARACIÓN DEL INÓCULO BACTERIANO

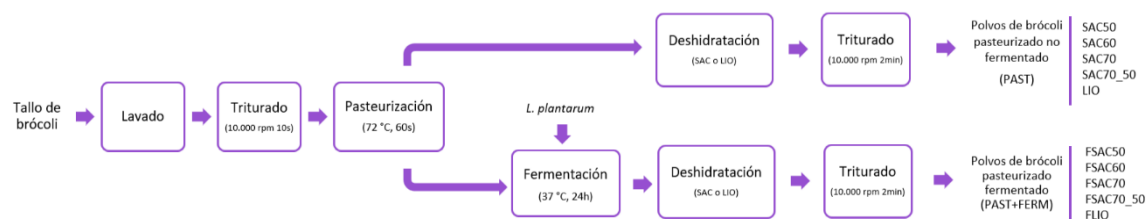
El residuo de brócoli pasteurizado se inoculó con una cepa de *Lactobacillus plantarum* spp. CECT 749 adquirida en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT, Valencia, España). Para ello, el microorganismo se recuperó a partir de crioviales que contenían el liófilo previamente reactivado en caldo Man Rogosa y Sharpe (MRS) (SharlauChemie®, Barcelona, España) conservado en congelación a -20 °C. La descongelación se realizó a temperatura ambiente durante unos minutos, tras los cuales se aplicó una separación en tubo Eppendorf mediante centrifugación durante 1 min a 3.000 rpm (MiniSpin Plus Eppendorf). Después de retirar el sobrenadante, el pellet se resuspendió con 1 mL de caldo MRS (SharlauChemie®, Barcelona, España) que se adicionó a otros 8 mL de caldo MRS que posteriormente se incubaron a 37 °C durante 24 h (Estufa PSelecta modelo Incudigit). Pasado este tiempo, se realizaron siembras masivas o en césped en la superficie de placas de Petri con agar MRS (SharlauChemie®, Barcelona, España) que se incubaron nuevamente a 37 °C durante 24-48 h (PSelecta modelo Incudigit). Estas placas se conservaron en nevera a 4 °C hasta el momento de su utilización, en el que se recogió con el asa de siembra la mayor cantidad de colonias posible de la superficie de las placas y se llevaron a un tubo de ensayo con 9 mL de caldo MRS (SharlauChemie®, Barcelona, España). Tras la incubación a 37 °C durante 24 h se alcanzaron concentraciones en torno a  $2 \cdot 10^9$  UFC/mL. Todos los materiales utilizados fueron previamente esterilizados en autoclave a 120 °C durante 2 h (Systec GmbH, modelo VB-40; Linden, Alemania).

#### 3.3 PROCESO DE OBTENCIÓN DE POLVOS A PARTIR DEL RESIDUO DE BRÓCOLI

El residuo de brócoli, previamente triturado y pasteurizado según se ha descrito anteriormente, fue directamente deshidratado, o bien fermentado y posteriormente deshidratado antes de ser molido. De esta forma se obtuvieron productos en polvo a partir de tallos de brócoli fermentados y no fermentados (Figura 1). Cada lote de brócoli fue convenientemente identificado, de modo que cada producto en polvo se pudo relacionar con su correspondiente lote. En total, se trabajó con 10 lotes de residuo de brócoli, obteniéndose muestra fermentada y no fermentada de cada uno de ellos. Esto resultó en 10 muestras



fermentadas y 10 no fermentadas, las cuales fueron sometidas al proceso de deshidratación y molienda que se describe a continuación.



**Figura 1.** Diagrama de flujo del proceso de transformación de los tallos de brócoli en los diferentes productos en polvo. SAC: Secado por Aire Caliente; LIO: Liofilización; F: Fermentación.

Para llevar a cabo la fermentación, se adicionaron 2 mL del inóculo preparado según se ha descrito anteriormente por cada tarro de vidrio conteniendo 200 g de brócoli. A continuación, los tarros se cerraron y se introdujeron en una estufa a 37 °C durante 24 h donde tuvo lugar la incubación (PSelecta modelo Incudigit). Todo el material empleado en este proceso fue previamente esterilizado en autoclave a 120 °C durante 2 h (Systec GmbH, modelo VB-40; Linden, Alemania). Este proceso se realizó por duplicado previamente a cada uno de los diferentes procesos de deshidratación que se exponen a continuación.

Como técnicas de deshidratación se emplearon la liofilización y el secado por aire caliente. En el caso de la liofilización (LIO), el residuo fermentado y no fermentado se distribuyó formando una capa fina de aproximadamente 1 cm de espesor en bandejas de aluminio. La etapa inicial del proceso de liofilización consistió en una congelación a -40 °C durante al menos 18 h en un ultracongelador (Matek modelo CVN-40/105), seguida de las etapas de sublimación y desorción llevadas a cabo en condiciones de congelación a -45 °C y presión subatmosférica 0,1 mbar en un liofilizador de planta piloto (TELSTAR LIOALFA 6-80) durante 48h.

Por otro lado, el secado por aire caliente (SAC) se realizó en un secador convectivo de bandejas de flujo transversal CLW750 TOP+ (Pol-ekoAparatura, Katowice, Polonia) con una velocidad de aire de 2 m/s, previa distribución del residuo en bandejas perforadas de plástico (200 g/bandeja), en láminas de aproximadamente 1 cm de espesor. El SAC se llevó a cabo con aire a una temperatura constante de 50, 60 y 70 °C y en rampa desde 70 a 50 °C, de manera que se secó a 70 °C durante la primera hora, a 60 °C durante la siguiente hora y a 50 °C hasta completar el secado. Para establecer la duración del secado fue necesario obtener las curvas de secado y de velocidad de secado para cada una de las temperaturas ensayadas. A tal fin, se registró la variación de peso del residuo colocado en bandejas cada 30 min hasta completar las primeras 3 h y cada hora hasta completar las 21 h. También se midió la  $a_w$  en el momento inicial y cada hora a partir de las primeras 4 h hasta obtener un valor de  $a_w$  inferior a 0,3. Concretamente, el secado a 50 °C se completó en 12 h para el residuo de brócoli sin fermentar y fermentado; el secado a 60 °C duró 10 h para el residuo de brócoli sin fermentar y 7 h para el residuo de brócoli fermentado; el secado a 70 °C duró 6 h para el residuo de brócoli sin fermentar y 5 h para el fermentado; y el secado en modo rampa descendente de 70 a 50 °C se completó en 10 h, tanto para brócoli fermentado como sin fermentar.

Tras la deshidratación, el residuo seco se molió en un procesador de alimentos Thermomix® a 10.000 rpm durante 2 min en intervalos de 30 s hasta obtener un polvo fino. Todos los polvos

fueron almacenados en oscuridad y a temperatura ambiente en tarros de cristal estériles con cierre Twist-Off y envueltos en papel de aluminio hasta su análisis. De esta forma se evitó el contacto con el oxígeno y la luz, principales responsables del deterioro de las muestras.

En adelante, el residuo de brócoli y los respectivos polvos obtenidos según los diferentes procesos descritos serán identificados con las siguientes abreviaturas:

**PAST:** residuos de tallo de brócoli lavados, triturados y pasteurizados

**PAST+FERM:** residuos de tallo de brócoli lavados, triturados, pasteurizados y fermentados

**SAC50:** polvos obtenidos mediante secado con aire a 50 °C de muestras PAST

**FSAC50:** polvos obtenidos mediante secado con aire a 50 °C de muestras PAST+FERM

**SAC60:** polvos obtenidos mediante secado con aire a 60 °C de muestras PAST

**FSAC60:** polvos obtenidos mediante secado con aire a 60 °C de muestras PAST+FERM

**SAC70:** polvos obtenidos mediante secado con aire a 70 °C de muestras PAST

**FSAC70:** polvos obtenidos mediante secado con aire a 70 °C de muestras PAST+FERM

**SAC70\_50:** polvos obtenidos mediante secado con aire a temperatura decreciente de 70 a 50 °C de muestras PAST

**FSAC70\_50:** polvos obtenidos mediante secado con aire a temperatura decreciente de 70 a 50 °C de muestras PAST+FERM

**LIO:** polvos obtenidos mediante liofilización de muestras PAST

**FLIO:** polvos obtenidos mediante liofilización de muestras PAST+FERM

El proceso se realizó por duplicado para cada uno de los tratamientos de deshidratación, a partir de un total de 10 lotes diferentes de brócoli (2 lotes por técnica de deshidratación). Como se ha mencionado anteriormente, cada técnica de deshidratación se aplicó simultáneamente sobre el residuo de un mismo lote, fermentado y sin fermentar.

### 3.4 DETERMINACIONES ANALÍTICAS

Los tallos de brócoli triturados y los polvos obtenidos fueron caracterizados en cuanto a sus propiedades fisicoquímicas (humedad, actividad del agua y contenido en sólidos solubles totales), incluidas sus propiedades antioxidantes (fenoles y flavonoides totales y capacidad antioxidante por los métodos DPPH y ABTS). En el caso de que el proceso incluyera una etapa de fermentación, también se hizo recuento de viables antes y después de la deshidratación.

#### 3.4.1 Propiedades fisicoquímicas

##### 3.4.1.1 Actividad del agua

La actividad del agua ( $a_w$ ) se determinó con un higrómetro de punto de rocío (Aqualab 4TE; Decagon Devices Inc, Pullman WA, USA) con una precisión de  $\pm 0,003$  y una temperatura de 25 °C, siendo calibrado previamente con disoluciones saturadas de referencia. Este ensayo se realizó por duplicado para cada muestra.

##### 3.4.1.2 Humedad

Para determinar la humedad se utilizó el método gravimétrico de doble pesada para alimentos ricos en azúcares (AOAC 934.06), que consiste en cuantificar la pérdida de peso que experimenta una cantidad determinada de muestra tras su secado en una estufa de vacío (VACIOTEM-T J.P. SELECTA) a 200 mm Hg y 60 °C hasta alcanzar peso constante. Este ensayo se realizó por triplicado para cada muestra y las medidas de peso registradas con una balanza de 1

mg de precisión (Mettler Toledo Inc., Barcelona, España) se transformaron en fracción másica de agua o humedad aplicando la ecuación 1.

$$x_w (\text{kg w/kg sh}) = \frac{M_1 - M_2}{M_1 - M_0} \quad (\text{Ec 1})$$

donde:

$M_0$  es el peso del crisol vacío (g)

$M_1$  es el peso del crisol y la muestra húmeda antes del secado (g)

$M_2$  es el peso del crisol y la muestra tras el secado en la estufa a vacío (g)

#### 3.4.1.3 Sólidos solubles totales

El contenido en sólidos solubles totales ( $x_{ss}$ ) se calculó a partir de la humedad de la muestra ( $x_w$ ) y de los grados Brix ( $^{\circ}\text{Brix}$ ) de la fase líquida resultante de mezclar la muestra con agua destilada en una relación 1:10 (m/m), tal y como se detalla en la ecuación 2. Para la lectura de los  $^{\circ}\text{Brix}$  se empleó un refractómetro de mesa (ABBE ATAGO, 3-T, Japón) termostatado a 20  $^{\circ}\text{C}$ . Este ensayo se realizó por triplicado para cada muestra.

$$^{\circ}\text{Brix} = \frac{x_{ss}}{x_{ss} + (x_w + m_w)} \cdot 100 \quad (\text{Ec 2})$$

donde:

$x_{ss}$  es la fracción másica de sólidos solubles ( $\text{g}_{ss}/\text{g}_{\text{muestra}}$ )

$x_w$  es la humedad de la muestra ( $\text{g}_w/\text{g}_{\text{muestra}}$ )

$m_w$  es la cantidad de agua añadida para la extracción (10 g)

### 3.4.2 Propiedades antioxidantes

Para la determinación de las propiedades antioxidantes se obtuvieron extractos a partir de la mezcla de 4 g de muestra sin deshidratar o 1 g de polvo y 10 mL de metanol al 80% (v/v) en agua bidestilada, que permaneció en agitación (agitador horizontal COMECTA WY-100) durante 1 h. Pasado este tiempo, la mezcla se centrifugó (Eppendor Centrifuge 5804 R) a 10.000 rpm durante 5 min. De esta forma se separó el sobrenadante, sobre el que se realizaron todas las medidas. En el caso de los polvos, fue necesario hacer diluciones de los extractos previamente a la determinación espectrofotométrica correspondiente.

#### 3.4.2.1 Contenido en fenoles totales

Siguiendo el protocolo descrito por Singleton *et al.*, (1999), la evaluación del contenido de fenoles totales consiste en hacer reaccionar los fenoles presentes en el extracto con el reactivo de Folin-Ciocalteu, a pH básico, dando lugar a una coloración determinada espectrofotométricamente (Helios Zeta UV/Vis, Thermo scientific, UK) a 765 nm. Para ello, se adicionaron 0,5 mL de agua bidestilada, 0,125 mL del reactivo de Folin-Ciocalteu y 0,125 mL de extracto en cada cubeta espectrofotométrica y se procedió a la incubación de éstas en oscuridad durante 6 min. Tras ello, se añadieron 1,25 mL de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 7% y 1 mL de agua bidestilada y la

mezcla se mantuvo de nuevo en oscuridad durante 90 min. Como blanco, se realizó la misma disolución sustituyendo la cantidad del extracto por 0,125 mL del disolvente empleado para la extracción. Este ensayo se llevó a cabo por triplicado para cada muestra y, en el caso de los polvos, tras diluir el extracto en el disolvente empleado para la extracción previa en una relación 1:5 (v/v).

Los resultados obtenidos se expresaron en mg de Ácido Gálico Equivalente (EAG) por g de materia seca (mg EAG/g<sub>ms</sub>) a partir de la recta de calibrado obtenida para este compuesto de referencia (pureza ≥ 98%, Sigma-Aldrich) en el intervalo de concentraciones comprendido entre 0 y 600 mg/L.

#### 3.4.2.2 Contenido en flavonoides totales

Para determinar el contenido en flavonoides totales se empleó el método colorimétrico del cloruro de aluminio (AlCl<sub>3</sub>) descrito por Luximon-Ramma *et al.*, (2006), el cual consiste en hacer reaccionar 1,5 mL del extracto previamente preparado con 1,5 mL de una disolución de cloruro de aluminio al 2% (m/v) en metanol en ausencia de luz y medir la absorbancia a 368 nm tras 10 min de reposo en oscuridad en un espectrofotómetro (Helios Zeta UV/Vis, Thermo scientific, UK). El blanco se preparó reemplazando el extracto por 1,5 mL del disolvente de la extracción. Este ensayo se llevó a cabo por triplicado para cada muestra y, en el caso de los polvos, se realizó una dilución 1:5 (v/v) del extracto usando como disolvente el mismo que para la extracción previa.

Los resultados obtenidos se expresaron en mg de Quercetina Equivalentes (EQ) por g de muestra seca (mg EQ/g<sub>ms</sub>), a partir de la recta de calibrado obtenida para este compuesto de referencia (pureza ≥ 98%, Sigma-Aldrich) en el intervalo de concentraciones comprendido entre 0 y 200 mg/L.

#### 3.4.2.3 Capacidad antioxidante: métodos DPPH y ABTS

La capacidad antioxidante se determinó mediante las pruebas de DPPH y ABTS. En el caso del DPPH, consiste en medir la capacidad de los compuestos antioxidantes del extracto de reducir el radical libre DPPH· (2,2-difenil-1-picrilhidracilo) disuelto en metanol, dando lugar a una reacción colorimétrica cuantificable por espectrofotometría (Helios Zeta UV/Vis, Thermo scientific, UK) a 517 nm (Brand-Williams *et al.*, 1995). En una cubeta, se dispusieron 0,1 mL de extracto, 0,9 mL de metanol y 2 mL de una disolución 0,01 mM de DPPH en metanol y se midió su absorbancia tras 60 min de reacción en ausencia de luz. Este ensayo se llevó a cabo por triplicado para cada muestra y, en el caso de los polvos, se realizó una dilución 1:5 (v/v) del extracto usando como disolvente el mismo que para la extracción previa.

Los resultados obtenidos se expresaron en mg de Trólox Equivalente (ET) por g de muestra seca (mg ET/g<sub>ms</sub>), a partir de la recta de calibrado obtenida para este compuesto de referencia (pureza ≥ 98%, Sigma-Aldrich) en el intervalo de concentraciones comprendido entre 0 y 200 mg/L.

Por su parte, el método ABTS consiste en medir la capacidad de los compuestos antioxidantes del extracto de reducir el radical ABTS<sup>+</sup> (ácido 2,29-azobis-3-etil benzotiazolin-6-sulfónico) disuelto en peróxido de potasio, dando lugar a una reacción colorimétrica cuantificable por espectrofotometría (Helios Zeta UV/Vis, Thermo scientific, UK) a 734 nm (Re *et al.*, 1999). Para obtener el radical ABTS<sup>+</sup> se preparó una disolución 7 mM de ABTS y 2,45 mM de persulfato potásico en agua destilada y se mantuvo en oscuridad durante 16 h a temperatura ambiente.

Previo al análisis, se mezcló esta disolución de ABTS con tampón fosfato hasta obtener una absorbancia de 0,7 nm medida a 734 nm. Posteriormente, se hizo reaccionar 0,1 mL de extracto y 2,9 mL de la nueva disolución de ABTS durante 7 min en ausencia de luz, antes de medir de nuevo la absorbancia a 734 nm. Este ensayo se llevó a cabo por triplicado para cada muestra y, en el caso de los polvos, se realizó una dilución 1:10 (v/v) del extracto usando como disolvente el mismo que para la extracción previa.

Los resultados obtenidos se expresaron en mg de Trólox Equivalentes (ET) por g de muestra seca (mg ET/g<sub>ms</sub>), a partir de la recta de calibrado obtenida para este compuesto de referencia (pureza ≥ 98%, Sigma-Aldrich) en el intervalo de concentraciones comprendido entre 0 y 200 mg/L.

### 3.4.3 Recuento microbiano

El contenido en *L. plantarum* se obtuvo por el método de dilución seriada en agua de peptona tamponada estéril y posterior siembra en placa. En el caso de las muestras sólidas de tallo de brócoli fermentado y los polvos obtenidos a partir de éste, la primera dilución se preparó en una bolsa de *Stomacher* en la que se mezclaron 3 g de muestra y 27 mL de agua de peptona tamponada estéril (ScharlauChemie®, Barcelona, España). La siembra se llevó a cabo en superficie de placas con medio agar MRS (SharlauChemie®, Barcelona, España) y, a continuación, las placas sembradas se incubaron a 37 °C durante 24-48 h. Pasado este tiempo, se contaron las colonias presentes, siempre que el número estuviera comprendido entre 30 y 300 Unidades Formadoras de Colonias (UFC).

## 3.5 ENSAYO DE DIGESTIÓN SIMULADA *IN VITRO*

Los ensayos de simulación *in vitro* de la digestión gastrointestinal se llevaron a cabo según el protocolo estandarizado propuesto por Minekus *et al.* (2014) y a partir de los polvos obtenidos por secado por aire caliente 60 °C y liofilización, que fueron seleccionados en base a los resultados de las determinaciones analíticas. Para ello, se prepararon en primer lugar los fluidos gástricos e intestinales simulados, siguiendo las instrucciones establecidas por el protocolo para 500 mL de fluido simulado (Tabla 1). El fluido simulado salivar (SSF) se obtuvo a partir de la mezcla de 975 µL de agua bidestilada y 25 µL de CaCl<sub>2</sub> 0,3 M para un volumen de 1 L.

**Tabla 1.** Concentración (mol/L) de sales recomendada para las disoluciones stock y volumen (mL) necesario para 500 mL en la preparación de la simulación de los fluidos gástricos (SGF) e intestinales (SIF), (Minekus *et al.*, 2014).

SALES	mol/L	SGF (mL)	SIF (mL)
KCl	0,5	6,9	6,8
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,5	0,9	0,8
NaHCO <sub>3</sub>	1	12,5	42,5
NaCl	2	11,8	9,6
MgCl <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>6</sub>	0,15	0,4	1,1
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0,5	0,5	-
NaOH	1	-	-
HCl	6	1,3	0,7

Además, se adicionaron las correspondientes enzimas presentes en los fluidos gástrico simulado (SGF) e intestinal simulado (SIF). En el caso del SGF, se completó con pepsina aislada de la mucosa gástrica porcina (Sigma-Aldrich) hasta alcanzar una concentración final de 25000 U/mL. Mientras que, el SIF se completó con pancreatina aislada de páncreas de porcino (Sigma-Aldrich) hasta una concentración final de 800 U/mL.

Para simular la fase oral (FO), se mezclaron 1 g de cada uno de los polvos seleccionados para el estudio en tubos Falcon de 50 mL con 1 mL de SSF con la ayuda de un vórtex durante 2 min a temperatura ambiente. Para simular la fase gástrica (FG), se adicionaron 2 mL de SGF a la mezcla anterior y el conjunto se incubó 2 h a 37 °C en una cámara de incubación (JP Selecta SA, Barcelona) y en agitación por rotación a 55 rpm (Intell-Mixer RM-2, Elmi Ltd, Riga). Para ello, previamente se ajustó a 3 el pH del SGF mediante la adición de HCl 6 M con un pH-metro digital (Mettler-Toledo GmbH., Schwezenbach, Switzerland). Para simular la fase intestinal (FI), se mezcló el quimo con 4 mL de SIF en una proporción 1:1 (v/v) y el conjunto se incubó en las mismas condiciones que se han descrito para la FG. En este caso, el pH del SIF se ajustó a 7 con NaOH 1 M con un pH-metro digital (Mettler-Toledo GmbH., Schwezenbach, Switzerland).

Todos los ensayos se realizaron por duplicado para cada uno de los polvos seleccionados.

### 3.5.1 Valoración de la respuesta a la digestión simulada *in vitro*

El impacto de la digestión *in vitro* se evaluó sobre el recuento de viables, en aquellos polvos obtenidos a partir de tallo de brócoli fermentado, y sobre las propiedades antioxidantes (contenido en fenoles y flavonoides totales y capacidad antioxidante por los métodos DPPH y ABTS descritos anteriormente), para todos los productos en polvo digeridos. En el primer caso, la medida se llevó a cabo sobre toda la fase que se obtiene al final de las etapas gástrica e intestinal. En el segundo caso, dicha fase se centrifugó a 10000 rpm durante 5 min (Eppendorf Centrifuge 5804 R) y las medidas se realizaron por separado en el sobrenadante y el precipitado resultantes de la separación. El sobrenadante recogido tras las fases gástrica e intestinal se analizó directamente, pero hubo que extraer los compuestos de interés del precipitado utilizando una disolución de metanol al 80% (v/v) en agua en una relación 1:10 (m/v). Adicionalmente, hubo que diluir este extracto en una relación 1:5 (v/v) con el mismo disolvente de extracción para medir la capacidad antioxidante por el método ABTS. Esta misma dilución se aplicó sobre el extracto obtenido a partir del precipitado resultante tras la fase intestinal para medir la capacidad antioxidante por el método DPPH. Antes de analizar el contenido en fenoles totales, flavonoides totales y actividad antioxidante por el método ABTS del sobrenadante obtenido tras la fase intestinal, también hubo que diluirlo con la disolución de metanol al 80% (v/v) en agua en una relación 1:10 (v/v).

De esta forma se pudo calcular el índice de recuperación (IR) para cada uno de los compuestos antioxidantes de interés a partir de la ecuación 3 descrita por Ortega *et al.*, (2011). El IR es la cantidad de compuestos de interés que en la muestra digerida (sobrenadante y precipitado) tras la simulación de las fases gástrica e intestinal, con respecto a la cantidad presente antes de la digestión.

$$\text{IR (\%)} = \frac{A}{B} \times 100 \quad (\text{Ec 3})$$

donde:

**A** es el contenido del compuesto de interés (g) en la muestra total digerida (sobrenadante y precipitado) obtenida tras la FG o tras la FI

**B** es el contenido del compuesto de interés en la muestra antes de ser digerida (g)

### 3.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

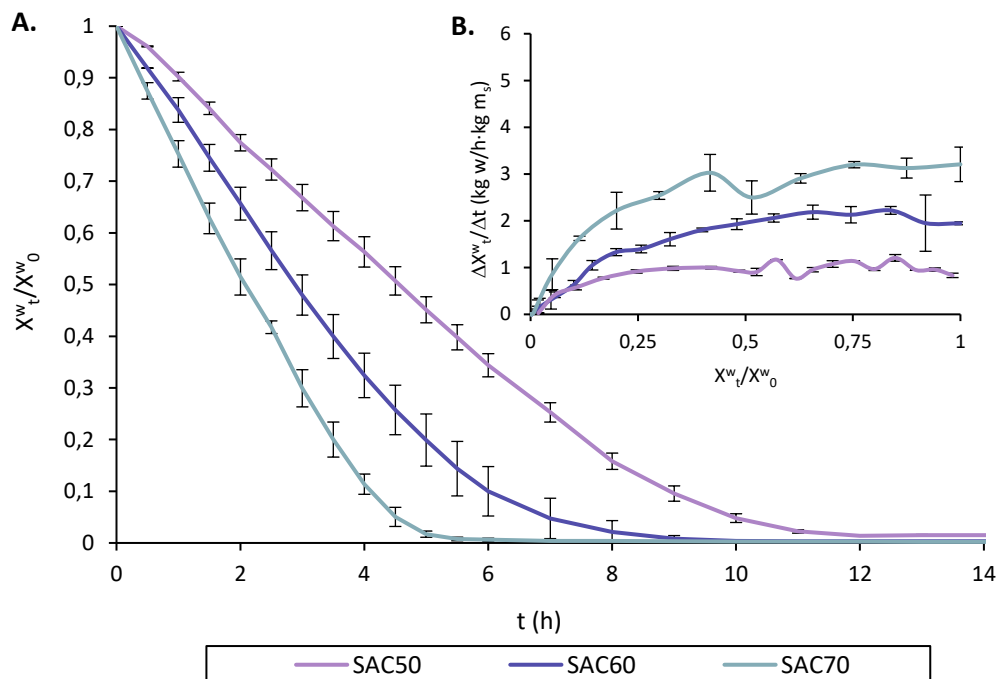
El grado de significancia estadística de las diferentes variables consideradas sobre los resultados obtenidos se evaluó con el programa Statgraphics Centurión XVIII (Statpoint Technologies, Inc.) mediante análisis simple y/o multifactorial de la varianza (ANOVA simple y/o multifactorial) con un nivel de confianza del 95% ( $p < 0,05$ ).

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 ESTUDIO DE LA CINÉTICA DE SECADO

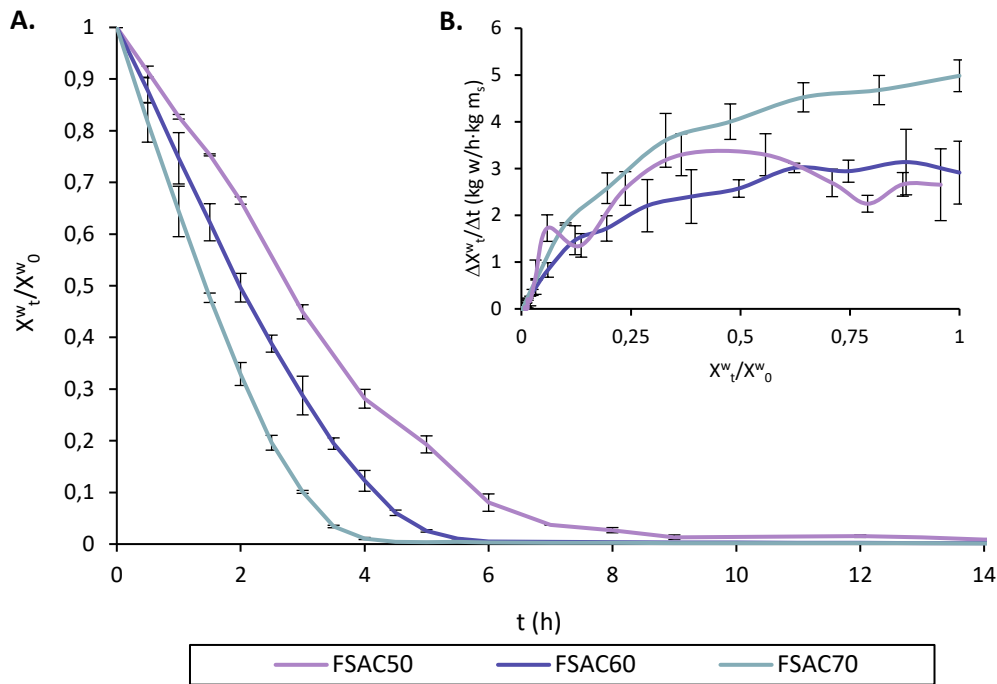
Estudiar la cinética de secado es crucial para el diseño del proceso y la selección de las condiciones que permitan obtener un producto de calidad. Las curvas de secado muestran la variación en el contenido en agua del producto con el tiempo transcurrido y las curvas de velocidad de secado muestran la relación entre la velocidad de secado y la humedad. La velocidad con la que un producto intercambia agua con el aire que lo rodea depende de factores externos, tales como la temperatura y humedad relativa del aire de secado, el flujo (caudal y velocidad) de aire, la densidad de carga del secador o la presión de trabajo; y de factores internos, tales como la composición, la estructura o la geometría del material a secar, que condicionan el transporte de agua por el interior de este.

En las Figuras 2 y 3 se muestran las curvas de secado (A) y de velocidad de secado (B) de tallo de brócoli pasteurizado, no fermentado y fermentado, respectivamente. Para facilitar la interpretación de los resultados, la humedad en base seca de la muestra en cada instante del proceso ( $X_t^w$ ) se ha expresado con respecto a su valor inicial ( $X_0^w$ ).



**Figura 2.** Curvas de secado (A) y de velocidad de secado (B) de tallo de brócoli triturado, pasteurizado y no fermentado (PAST), secado con aire caliente a 50, 60 y 70 °C.





**Figura 3.** Curvas de secado (A) y de velocidad de secado (B) de tallo de brócoli triturado, pasteurizado y fermentado (PAST+FERM), secado con aire a 50, 60 y 70 °C.

Como era de esperar, debido al mayor gradiente de actividad del agua existente entre el tallo de brócoli y el aire circundante, el tiempo necesario para alcanzar un determinado nivel de humedad en el producto disminuyó al aumentar la temperatura del aire de secado. De esta forma, el residuo secado a mayor temperatura (70 °C) alcanzó una  $a_w$  en torno a 0,3 estando menos tiempo expuesto a la luz y al oxígeno responsables de la degradación de determinados compuestos bioactivos (Miranda *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2020). Este comportamiento coincide con el observado en estudios previos de secado de residuos de *Brassica* (Bas-Bellver *et al.*, 2022), mango y mora (Zhang *et al.*, 2017; Eminoğlu *et al.*, 2019). Por otra parte, al comparar las curvas de secado correspondientes a una misma temperatura, se comprueba que el contenido en agua remanente en un instante de tiempo determinado fue menor cuando el residuo había sido fermentado antes de la etapa de deshidratación. Esto podría deberse a la acción microbiana sobre el tejido vegetal ya que, como consecuencia de la actividad de los enzimas de origen microbiano, algunas estructuras celulares pueden sufrir roturas irreversibles, aumentando la cantidad de agua libre o poco ligada (Parada *et al.*, 2023), lo cual habría facilitado su incorporación a la corriente de aire por evaporación desde la superficie.

Al analizar las curvas de velocidad de secado, no solo se confirma el efecto de las variables anteriormente comentadas, sino que también se obtiene información acerca de las etapas implicadas en el proceso. Desde un punto de vista teórico, el secado convectivo de un sólido comienza con un periodo de inducción (PI) o de acondicionamiento inicial, continúa con un periodo de velocidad de secado constante (PVSC) y acaba con un periodo de velocidad de secado decreciente (PVSD). En la práctica, la presencia de cada una de estas etapas dependerá de las características del material a secar y de las condiciones de secado aplicadas (Zhu y Xia, 2013). Durante el PI el sólido se calienta hasta alcanzar la temperatura de saturación adiabática del aire en contacto con él sin apenas variar su contenido en agua. Durante el PVSC, la velocidad de transferencia de agua por el interior del sólido es suficientemente elevada como para reemplazar

de forma instantánea las moléculas de agua que se evaporan desde la superficie, la cual se mantiene permanentemente húmeda y es por lo que el aire en contacto con ella se satura. En este periodo, la temperatura del sólido permanece constante e igual a la temperatura de saturación del aire y la velocidad de secado depende fundamentalmente de las condiciones del aire (Inyang *et al.*, 2018). A partir de un determinado instante, denominado instante crítico (al que le corresponde una humedad crítica), el agua tiene mayor dificultad para alcanzar la superficie de modo que aparecen zonas secas en la misma, por las que penetra el calor procedente del aire caliente. Conforme avanza el proceso, la cantidad de energía empleada en calentar el sólido aumenta, y la velocidad de secado disminuye, dado que la transferencia de agua por el interior del sólido es más lenta, y no consigue reemplazar las todas moléculas que se evaporan desde la superficie. Este periodo, denominado PVSD, está gobernado fundamentalmente por las características intrínsecas del material a secar (Inyang *et al.*, 2018).

En la práctica, las curvas de velocidad de secado de tallo de brócoli pasteurizado, fermentado y sin fermentar, obtenidas experimentalmente (Figuras 2B y 3B) solo muestran dos periodos: un PVSC y un PVSD. En general, las curvas experimentales obtenidas muestran un PVSC inicial en el que la velocidad de secado varía en función de la temperatura utilizada, resultando superior a mayor temperatura. Este hecho es más significativo en las muestras no fermentadas (Figura 2B). Se observa también un segundo periodo de PVSD, en el que los mecanismos de difusión del agua hacia la superficie estarían limitando la velocidad a la que se elimina agua de la muestra. Este cambio de comportamiento del sólido se evidencia una vez eliminadas aproximadamente 3/4 partes del agua inicialmente presente en la muestra misma.

No obstante, en las muestras fermentadas (Figura 3B) la cinética de secado parece iniciarse directamente en un PVSD en ciertos casos, tras haberse iniciado a velocidades de secado superiores. Este comportamiento se hace más evidente a mayor temperatura de secado, y sería indicativo de una mayor disponibilidad del agua para ser evaporada desde la superficie de la muestra, es decir, una mayor proporción de agua libre o poco ligada en el producto que daría lugar a un gradiente de  $a_w$  mayor entre el aire y el producto. Esta respuesta evidenciaría la acción de las enzimas bacterianas sobre la matriz vegetal del residuo como consecuencia de la fermentación (Parada *et al.*, 2023), según se ha discutido anteriormente. Del mismo modo, el hecho de que el inicio del proceso directamente en un PVSD sea más evidente a temperaturas superiores, estaría sugiriendo mayores cambios en la estructura de la matriz durante el secado, los cuales podrían deberse a fenómenos de encostramiento o compactación de la superficie, que estarían interrumpiendo la difusión del agua desde las zonas alejadas hasta la interfase sólido-aire. Este fenómeno ocurre principalmente en condiciones de temperaturas altas que dan lugar a elevadas velocidades de secado iniciales (Bas-Bellver *et al.*, 2022). Además, el fenómeno de encostramiento da lugar a una acumulación de compuestos no volátiles y productos de Maillard en esta región, así como la degradación de compuestos termolábiles a medida que se reduce la superficie húmeda.

Se confirma, por tanto, que tanto la temperatura de secado como la fermentación previa del tallo de brócoli condicionan su respuesta frente al SAC. Además, a partir del estudio cinético se pudieron determinar los tiempos de secado necesarios para la fabricación de los polvos de tallo de brócoli que cumplieren con el objetivo de  $a_w$  entre 0,2 y 0,4, necesario para garantizar su estabilidad hasta el momento de uso. En concreto, los tiempos requeridos en las operaciones de

SAC fueron: 12 h para el residuo de brócoli sin fermentar y fermentado secado a 50 °C; 10 h para el residuo de brócoli sin fermentar y 7 h para el residuo de brócoli fermentado secado a 60 °C y; 6 h para el residuo de brócoli sin fermentar y 5 h para el fermentado a 70 °C. Como se puede comprobar en las Figuras 2A y 3A, antes de estos tiempos la humedad reducida ya había alcanzado valores próximos a los de equilibrio; sin embargo, hubo que prolongar la duración del secado para poder alcanzar la  $a_w$  objetivo. El estudio de la cinética de secado también permitió definir la duración de los intervalos de secado en rampa descendente de temperatura, resultando ser de 1 h a 70 °C, seguida de 1 h a 60 °C y acabando con 8 h a 50 °C, tanto para el residuo fermentado como para el residuo sin fermentar.

## 4.2 CARACTERIZACIÓN DEL RESIDUO DE BRÓCOLI Y DE LOS PRODUCTOS EN POLVO OBTENIDOS

### 4.2.1 Propiedades fisicoquímicas

En la Tabla 2 se muestran los resultados correspondientes a las medidas de la actividad del agua ( $a_w$ ), el contenido en humedad ( $x_w$ ) y el contenido en sólidos solubles totales ( $x_{ss}$ ) del tallo de brócoli pasteurizado, fermentado y sin fermentar, antes y después de la deshidratación por diferentes técnicas y posterior molienda.

**Tabla 2.** Valores de actividad de agua ( $a_w$ ), contenido en humedad ( $x_w$ ) y sólidos solubles totales ( $x_{ss}$ ) del tallo de brócoli obtenidos para cada tratamiento. Media  $\pm$  desviación estándar de tres repeticiones.

TRATAMIENTO	$a_w$	$x_w$ (g <sub>w</sub> /g <sub>total</sub> )	$x_{ss}$ (g <sub>ss</sub> /g <sub>total</sub> )
PAST	0,987 $\pm$ 0,007 <sup>d</sup>	0,905 $\pm$ 0,010 <sup>e</sup>	0,5 $\pm$ 0,05 <sup>a</sup>
PAST+ FERM	0,990 $\pm$ 0,004 <sup>d</sup>	0,92 $\pm$ 0,02 <sup>e</sup>	0,55 $\pm$ 0,10 <sup>ab</sup>
SAC50	0,30 $\pm$ 0,03 <sup>abc</sup>	0,06 $\pm$ 0,03 <sup>d</sup>	0,76 $\pm$ 0,05 <sup>ef</sup>
FSAC50	0,31 $\pm$ 0,03 <sup>bc</sup>	0,067 $\pm$ 0,004 <sup>d</sup>	0,72 $\pm$ 0,06 <sup>def</sup>
SAC60	0,24 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>	0,023 $\pm$ 0,012 <sup>a</sup>	0,60 $\pm$ 0,05 <sup>abc</sup>
FSAC60	0,30 $\pm$ 0,05 <sup>abc</sup>	0,04 $\pm$ 0,02 <sup>abc</sup>	0,8 $\pm$ 0,3 <sup>f</sup>
SAC70	0,31 $\pm$ 0,03 <sup>bc</sup>	0,026 $\pm$ 0,008 <sup>a</sup>	0,69 $\pm$ 0,05 <sup>cdef</sup>
FSAC70	0,33 $\pm$ 0,03 <sup>c</sup>	0,040 $\pm$ 0,012 <sup>abc</sup>	0,64 $\pm$ 0,05 <sup>bcd</sup>
SAC70_50	0,27 $\pm$ 0,06 <sup>ab</sup>	0,028 $\pm$ 0,015 <sup>ab</sup>	0,68 $\pm$ 0,06 <sup>cdef</sup>
FSAC70_50	0,28 $\pm$ 0,09 <sup>abc</sup>	0,05 $\pm$ 0,02 <sup>cd</sup>	0,69 $\pm$ 0,05 <sup>cdef</sup>
LIO	0,31 $\pm$ 0,02 <sup>bc</sup>	0,05 $\pm$ 0,03 <sup>bcd</sup>	0,58 $\pm$ 0,03 <sup>abc</sup>
FLIO	0,299 $\pm$ 0,013 <sup>abc</sup>	0,033 $\pm$ 0,017 <sup>abc</sup>	0,65 $\pm$ 0,03 <sup>bcde</sup>

<sup>a,b,c...</sup>Diferentes superíndices en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas con un nivel de confianza del 95% (p-valor < 0,05)

Los valores de  $a_w$  obtenidos para el residuo sin deshidratar confirman que este material es muy susceptible de experimentar reacciones de deterioro. Sin embargo, tras la deshidratación por cualquiera de las técnicas empleadas, este parámetro disminuyó a valores entre 0,2 y 0,4 que permiten alargar su vida útil y asegurar su estabilidad (Chirife y Fontana, 2020).

Si bien la fermentación no afectó significativamente la  $a_w$  del residuo fresco, los polvos obtenidos mediante secado por aire caliente de tallos de brócoli fermentados presentaron valores de  $a_w$  ligeramente superiores a los no fermentados. Esta tendencia, que también se observa al analizar el contenido en agua de los polvos, podría deberse a las diferencias estructurales existentes entre ambos productos. En el caso de los residuos fermentados, la mayor facilidad inicial con la que se elimina el agua de la superficie del producto, más relevante conforme aumenta la temperatura y que da lugar al fenómeno de encostramiento, implicaría una mayor dificultad para reducir los valores de humedad y actividad del agua (Maskan, 2001). En el caso de la liofilización, la tendencia es contraria, aunque no tan significativa, lo que indicaría que la degradación del tejido celular como consecuencia de la fermentación con *L. plantarum* habría facilitado la formación de cristales de hielo y posterior sublimación del hielo formado. De una manera u otra se pone de manifiesto que la actividad del microorganismo sobre la estructura del tallo de brócoli promueve el aumento en la proporción de agua libre o poco ligada.

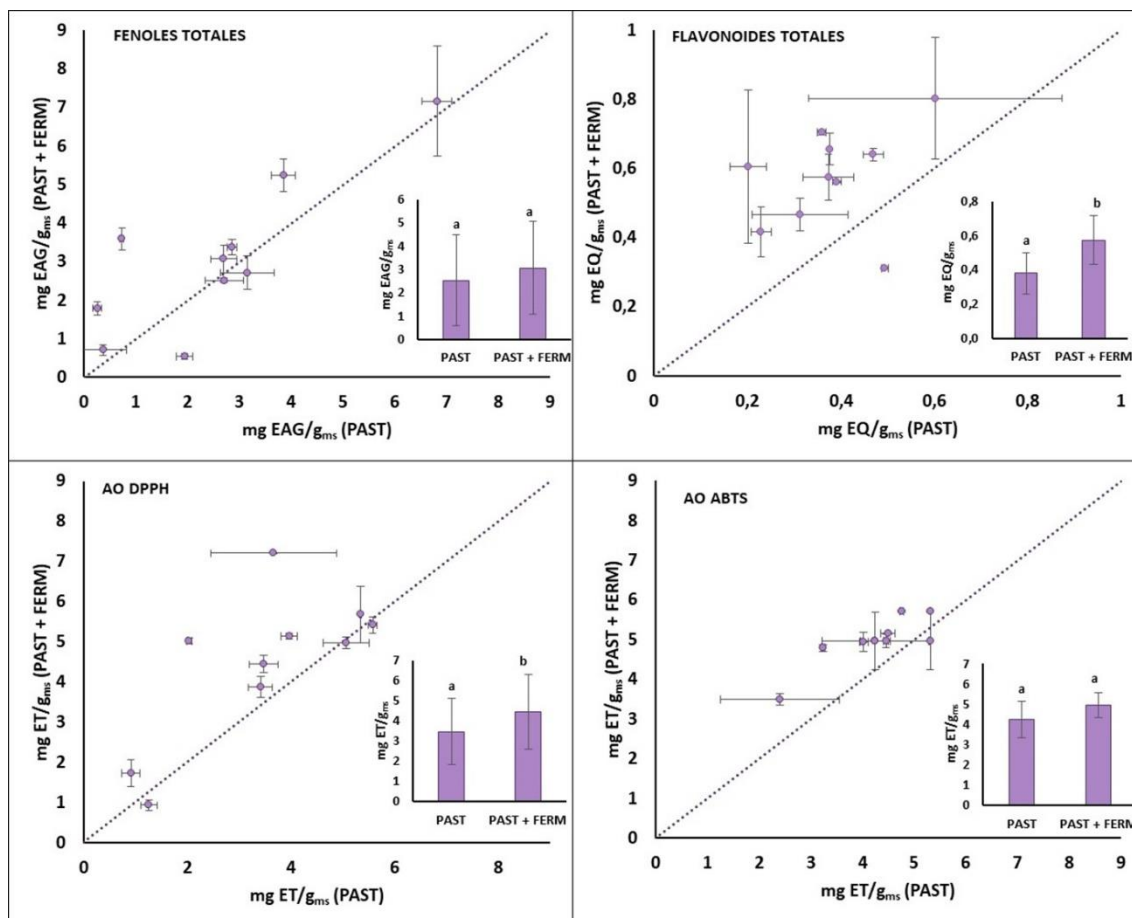
Por otro lado, los polvos secados a 50 °C (SAC50 y FSAC50) presentaron un contenido en humedad ligeramente más elevado ( $p$ -valor < 0,05), en comparación con el resto de los productos en polvo. De forma similar, en un estudio previo llevado a cabo con pulpa de arándano, el secado con aire a 60 °C resultó en un producto con un mayor contenido en humedad que el secado con aire a 70 °C ( $p$ -valor < 0,05) (Calabuig-Jiménez *et al.*, 2022). Este hecho podría deberse a la mayor dificultad en alcanzar contenidos de humedad bajos cuando la deshidratación tiene lugar a temperaturas menores, a pesar de haberse prolongado el tiempo de secado.

En cuanto al contenido de sólidos solubles totales, el microorganismo los utilizara como fuente de energía y carbono en su proliferación. Por ejemplo, en un estudio sobre zumo de manzana, el contenido de glucosa y fructosa se redujo significativamente después de 24 h de fermentación por *L. plantarum* (Li *et al.*, 2018). Si bien es cierto, durante la fermentación las bacterias no solo consumen los azúcares disponibles, sino que también degradan los polisacáridos de la matriz vegetal por acción de las enzimas bacterianas, y liberan azúcares más simples, fácilmente metabolizados por los microorganismos (Parada *et al.*, 2023). Esto podría justificar el mayor contenido en sólidos solubles totales obtenido para las muestras PAST+FERM, FSAC60, FSAC70\_50 y FLIO con respecto al de sus equivalentes sin fermentar.

Respecto al tratamiento de deshidratación empleado, se esperaba que la liofilización resultara en un polvo con una estructura más frágil y porosa de la que los sólidos solubles pudieran ser más fácilmente extraídos en comparación con los polvos SAC (Van Buggenhout *et al.*, 2006), tal y como se ha constatado en trabajos previos llevados a cabo con bagazo de lulo, zanahoria o plátano (Ahmed *et al.*, 2020, Hinestroza-Córdoba *et al.*, 2020; Bas-Bellver *et al.*, 2023). Sin embargo, el mayor contenido en sólidos solubles se obtuvo para los polvos FSAC60, lo que podría atribuirse a las interferencias debidas a la presencia de una mayor cantidad de compuestos solubles derivados de las reacciones de Maillard (Han *et al.*, 2022). Esto, a su vez, explicaría que el contenido en sólidos solubles de los polvos obtenidos mediante SAC a cualquiera de las temperaturas de trabajo ensayadas sea notablemente superior al del residuo de tallo de brócoli, fermentado o no, sin deshidratar.

#### 4.2.2 Propiedades antioxidantes

En primer lugar, en la Figura 4 se muestra el efecto de la fermentación sobre las propiedades antioxidantes de los 10 lotes de brócoli empleados en este estudio.



**Figura 4.** Efecto de la fermentación sobre el contenido en fenoles (mg EAG/g<sub>ms</sub>) y flavonoides (mg EQ/g<sub>ms</sub>) totales y la actividad antioxidante por los métodos DPPH y ABTS (mg ET/g<sub>ms</sub>). Relación entre la propiedad antioxidante en el residuo de brócoli fermentado frente al residuo sin fermentar. Cada punto representa un lote/fermentación (10 en total), de modo que la desviación corresponde a tres replicados por cada lote. Las barras representan el valor promedio de todos los lotes. <sup>a,b,c...</sup>Diferentes superíndices en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas con un nivel de confianza del 95% (p-valor <0,05).

En general, aunque no en todos los casos ni con la misma intensidad, todas las propiedades antioxidantes se vieron mejoradas tras la fermentación con *L. plantarum*. Esta mejora resultó especialmente acusada para el contenido en flavonoides totales y la actividad antioxidante analizada por el método DPPH, que tomaron valores del orden de  $0,38 \pm 0,12$  mg EQ/g<sub>ms</sub> y  $3,5 \pm 1,6$  mg ET/g<sub>ms</sub> en las muestras sin fermentar (PAST) y del orden de  $0,6 \pm 0,2$  mg EQ/g<sub>ms</sub> y  $4,4 \pm 1,8$  mg ET/g<sub>ms</sub> en las muestras fermentadas (PAST+FERM), respectivamente.

El tratamiento de pasteurización del residuo, además de ser un tratamiento térmico de inactivación de microorganismos y enzimas (Aamir *et al.*, 2013) puede liberar algunos compuestos fenólicos que se encontraban inicialmente unidos a la matriz vegetal (Turkmen *et al.*, 2005). Aunque el tratamiento resulta efectivo y rentable por su bajo coste y alta eficacia, el contenido en nutrientes y otros compuestos bioactivos también puede verse comprometido dependiendo del producto (Cano-Lamadrid y Artés-Hernández, 2022). Concretamente, en el género *Brassica*, el sistema glucosinolato-mirosinasa es alterado por la posible inactivación total o parcial de este enzima, lo que deriva en una deficiente liberación de sus compuestos de

hidrólisis (Rungapamestry *et al.*, 2007). En comparación con estudios anteriores desarrollados en el mismo laboratorio, las propiedades antioxidantes del brócoli fresco no pasteurizado resultaron ligeramente superiores a las obtenidas para el residuo pasteurizado que se analiza en el presente estudio. Por ejemplo, para la capacidad antioxidante por DPPH se obtuvo una concentración de  $3,7 \pm 0,3$  mg ET/g<sub>ms</sub> (Bas-Bellver *et al.*, 2022), superior al promedio de PAST ( $3,5 \pm 1,6$  mg ET/g<sub>ms</sub>), pero inferior al promedio de PAST+FERM ( $4,4 \pm 1,8$  mg ET/g<sub>ms</sub>) obtenido en este caso.

Con respecto a la ligera mejora en las propiedades antioxidantes del tallo de brócoli tras la fermentación con *L. plantarum*, mencionar que esta tendencia coincide con la observada en estudios previos (Jaiswal y Abu-Ghannam, 2013; Kusznierevicz *et al.*, 2008) y que podría deberse a que durante la fermentación se generan enzimas microbianos ( $\beta$ -glucosidasas) que son capaces de degradar las paredes vegetales e inducir la liberación de compuestos antioxidantes de la estructura a la que están unidos; así como enzimas ácidos fenólicos-reductasas que son capaces de hidrolizar compuestos fenólicos de alto peso molecular en metabolitos con mayor actividad antioxidante (Hur *et al.*, 2014; Parada *et al.*, 2023).

Por tanto, se podría afirmar que la fermentación tiene un efecto positivo sobre las propiedades antioxidantes del brócoli, aunque la pasteurización también podría estar interfiriendo en los resultados.

A continuación (Tabla 3), se muestran las propiedades antioxidantes de los polvos obtenidos a partir de tallos de brócoli, fermentados y sin fermentar, deshidratados por las diferentes técnicas, así como la variación calculada con respecto al valor correspondiente al residuo pasteurizado perteneciente al mismo lote (valores entre paréntesis). Como se puede comprobar, no siempre las muestras que presentaron valores más elevados en una determinada propiedad antioxidante fueron las que experimentaron un mayor incremento como consecuencia del procesado. Por ejemplo, los polvos LIO y FLIO presentaron los valores más elevados para la capacidad de secuestrar el radical DPPH; sin embargo, el polvo FSAC70 experimentó el mayor incremento en esta capacidad antioxidante tras el procesado. Esto confirma, por un lado, la heterogeneidad que existe entre los diferentes lotes empleados como materia prima; y, por otro lado, refuerza la idea de que la composición de los polvos de tallo de brócoli no depende únicamente de las condiciones de procesado, sino también de la materia prima de partida.

En general, todas las propiedades antioxidantes analizadas aumentaron en los polvos con respecto al residuo pasteurizado (valores entre paréntesis > 0). Solo en el caso del polvo SAC50 se registró un contenido en fenoles totales y una habilidad para secuestrar el radical DPPH menores a los iniciales, lo que podría ser debido al mayor tiempo de exposición a la corriente de aire requerido en este caso para alcanzar la  $a_w$  objetivo. Este también sería el motivo por el cual el contenido en fenoles totales del polvo SAC70\_50 también resultó inferior al del residuo pasteurizado. Por el contrario, al aumentar la temperatura del aire de secado y acortar la duración de este, el valor de la variación de propiedad calculado con respecto al residuo pasteurizado se incrementó. En estos casos, la exposición a temperaturas más elevadas pudo desencadenar la conversión de algunos compuestos antioxidantes a formas más reactivas, al igual que la formación de nuevos compuestos con propiedades antioxidantes tales como los productos de reacciones de Maillard, así como otras reacciones bioquímicas que se ven

favorecidas por temperaturas de exposición elevadas (Santos y Silva, 2008). Por otro lado, temperaturas elevadas también pueden inactivar enzimas prooxidantes.

**Tabla 3.** Efecto del secado sobre el contenido en fenoles (mg EAG /g<sub>ms</sub>) y flavonoides (mg EQ / g<sub>ms</sub>) totales y sobre la actividad antioxidante medida por los métodos DPPH y ABTS (mg ET/ g<sub>ms</sub>) de los polvos de tallo de brócoli obtenidos, así como la variación con respecto al residuo inicial pasteurizado (valores entre paréntesis). Los valores absolutos son la media  $\pm$  desviación estándar de dos lotes (3 replicados/lote). Para los incrementos se ha tenido en cuenta el valor inicial (pasteurizado) correspondiente a cada lote.

TRATAMIENTO	FENOLES TOTALES (mg EAG /g <sub>ms</sub> )	FLAVONOIDES TOTALES (mg EQ /g <sub>ms</sub> )	AO DPPH (mg ET/g <sub>ms</sub> )	AO ABTS (mg ET/ g <sub>ms</sub> )
<b>SAC50</b>	1,9 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup> (-0,3 $\pm$ 0,2) <sup>A</sup>	1,724 $\pm$ 0,010 <sup>abc</sup> (3,7 $\pm$ 1,2) <sup>AB</sup>	1,02 $\pm$ 0,08 <sup>a</sup> (-0,5 $\pm$ 0,4) <sup>A</sup>	13 $\pm$ 4 <sup>b</sup> (2,0 $\pm$ 1,1) <sup>ABC</sup>
<b>FSAC50</b>	6 $\pm$ 4 <sup>abc</sup> (1 $\pm$ 2) <sup>AB</sup>	2,37 $\pm$ 1,12 <sup>bcd</sup> (6 $\pm$ 5) <sup>AB</sup>	2,8 $\pm$ 0,3 <sup>a</sup> (0,4 $\pm$ 0,9) <sup>AB</sup>	19 $\pm$ 3 <sup>cd</sup> (3,5 $\pm$ 0,9) <sup>ABC</sup>
<b>SAC60</b>	5 $\pm$ 4 <sup>abc</sup> (3 $\pm$ 2) <sup>AB</sup>	3 $\pm$ 3 <sup>cd</sup> (7 $\pm$ 6) <sup>AB</sup>	5,9 $\pm$ 0,6 <sup>b</sup> (0,5 $\pm$ 0,6) <sup>AB</sup>	20 $\pm$ 6 <sup>d</sup> (3,7 $\pm$ 1,1) <sup>ABC</sup>
<b>FSAC60</b>	9 $\pm$ 8 <sup>c</sup> (6 $\pm$ 2) <sup>AB</sup>	4 $\pm$ 4 <sup>d</sup> (9 $\pm$ 7) <sup>AB</sup>	8 $\pm$ 4 <sup>cde</sup> (1 $\pm$ 2) <sup>AB</sup>	22 $\pm$ 6 <sup>d</sup> (4,1 $\pm$ 1,1) <sup>ABC</sup>
<b>SAC70</b>	4 $\pm$ 3 <sup>ab</sup> (5 $\pm$ 5) <sup>AB</sup>	2,3 $\pm$ 0,5 <sup>bcd</sup> (8 $\pm$ 6) <sup>AB</sup>	7 $\pm$ 3 <sup>bcd</sup> (5 $\pm$ 6) <sup>AB</sup>	19 $\pm$ 8 <sup>cd</sup> (4 $\pm$ 3) <sup>ABC</sup>
<b>FSAC70</b>	6,5 $\pm$ 1,2 <sup>bc</sup> (12 $\pm$ 14) <sup>B</sup>	2,9 $\pm$ 0,2 <sup>cd</sup> (10 $\pm$ 5) <sup>B</sup>	9,99 $\pm$ 1,05 <sup>e</sup> (6 $\pm$ 6) <sup>B</sup>	22 $\pm$ 6 <sup>d</sup> (5 $\pm$ 3) <sup>C</sup>
<b>SAC70_50</b>	5 $\pm$ 8 <sup>abc</sup> (-0,5 $\pm$ 1,7) <sup>A</sup>	0,84 $\pm$ 0,08 <sup>a</sup> (0,94 $\pm$ 0,11) <sup>AB</sup>	7 $\pm$ 3 <sup>bc</sup> (1,39 $\pm$ 0,02) <sup>AB</sup>	17,0 $\pm$ 1,7 <sup>bc</sup> (4 $\pm$ 3) <sup>BC</sup>
<b>FSAC70_50</b>	4,4 $\pm$ 1,4 <sup>ab</sup> (2 $\pm$ 3) <sup>AB</sup>	1,3 $\pm$ 0,9 <sup>ab</sup> (2 $\pm$ 3) <sup>A</sup>	8,8 $\pm$ 1,4 <sup>de</sup> (2,3 $\pm$ 0,8) <sup>AB</sup>	20,7 $\pm$ 0,9 <sup>cd</sup> (5 $\pm$ 3) <sup>C</sup>
<b>LIO</b>	9 $\pm$ 4 <sup>c</sup> (1,9 $\pm$ 1,5) <sup>AB</sup>	1,6 $\pm$ 0,5 <sup>abc</sup> (3,5 $\pm$ 1,5) <sup>AB</sup>	14,21 $\pm$ 0,14 <sup>f</sup> (1,60 $\pm$ 0,06) <sup>AB</sup>	5,5 $\pm$ 0,3 <sup>a</sup> (0,03 $\pm$ 0,05) <sup>A</sup>
<b>FLIO</b>	5,9 $\pm$ 0,8 <sup>bc</sup> (1,0 $\pm$ 0,4) <sup>AB</sup>	2,3 $\pm$ 0,6 <sup>bcd</sup> (5 $\pm$ 2) <sup>AB</sup>	12,4 $\pm$ 1,8 <sup>f</sup> (1,3 $\pm$ 0,4) <sup>AB</sup>	7,99 $\pm$ 1,02 <sup>a</sup> (0,5 $\pm$ 0,2) <sup>AB</sup>

Diferentes superíndices en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas con un nivel de confianza del 95% (p-valor < 0,05) entre los valores absolutos (<sup>a,b,c</sup>) o entre los incrementos calculados con respecto al residuo pasteurizado (<sup>A,B,C</sup>).

Las reacciones de Maillard son reacciones no enzimáticas que tienen lugar durante el proceso de secado, y otros que tienen lugar a temperaturas elevadas. En concreto, se trata de una glicosilación entre los azúcares libres reductores y los aminoácidos libres procedentes de las proteínas desnaturalizadas, dando lugar a productos que confieren de nuevas propiedades antioxidantes al residuo (Yan *et al.*, 2023). De forma similar, durante el secado de manzana con aire a 40, 60 y 80 °C se observó que la capacidad antioxidante medida por el método del radical

DPPH se vio notablemente incrementada tras el secado a cualquiera de las tres temperaturas, mientras que el contenido en fenoles totales resultó especialmente elevado tras el secado a 80 °C (Vega-Gálvez *et al.*, 2012). En otro estudio llevado a cabo en bagazo de arándano, el contenido en fenoles totales y la capacidad antioxidante medida por el método del radical ABTS del producto deshidratado también alcanzaron valores notablemente elevados tras el secado a 70 °C que tras el secado a 60 °C (Calabuig-Jiménez *et al.*, 2022). En cuanto al menor incremento en las propiedades antioxidantes experimentado por los polvos obtenidos mediante liofilización, se podría argumentar que las menores temperaturas experimentadas durante este proceso estarían favoreciendo la conservación de los compuestos bioactivos naturalmente presentes en el brócoli, pero no estarían promoviendo las reacciones que tienen lugar durante el SAC. Por otro lado, como consecuencia de la estructura porosa característica de los productos liofilizados, los compuestos antioxidantes pueden llegar a estar más expuestos al oxígeno una vez obtenidos, por lo que pueden degradarse más fácilmente (Tylewicz *et al.*, 2020).

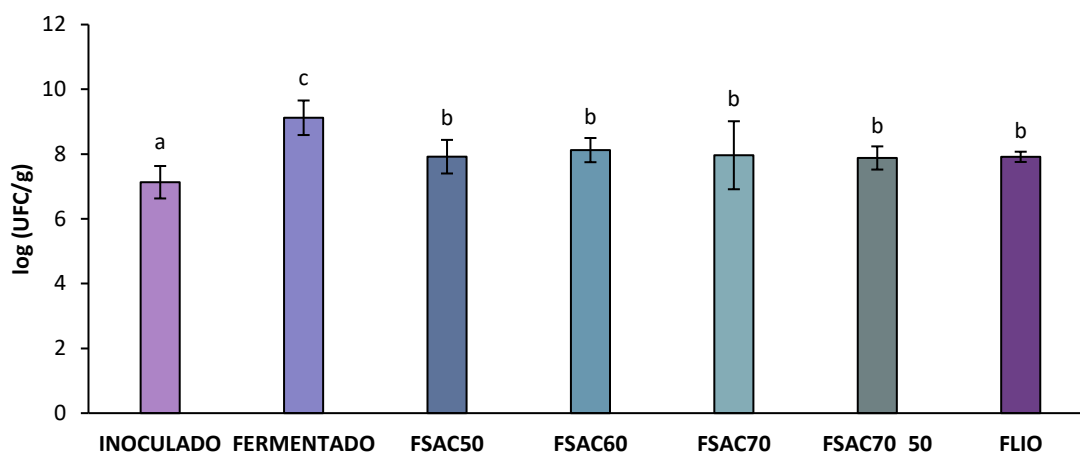
Finalmente, se podría afirmar que la fermentación con *L. plantarum* previa a la deshidratación en unas determinadas condiciones resulta en polvos con mejores propiedades antioxidantes, lo que queda reflejado no solo en el valor que toma la propiedad antioxidante en cuestión, sino también en la variación experimentada con respecto al valor que toma la propiedad en el residuo pasteurizado. Para explicar esto hay que tener en cuenta que las colonias del género *Lactobacillus*, cuando están expuestas a especies reactivas, son capaces de generar mecanismos propios de protección frente al estrés oxidativo, incluyendo la formación de antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos (Hur *et al.*, 2014). El hecho de que la viabilidad del microorganismo pueda verse afectada como consecuencia de la exposición a una corriente de aire a elevada temperatura durante un tiempo prolongado (Anjum *et al.*, 2022) explicaría que el incremento en el contenido en fenoles totales experimentado como consecuencia del procesado por los polvos FSAC60 y FSAC70 no presente diferencias estadísticamente significativas, pese a las diferentes temperaturas de secado.

#### 4.2.3 Crecimiento microbiano

Al fermentar el tallo de brócoli con un microorganismo potencialmente probiótico se persigue alcanzar la máxima concentración microbiana en el producto fermentado y en el polvo obtenido tras su deshidratación. Si bien la eficacia de la fermentación de un sustrato vegetal depende de múltiples factores tales como el nivel de oxígeno, la propia naturaleza del sustrato vegetal o la presencia de microorganismos patógenos competidores, la supervivencia del microorganismo durante el procesado y posterior almacenamiento depende fundamentalmente de las condiciones en las que se desarrollen estos procesos (Borges *et al.*, 2016). Con una selección adecuada de las variables de proceso sería posible alcanzar la concentración mínima recomendada de  $10^6$ – $10^8$  UFC/g para poder atribuir al polvo el calificativo de probiótico. (Champagne *et al.*, 2011).

A continuación, en la Figura 5 se muestran los resultados de los recuentos microbianos realizados a partir del tallo de brócoli recién inoculado, el tallo de brócoli pasteurizado y fermentado y los diferentes polvos obtenidos a partir de éste.





**Figura 5.** Recuento de viables en el tallo de brócoli recién inoculado, tras 24 h de fermentación con *L. plantarum* y en los polvos obtenidos a partir de éste. Las barras de error representan la desviación estándar de dos repeticiones (2 replicados/repetición). <sup>a,b,c</sup>...Diferentes superíndices en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas con un nivel de confianza del 95% (p-valor < 0,05).

El incremento observado en la población microbiana como consecuencia de la fermentación confirma que el tallo de brócoli pasteurizado es un sustrato adecuado para el óptimo crecimiento de *L. plantarum*, lo que ya quedó constatado en estudios previos con otros vegetales del género *Brassica* (Kusznierewicz, *et al.*, 2008). Entre las características por las que este microorganismo resulta el más empleado en los procesos de fermentación de vegetales destacan su capacidad para resistir el alto contenido salino y ácido habitual en encurtidos a base de pepino, batata o yuca (Behera *et al.*, 2018).

Como se puede observar, el recuento de viables experimentó un notable descenso tras la deshidratación por cualquiera de las técnicas ensayadas. El análisis estadístico de los resultados reveló que no existen diferencias estadísticamente significativas (p-valor > 0,05) para el contenido en *L. plantarum* entre los diferentes polvos, aunque el polvo FSAC60 presentó valores ligeramente más elevados. Aunque el recuento de viables en todos los polvos presentó valores por encima de  $10^7$  UFC/g, habría que comprobar que estos niveles se mantienen a lo largo del almacenamiento previo a su consumo, ya que posibles variaciones en los niveles de oxígeno, el pH o la temperatura utilizada durante el proceso, así como en la humedad relativa del medio, podrían tener repercusiones nefastas sobre la viabilidad del microorganismo probiótico (Anjum *et al.*, 2022). Borges *et al.* (2016) también obtuvieron recuentos de *L. plantarum* en torno a 6-7  $\log_{10}$  UFC/g tras el secado por aire caliente de fresa y plátano. En frutas como la granada (Vikram-Simha *et al.*, 2012) o la naranja, la liofilización también resultó una técnica de deshidratación más adecuada que el secado por aire caliente para garantizar la viabilidad de *L. plantarum* (Barbosa *et al.*, 2015). Si bien, es cierto que, al igual que en el secado por aire caliente, algunos factores pueden afectar negativamente a la viabilidad del probiótico durante la liofilización, entre los que se encuentran la formación de hielo intracelular y la alta osmolaridad debido a la eliminación del agua y el aumento resultante en la concentración de solutos, que termina dañando la integridad y fluidez de la membrana microbiana (Wang *et al.*, 2020a).

Con el fin de preservar la viabilidad del microorganismo, y apoyado también por los resultados del apartado anterior, se seleccionó el tratamiento de secado por aire caliente a 60 °C para comprobar su respuesta a la digestión simulada *in vitro*. En este sentido, se intentan reducir los

daños en la membrana lipídica y la inactivación de enzimas probióticas provocadas por la exposición a mayores temperaturas (Anjum *et al.*, 2022). Como control, se decide digerir también el polvo que se obtiene mediante liofilización ya que, pese al elevado coste de esta técnica, suele escogerse como tratamiento de referencia en cuanto a la conservación de compuestos bioactivos termosensibles y microorganismos. Existen numerosos estudios que confirman una mejor conservación durante un periodo de tiempo más prolongado de los polvos obtenidos mediante liofilización con respecto a los obtenidos mediante otras técnicas de deshidratación (Karam *et al.*, 2016). Así pues, los polvos LIO y FLIO también se seleccionaron para evaluación su respuesta a la digestión simulada *in vitro*.

#### 4.4 RESPUESTA DE LOS POLVOS A LA DIGESTIÓN SIMULADA *IN VITRO*

Los polvos seleccionados para evaluar su respuesta a la simulación de la digestión gastrointestinal *in vitro* fueron los obtenidos a partir de tallo de brócoli fermentado y sin fermentar, y posteriormente liofilizado o secado con aire a 60 °C.

##### 4.4.1 Propiedades antioxidantes de los polvos de residuo de brócoli tras la digestión simulada *in vitro*

La efectividad y los beneficios de los compuestos fitoquímicos presentes en el polvo de brócoli dependen en gran medida de cómo se comporten durante el proceso de digestión, en el que las condiciones de proceso determinan la bioaccesibilidad y la biodisponibilidad final de los compuestos de interés. En primer lugar, la fase oral (FO) simula los movimientos mecánicos, como la masticación, que permiten la penetración de compuestos endógenos, como enzimas y sales hacia el alimento. En la fase gástrica (FG), la acidificación del medio, la agitación, el tiempo de incubación y la concentración de enzimas como la pepsina son determinantes. La fase intestinal (FI) queda definida por el pH alcalino, el tiempo de incubación, la presencia de enzimas como la pancreatina y la simulación de los movimientos peristálticos (Dantas *et al.*, 2023). Todos estos aspectos son importantes para evaluar las propiedades antioxidantes al final de cada una de las fases. Los resultados de las propiedades antioxidantes de los polvos SAC60, FSAC60, LIO y FLIO después de las fases gástrica e intestinal simuladas *in vitro* se presentan en la Tabla 4. Según puede observarse, no se distingue entre fase líquida o sobrenadante y precipitado, ya que no siempre pudo separarse fracción sobrenadante de la muestra digerida. Por lo tanto, se decidió presentar los resultados en el total digerido.

De forma general, el contenido en fenoles y flavonoides totales tras la digestión simulada *in vitro* del polvo FLIO obtenido al final de las FG y FI fueron significativamente más elevados a los del resto (p-valor < 0,05). Además, el contenido en compuestos fenólicos aumentó en todos los casos al pasar de la FG a la FI, pese a que las estructuras fenólicas parecen ser resistentes a la hidrólisis en medio ácido, como el SGF, y vulnerables en medio alcalino, como el SIF. Esto último ha quedado descrito en otros estudios en frutas como el melón (Gómez-García *et al.*, 2022), en el que el contenido en fenoles y flavonoides totales de las muestras se redujo tras el contacto con la FI.

**Tabla 4.** Respuesta a la digestión simulada *in vitro* de las fases gástrica (FG) e intestinal (FI) sobre el contenido en fenoles (mg EAG/ g<sub>ms</sub>) y flavonoides (mg EQ/ g<sub>ms</sub>) totales y la actividad antioxidante por los métodos DPPH y ABTS (mg ET/ g<sub>ms</sub>) de los polvos obtenidos mediante secado por aire caliente a 60 °C y liofilización, fermentados y sin fermentar. Media ± desviación estándar de tres repeticiones.

	TRATAMIENTO	FG	FI
<b>FENOLES TOTALES</b> (mg EAG/g <sub>muestra digerida</sub> )	SAC60	0,33 ± 0,17 <sup>a</sup>	3,8 ± 0,7 <sup>a</sup>
	FSAC60	3,97 ± 0,11 <sup>b</sup>	5,2 ± 0,8 <sup>b</sup>
	LIO	4,0 ± 0,6 <sup>b</sup>	4,9 ± 0,6 <sup>b</sup>
	FLIO	4,9 ± 0,4 <sup>c</sup>	8,2 ± 0,4 <sup>c</sup>
<b>FLAVONOIDES TOTALES</b> (mg EQ/g <sub>muestra digerida</sub> )	SAC60	1,50 ± 0,06 <sup>b</sup>	1,17 ± 0,06 <sup>ab</sup>
	FSAC60	1,56 ± 0,07 <sup>b</sup>	1,3 ± 0,2 <sup>b</sup>
	LIO	1,10 ± 0,24 <sup>a</sup>	0,7 ± 0,2 <sup>a</sup>
	FLIO	1,6 ± 0,3 <sup>b</sup>	1,9 ± 0,7 <sup>c</sup>
<b>AO DPPH</b> (mg ET/g <sub>muestra digerida</sub> )	SAC60	4,2 ± 1,2 <sup>a</sup>	5,6 ± 0,6 <sup>a</sup>
	FSAC60	4,8 ± 0,5 <sup>ab</sup>	8 ± 3 <sup>b</sup>
	LIO	7 ± 2 <sup>b</sup>	5,7 ± 0,4 <sup>a</sup>
	FLIO	7 ± 2 <sup>b</sup>	4,52 ± 0,12 <sup>a</sup>
<b>AO ABTS</b> (mg ET/g <sub>muestra digerida</sub> )	SAC60	11,8 ± 1,7 <sup>b</sup>	12,5 ± 0,8 <sup>ab</sup>
	FSAC60	11,0 ± 1,8 <sup>b</sup>	11 ± 2 <sup>ab</sup>
	LIO	8 ± 2 <sup>a</sup>	14,0 ± 1,2 <sup>bc</sup>
	FLIO	11,3 ± 1,6 <sup>b</sup>	15 ± 2 <sup>c</sup>

<sup>a,b,c...</sup>Diferentes superíndices en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas con un nivel de confianza del 95% (p-valor <0,05).

Sin embargo, en estudios previos en zanahoria, el comportamiento fue similar al obtenido en el presente trabajo (Bas-Bellver, *et al.*, 2023). La liberación progresiva de compuestos fenólicos a lo largo de la digestión *in vitro* se debería posiblemente a que las condiciones presentes en el intestino delgado, como el pH y la pancreatina, favorecen la solubilización de ciertos compuestos fenólicos previamente unidos a macromoléculas o presentes en forma reducida. Además, las interacciones entre los compuestos fenólicos y otros componentes de la dieta, como azúcares liberados durante la digestión, pueden desempeñar un papel protector en sus cambios durante el proceso digestivo, afectando a su solubilidad y potencial biodisponibilidad (Martínez-Las Heras *et al.*, 2017). En otro estudio realizado en diferentes variedades de lichi, se obtuvieron resultados distintos en cuanto al contenido total de fenoles y flavonoides después de las etapas de la digestión, lo que demuestra la amplia variación existente entre cada variedad de lichi (Su *et al.*, 2019). Por lo tanto, las diferencias en la estructura de los compuestos fenólicos también pueden condicionar su comportamiento durante cada una de las etapas de la digestión. En este sentido, se entiende que el contenido total de flavonoides, que son un tipo de polifenoles, pueda disminuir entre la FG y la FI.

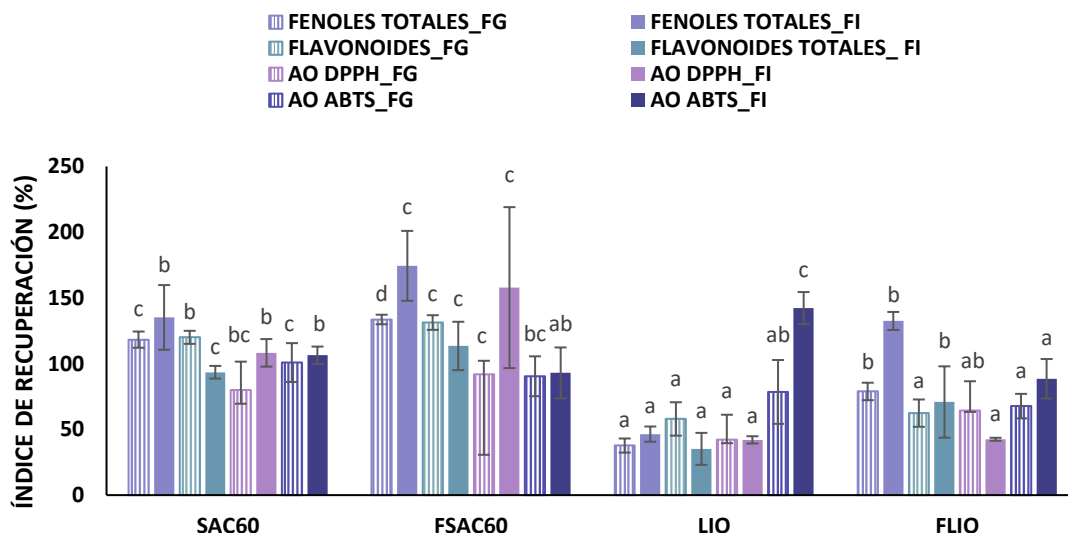
La variación del pH en el entorno digestivo y la interacción con las enzimas digestivas favorecen la liberación de compuestos que están unidos a la matriz alimentaria mediante

hidrólisis, así como la formación de nuevos compuestos fenólicos. Estos cambios conllevan modificaciones en las actividades antirradicales, que aumentan a lo largo de la digestión, lo que significa que los compuestos se vuelven más disponibles a medida que progresa el proceso digestivo (Ortega *et al.*, 2011; Alminger *et al.*, 2014; Wojtunik-Kulesza *et al.*, 2020). Este comportamiento está justificado por otros estudios en frutas, en los que la liberación de compuestos fenólicos en unidades más simples se dio como consecuencia del cambio de pH de ácido a alcalino (Dantas *et al.*, 2023), así como en un estudio sobre restos de rábano negro, donde se sugiere que la interacción del enzima pancreatina facilitó la liberación de fenoles totales (Yüçetepe *et al.*, 2021).

La capacidad antioxidante está fuertemente relacionada con la presencia de compuestos fenólicos, ya que pueden hidrolizarse en compuestos antioxidantes más simples siendo capaces de reaccionar con los radicales libres de DPPH y ABTS (Wojtunik-Kulesza *et al.*, 2020). El paso de la muestra a través de FG y FI muestra un aumento en el contenido antioxidante por DPPH en los polvos SAC60 y FSAC60, que no ocurre en LIO ni FLIO. Puede ser que la estructura porosa y frágil que se obtiene por liofilización dé lugar a una mayor exposición de los compuestos antioxidantes a los fluidos simulados de la digestión (Tylewicz *et al.*, 2020), y con ello una mayor degradación. De forma contraria, la capacidad antioxidante por ABTS experimentó una mejora en las muestras liofilizadas frente a las secadas por aire caliente desde la FG hasta la FI. Esto puede deberse a la variación de pH, que promueve la deprotonación de los anillos aromáticos de compuestos fenólicos variando la composición antioxidante de la muestra, lo cual ha quedado descrito en diferentes variedades de manzana (Bouayed *et al.*, 2011). La estructura química de los compuestos fenólicos juega un papel importante en la eliminación de radicales libres, según se refleja en un estudio sobre semillas en polvo secado por aire caliente a 60 °C de 11 frutas que evidenciaron que la posición y el número de grupos hidroxilo en los anillos aromáticos de polifenoles determina la capacidad antioxidante de los compuestos liberados (Chen *et al.*, 2016).

Con respecto a la variable fermentación, tras la FG se observan diferencias significativas ( $p$ -valor < 0,05) entre las diferentes muestras analizadas, siendo el polvo FLIO el que presentó valores más elevados para cada una de las propiedades antioxidantes analizadas. También se constata un comportamiento similar después de la FI, observándose una mayor liberación de compuestos en las muestras liofilizadas y fermentadas, excepto para la capacidad AO con DPPH.

No obstante, además de los valores absolutos después de cada una de las etapas, resulta necesario comparar estos resultados tras la digestión con los valores iniciales en el polvo, con el fin de comprobar el impacto de las condiciones de la digestión sobre la liberación de compuestos tras cada una de las etapas. A tal fin, los resultados del índice de recuperación (IR) para cada una de las propiedades antioxidantes, tras las fases gástrica e intestinal se muestran en la Figura 6.



**Figura 6.** Índice de recuperación (%) del contenido en fenoles y flavonoides totales y de la capacidad antioxidante por los métodos DPPH y ABTS tras la digestión simulada *in vitro* en las fases gástrica (FG) e intestinal (FI). Media  $\pm$  desviación estándar de tres repeticiones. Las barras de error representan la desviación estándar de dos repeticiones (3 replicados/repetición). <sup>a,b,c...</sup>Diferentes superíndices en la misma serie indican diferencias estadísticamente significativas con un nivel de confianza del 95% (p-valor < 0,05).

El IR en las muestras liofilizadas (LIO y FLIO) resultó por lo general significativamente inferior (p-valor < 0,05) al de los polvos obtenidos mediante secado del residuo con aire a 60 °C (SAC60 y FSAC60), para los que se obtuvieron valores superiores al 100%. Las diferencias entre las muestras SAC y LIO podrían deberse a que determinados compuestos bioactivos que habrían sido preservados por el proceso de liofilización habrían quedado más expuestos a los posibles efectos adversos de la digestión, consecuencia de las variaciones de pH, concentraciones de los fluidos gástricos y enzimas. Del mismo modo, la estructura porosa y el menor tamaño de partícula que suele resultar de liofilizar el residuo habría dejado más expuestos una parte de los compuestos responsables de la actividad antioxidante. En Bas-Bellver *et al.* (2020) se observó un resultado similar para carotenoides y antocianinas presentes en polvo de residuo de caqui y arándano.

Asimismo, se observa un aumento generalizado en el IR de todas las propiedades antioxidantes al pasar de la FG a la FI, excepto en el caso de flavonoides totales. Esto último podría deberse a que, en el estómago, el pH bajo permite la hidrólisis de flavonoides en unidades de menor tamaño, que son inestables a niveles altos de pH con los que se encuentra en la FI, resultado que ha sido reportado en diferentes estudios sobre la corteza de granada (Gullon *et al.*, 2015; Mall y Patel, 2023).

Respecto a la acción de *L. plantarum*, se observa que, para una misma técnica de deshidratación, la recuperación de compuestos antioxidantes tras la digestión es mayor en las muestras fermentadas que en las no fermentadas. Este resultado estaría sugiriendo que la presencia de microorganismos puede ayudar a la liberación de compuestos fenólicos, así como a la formación de nuevos compuestos antioxidantes. Dong *et al.* 2023 han comprobado este comportamiento en pulpa de bayas con respecto a la fermentación con bacterias ácido-lácticas, ya que refirieron un aumento significativo (p-valor < 0,05) en las propiedades antioxidantes de las muestras fermentadas frente a las no fermentadas, tras la digestión simulada *in vitro*. Esto

sería indicativo de que la presencia de *L. plantarum* puede aumentar la liberación de compuestos bioactivos, debido a la acción paralela de enzimas como las glucosidasas (Wojtunik-Kulesza *et al.*, 2020).

En general, el IR resultó mayor en los polvos FSAC60, aunque los resultados de la Tabla 4 muestran que los polvos obtenidos por FLIO son los que presentan mejores propiedades antioxidantes después de la FI. Por tanto, la técnica de deshidratación empleada condiciona en gran medida la respuesta a la digestión *in vitro*. Así como los polvos LIO digeridos presentan en general mejores propiedades antioxidantes, lo que permitiría una mayor absorción potencial de estos compuestos (mayor bioaccesibilidad); en los polvos SAC, el efecto de la digestión es más relevante, de modo que las enzimas y las condiciones gástricas e intestinales serían capaces de liberar una mayor cantidad de compuestos con propiedades antioxidantes, y que con anterioridad a la digestión estarían unidos a la matriz vegetal. Este comportamiento ha quedado contrastado en estudios previos en los que los productos LIO mostraron valores de IR inferiores a los obtenidos por SAC para algunas de las determinaciones antioxidantes, a pesar de presentar mayor contenido tras la digestión (Bas-Bellver *et al.*, 2023).

#### 4.4.2 Recuentos microbianos

Se sabe que *L. plantarum* muestra buena habilidad de adhesión y adaptación a las condiciones del tracto gastrointestinal por lo que, si sobrevive, podrá ejercer su función como probiótico en el huésped (Behera *et al.*, 2018). En los polvos FSAC60, los recuentos microbianos tras las fases gástrica e intestinal resultaron inferiores a  $4 \log_{10}$  UFC/g, confirmando el deterioro del microorganismo en el transcurso de la muestra por la exposición a variaciones del pH, presencia de enzimas digestivas y concentraciones de sales que pueden causar la inactivación de este. No obstante, en el caso de las muestras FLIO, se obtuvieron valores algo superiores,  $4,5 \pm 0,4 \log_{10}$  UFC/g en la FG y  $4,4 \pm 0,2 \log_{10}$  UFC/g en la FI. Hay que destacar que, a partir de ambos procesos de deshidratación, se obtienen resultados inferiores a los obtenidos antes del proceso de digestión recogidos en la Figura 5, algo que se puede entender como consecuencia de la adición de las mezclas SSIF, SGF y SIF, que aumentan el volumen final de la muestra pudiendo diluir la concentración final del microorganismo.

Pese a que la viabilidad de *L. plantarum* se vio afectada tanto en polvos SAC como en polvos LIO, las muestras liofilizadas presentaron una mayor viabilidad microbiana tras la digestión. Podría ser que este método de deshidratación hubiera generado menos estrés en el microorganismo, de modo que habría resistido mejor la simulación de la digestión *in vitro*.

Una forma de aumentar la resistencia microbiana a su paso por el tracto gastrointestinal consiste en su microencapsulación, de forma que los microorganismos no están expuestos directamente a las variaciones fisicoquímicas. Zhang *et al.* (2020) han realizado estudios en esta línea a partir de la microencapsulación de polvos de fruta del paraíso fermentados con probióticos, entre ellos *L. plantarum*. Por tanto, una propuesta de futuro podría pasar por realizar estudios de microencapsulación que mejoren la viabilidad del microorganismo ya que las condiciones fisicoquímicas de la digestión, como el pH ácido de la FG, afectan a la tasa de supervivencia de los probióticos que atraviesan el tracto digestivo (Yan *et al.*, 2019). Otra forma de conferir resistencia a los microorganismos durante la digestión sería someter la suspensión microbiana a una operación de alta presiones de homogenización, efecto que ha podido comprobarse sobre *L. salivarius* (Burca-Busaga *et al.*, 2021).

## 5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS DE FUTURO

La obtención de polvos a partir de residuos hortofrutícolas puede considerarse ya como una estrategia en el desarrollo de sistemas alimentarios más sostenibles.

En el presente trabajo se ha comprobado que las operaciones de fermentación y deshidratación, combinadas con la interrupción previa y la molienda final, permiten la obtención de un producto deshidratado en polvo estable, con capacidad de ser almacenado y utilizado posteriormente. La transformación de los residuos de brócoli en polvos ha resultado en una mejora de sus propiedades fisicoquímicas y antioxidantes, lo que confirma el potencial que tienen estos residuos para ser transformados en ingredientes funcionales, que podrían ser utilizados para la fortificación de alimentos.

En cuanto al impacto de las diferentes técnicas de deshidratación empleadas, la mayor temperatura durante el secado por aire caliente ha favorecido la generación de compuestos con actividad antioxidante, y la preservación de otros debido a una cinética más rápida y menor tiempo de exposición a condiciones de deterioro. En el futuro sería conveniente evaluar la estabilidad de estas propiedades a lo largo del almacenamiento, con el fin de concretar la vida útil de los productos en polvo. En cuanto a la fermentación con *L. plantarum*, se ha comprobado la contribución del microorganismo a la liberación de compuestos antioxidantes de la matriz vegetal, y se han obtenido polvos con un número suficiente de colonias viables.

La simulación de la digestión *in vitro* permite esclarecer el efecto del proceso digestivo sobre las variables fisicoquímicas como el pH, la presencia de enzimas o la concentración de las sales que son determinantes en la liberación o hidrólisis de los compuestos fitoquímicos presentes en los polvos. Los ensayos de digestión *in vitro* han demostrado un mayor impacto de la digestión en los polvos SAC, en cuanto a la liberación progresiva a lo largo de las fases estudiadas; en cambio, los polvos LIO son los que han permitido preservar mejor la viabilidad del microorganismo, en los productos fermentados. Este último resultado confirma la posibilidad de desarrollar polvos probióticos que sobreviven a la digestión, con propiedades fisicoquímicas y microbiológicas interesantes. De cara al futuro, podría proponerse la aplicación de técnicas que permitan una mayor supervivencia del microorganismo, tales como la microencapsulación, o la aplicación de altas presiones de homogenización, para conferir mayor resistencia al microorganismo.

En términos generales, se concluye que el producto en polvo obtenido a partir de tallos de brócoli resulta en un ingrediente que podría ser reincorporado a la cadena alimentaria por sus propiedades fisicoquímicas y antioxidantes, con el fin de aumentar el valor nutricional de alimentos. Estos ingredientes podrían adicionarse a productos de diferentes industrias tales como la panadera, cárnica, o el desarrollo de sopas o bebidas enriquecidas, entre otras. Al tiempo de fortificar los productos, los productos en polvo obtenidos también podrían ejercer cierta actividad antimicrobiana y ser utilizados como saborizantes o colorantes. Todo esto, habría de confirmarse mediante estudios de formulación de alimentos, los cuales podrían plantearse como continuación al presente trabajo.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- Amir, M., Ovissipour, M., Sablani, S. S., & Rasco, B. (2013). Predicting the quality of pasteurized vegetables using kinetic models: A review. *International Journal of Food Science*, 2013, 271271. <https://doi.org/10.1155/2013/271271>
- Abbate, S., Centobelli, P., Cerchione, R., Giardino, G., & Passaro, R. (2023). Coming out the egg: Assessing the benefits of circular economy strategies in agri-food industry. *Journal of Cleaner Production*, 385(135665), 135665. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2022.135665>
- Ahmed, J. (2018). Drying of vegetables: Principles and dryer design. En *Handbook of Vegetables and Vegetable Processing* (pp. 381-405). John Wiley & Sons, Ltd.
- Ahmed, J., Thomas, L., & Khashawi, R. (2020). Influence of hot air drying and freeze-drying on functional, rheological, structural, and dielectric properties of green banana flour and dispersions. *Food Hydrocolloids*, 99(105331), 105331. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105331>
- Alminger, M., Aura, A. M., Bohn, T., Dufour, C., El, S. N., Gomes, A., Karakaya, S., Martínez-Cuesta, M. C., McDougall, G. J., Requena, T., & Santos, C. N. (2014). In Vitro Models for Studying Secondary Plant Metabolite Digestion and Bioaccessibility. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 13(4), 413–436. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12081>
- Andrés, A., Bilbao, C., & Fito, P. (2004). Drying kinetics of apple cylinders under combined hot air–microwave dehydration. *Journal of Food Engineering*, 63(1), 71-78. [https://doi.org/10.1016/s0260-8774\(03\)00284-x](https://doi.org/10.1016/s0260-8774(03)00284-x)
- Anjum, F. M., Saeed, F., Afzaal, M., Ikram, A., & Azam, M. (2022). The effect of thermal processing on probiotics stability. En *Advances in Dairy Microbial Products* (pp. 295-302). Elsevier.
- Barbosa, J., Borges, S., Amorim, M., Pereira, M. J., Oliveira, A., Pintado, M. E., & Teixeira, P. (2015). Comparison of spray drying, freeze drying and convective hot air drying for the production of a probiotic orange powder. *Journal of functional foods*, 17, 340-351. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.06.001>
- Bas-Bellver, C., Andrés, C., Seguí, L., Barrera, C., Jiménez-Hernández, N., Artacho, A., Betoret, N., & Gosalbes, M. J. (2020). Valorization of Persimmon and Blueberry Byproducts to Obtain Functional Powders: In Vitro Digestion and Fermentation by Gut Microbiota. *Journal of agricultural and food chemistry*, 68(30), 8080–8090. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c02088>
- Bas-Bellver, C., Barrera, C., Betoret, N., & Seguí, L. (2022). Impact of disruption and drying conditions on physicochemical, functional and antioxidant properties of powdered ingredients obtained from Brassica vegetable by-products. *Foods (Basel, Switzerland)*, 11(22), 3663. <https://doi.org/10.3390/foods11223663>
- Bas-Bellver, C., Barrera, C., Betoret, N., & Seguí, L. (2023). Effect of Processing and In Vitro Digestion on Bioactive Constituents of Powdered IV Range Carrot (*Daucus carota*, L.) Wastes. *Foods (Basel, Switzerland)*, 12(4), 731. <https://doi.org/10.3390/foods12040731>
- Baudelaire, E. D. (2013). Grinding for food powder production. En *Handbook of Food Powders* (pp. 132-149). Elsevier.
- Behera, S. S., Ray, R. C., & Zdolec, N. (2018). Lactobacillus plantarum with functional properties: An approach to increase safety and shelf-life of fermented foods. *BioMed Research International*, 2018, 9361614. <https://doi.org/10.1155/2018/9361614>



- Bisht, B., Gururani, P., Aman, J., Vlaskin, M. S., Anna I, K., Irina A, A., Joshi, S., Kumar, S., & Kumar, V. (2023). A review on holistic approaches for fruits and vegetables biowastes valorization. *Materials Today: Proceedings*, 73, 54-63. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2022.09.168>
- Bodke, H., & Jogdand, S. (2022). Role of probiotics in human health. *Cureus*, 14(11), e31313. <https://doi.org/10.7759/cureus.31313>
- Borges, S., Barbosa, J., Silva, J., Gomes, A. M., Pintado, M., Silva, C. L. M., Morais, A. M. M. B., & Teixeira, P. (2016). A feasibility study of Lactobacillus plantarum fruit powders after processing and storage. *International Journal of Food Science & Technology*, 51(2), 381-388. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12975>
- Bouayed, J., Hoffmann, L., & Bohn, T. (2011). Total phenolics, flavonoids, anthocyanins and antioxidant activity following simulated gastro-intestinal digestion and dialysis of apple varieties: Bioaccessibility and potential uptake. *Food Chemistry*, 128(1), 14-21. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.02.052>
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft Und Technologie [Food Science and Technology]*, 28(1), 25-30. [https://doi.org/10.1016/s0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/s0023-6438(95)80008-5)
- Burca-Busaga, C. G., Betoret, N., Seguí, L., García-Hernández, J., Hernández, M., & Barrera, C. (2021). Antioxidants bioaccessibility and Lactobacillus salivarius (CECT 4063) survival following the in vitro digestion of vacuum impregnated apple slices: Effect of the drying technique, the addition of trehalose, and high-pressure homogenization. *Foods (Basel, Switzerland)*, 10(9), 2155. <https://doi.org/10.3390/foods10092155>
- Calabuig-Jiménez, L., Hinestroza-Córdoba, L. I., Barrera, C., Seguí, L., & Betoret, N. (2022). Effects of processing and storage conditions on functional properties of powdered blueberry pomace. *Sustainability*, 14(3), 1839. <https://doi.org/10.3390/su14031839>
- Campbell, B. M., Beare, D. J., Bennett, E. M., Hall-Spencer, J. M., Ingram, J. S. I., Jaramillo, F., Ortiz, R., Ramankutty, N., Sayer, J. A., & Shindell, D. (2017). Agriculture production as a major driver of the Earth system exceeding planetary boundaries. *Ecology and Society: A Journal of Integrative Science for Resilience and Sustainability*, 22(4). <https://doi.org/10.5751/es-09595-220408>
- Cano-Lamadrid, M., & Artés-Hernández, F. (2022). Thermal and non-thermal treatments to preserve and encourage bioactive compounds in fruit- and vegetable-based products. *Foods (Basel, Switzerland)*, 11(21), 3400. <https://doi.org/10.3390/foods11213400>
- Champagne, C. P., Ross, R. P., Saarela, M., Hansen, K. F., & Charalampopoulos, D. (2011). Recommendations for the viability assessment of probiotics as concentrated cultures and in food matrices. *International Journal of Food Microbiology*, 149(3), 185-193. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.07.005>
- Chan, E. W. C., Lim, Y. Y., Wong, S. K., Lim, K. K., Tan, S. P., Lianto, F. S., & Yong, M. Y. (2009). Effects of different drying methods on the antioxidant properties of leaves and tea of ginger species. *Food Chemistry*, 113(1), 166-172. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.07.090>
- Chen, G.-L., Chen, S.-G., Chen, F., Xie, Y.-Q., Han, M.-D., Luo, C.-X., Zhao, Y.-Y., & Gao, Y.-Q. (2016). Nutraceutical potential and antioxidant benefits of selected fruit seeds subjected to an in vitro digestion. *Journal of Functional Foods*, 20, 317-331. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.11.003>

- Chirife, J., & Fontana, A. J., Jr. (2020). Introduction: Historical highlights of water activity research. En *Water Activity in Foods* (pp. 1-11). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9781118765982.ch1>
- Chou, S. K., & Chua, K. J. (2001). New hybrid drying technologies for heat sensitive foodstuffs. *Trends in Food Science & Technology*, 12(10), 359-369. [https://doi.org/10.1016/s0924-2244\(01\)00102-9](https://doi.org/10.1016/s0924-2244(01)00102-9)
- Chua, K. J., Mujumdar, A. S., Hawlader, M. N. A., Chou, S. K., & Ho, J. C. (2001). Batch drying of banana pieces — effect of stepwise change in drying air temperature on drying kinetics and product colour. *Food Research International (Ottawa, Ont.)*, 34(8), 721-731. [https://doi.org/10.1016/s0963-9969\(01\)00094-1](https://doi.org/10.1016/s0963-9969(01)00094-1)
- Corrado, S., & Sala, S. (2018). Food waste accounting along global and European food supply chains: State of the art and outlook. *Waste Management (New York, N.Y.)*, 79, 120-131. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2018.07.032>
- Corrado, S., Caldeira, C., Eriksson, M., Hanssen, O. J., Hauser, H. E., van Holsteijn, F., Liu, G., Östergren, K., Parry, A., Secondi, L., Stenmarck, Å., & Sala, S. (2019). Food waste accounting methodologies: Challenges, opportunities, and further advancements. *Global food security*, 20, 93–100. <https://doi.org/10.1016/j.gfs.2019.01.002>
- Dantas, A. M., Fernandes, F. G., Magnani, M., & da Silva Campelo Borges, G. (2023). Gastrointestinal digestion assays for evaluating the bioaccessibility of phenolic compounds in fruits and their derivatives: an overview. *Food Research International (Ottawa, Ont.)*, 170(112920), 112920. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.112920>
- de la Rosa, O., Flores-Gallegos, A. C., Muñiz-Marquez, D., Nobre, C., Contreras-Esquivel, J. C., & Aguilar, C. N. (2019). Fructooligosaccharides production from agro-wastes as alternative low-cost source. *Trends in Food Science & Technology*, 91, 139-146. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.06.013>
- Dong, X., Qi, J., Xu, K., Li, B., Xu, H., Tian, X., & Lei, H. (2023). Effect of lactic acid fermentation and in vitro digestion on the bioactive compounds in Chinese wolfberry (*Lycium barbarum*) pulp. *Food Bioscience*, 53(102558), 102558. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.102558>
- Eminoğlu, M. B., Yegül, U., & Sacilik, K. (2019). Drying characteristics of blackberry fruits in a convective hot-air dryer. *HortScience: a publication of the American Society for Horticultural Science*, 54(9), 1546-1550. <https://doi.org/10.21273/hortsci14201-19>
- Esparza, I., Jiménez-Moreno, N., Bimbela, F., Ancín-Azpilicueta, C., & Gandía, L. M. (2020). Fruit and vegetable waste management: Conventional and emerging approaches. *Journal of Environmental Management*, 265(110510), 110510. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.110510>
- FAO (2014). Food wastage footprint Full-Cost accounting. Final Report. Consultado el 15/05/2023 de 2023 en <https://www.fao.org/publications/card/fr/c/5e7c4154-2b97-4ea5-83a7-be9604925a24/>
- FAO (2021). FAOSTAT. Consultado el 8/05/2023 en <https://www.fao.org/faostat/es/#data/QCL>
- Fito, P., Andrés, A., Barat, J.M., Albors, A. M. (2001). *Introducción al secado de alimentos por aire caliente*. Universidad Politécnica de Valencia.
- García, C., & Remize, F. (2022). Lactic acid fermentation of fruit and vegetable juices and smoothies: Innovation and health aspects. En *Lactic Acid Bacteria in Food Biotechnology* (pp. 27-46). Elsevier.

- García-Tirado, J., Rieger-Reyes, C., & Saz-Peiró, P. (2012). Efecto de los flavonoides en la prevención del cáncer de pulmón: revisión sistemática. *Medicina clínica*, 139(8), 358-363. <https://doi.org/10.1016/j.medcli.2012.02.003>
- Gómez-García, R., Vilas-Boas, A. A., Machado, M., Campos, D. A., Aguilar, C. N., Madureira, A. R., & Pintado, M. (2022). Impact of simulated in vitro gastrointestinal digestion on bioactive compounds, bioactivity and cytotoxicity of melon (*Cucumis melo* L. inodorus) peel juice powder. *Food Bioscience*, 47(101726), 101726. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.101726>
- Gonçalves, D. A., González, A., Roupar, D., Teixeira, J. A., & Nobre, C. (2023). How prebiotics have been produced from agro-industrial waste: An overview of the enzymatic technologies applied and the models used to validate their health claims. *Trends in Food Science & Technology*, 135, 74-92. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2023.03.016>
- Gullon, B., Pintado, M. E., Fernández-López, J., Pérez-Álvarez, J. A., & Viuda-Martos, M. (2015). In vitro gastrointestinal digestion of pomegranate peel (*Punica granatum*) flour obtained from co-products: Changes in the antioxidant potential and bioactive compounds stability. *Journal of Functional Foods*, 19, 617-628. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.09.056>
- Halkier, B. A. (2016). General Introduction to Glucosinolates. En *Advances in Botanical Research* (pp. 1-14). Elsevier.
- Han, Lu, Zhou, S., Zhang, X., Lu, K., Qi, B., & Li, Y. (2022). Effect of carbohydrate type on the structural and functional properties of Maillard-reacted black bean protein. *J Food Sci.*, 87, 165– 177. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15992>
- Harbaum, B., Hubbermann, E. M., Zhu, Z., & Schwarz, K. (2008). Free and bound phenolic compounds in leaves of pak choi (*Brassica campestris* L. ssp. chinensis var. communis) and Chinese leaf mustard (*Brassica juncea* Coss). *Food Chemistry*, 110(4), 838-846. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.02.069>
- Hinestroza-Córdoba, L. I., Duarte Serna, S., Seguí, L., Barrera, C., & Betoret, N. (2020). Characterization of Powdered Lulo (*Solanum quitoense*) Bagasse as a Functional Food Ingredient. *Foods (Basel, Switzerland)*, 9(6), 723. <https://doi.org/10.3390/foods9060723>
- Huang, X., Cheng, B., Wang, Y., Liu, G., Hu, L., Yu, X., & He, H. (2022). Effects of fresh-cut and storage on glucosinolates profile using broccoli as a case study. *Horticultural Plant Journal*. <https://doi.org/10.1016/j.hpj.2022.07.007>
- Hur, S. J., Lee, S. Y., Kim, Y.-C., Choi, I., & Kim, G.-B. (2014). Effect of fermentation on the antioxidant activity in plant-based foods. *Food Chemistry*, 160, 346-356. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.03.112>
- Inyang, U.E., Oboh, I.O. and Etuk, B.R. (2018) Kinetic Models for Drying Techniques—Food Materials. *Advances in Chemical Engineering and Science*, 8, 27-48. <https://doi.org/10.4236/aces.2018.82003>
- 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. <https://doi.org/10.1270/jsbbs.64.48>
- Jaiswal, A. K., & Abu-Ghannam, N. (2013). Kinetic studies for the preparation of probiotic cabbage juice: Impact on phytochemicals and bioactivity. *Industrial Crops and Products*, 50, 212-218. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.07.028>

- Kaiser, A.E., Baniasadi, M., Giansiracusa, D., Giansiracusa, M., Garcia, M., Fryda, Z., Wong, T.L., Bishayee, A. (2021). Sulforaphane: A Broccoli Bioactive Phytocompound with Cancer Preventive Potential. *Cancers*, 13, 4796. <https://doi.org/10.3390/cancers13194796>
- Karam, M. C., Petit, J., Zimmer, D., Baudelaire Djantou, E., & Scher, J. (2016). Effects of drying and grinding in production of fruit and vegetable powders: A review. *Journal of food engineering*, 188, 32-49. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2016.05.001>
- Kusznierewicz, B., Śmiechowska, A., Bartoszek, A., & Namieśnik, J. (2008). The effect of heating and fermenting on antioxidant properties of white cabbage. *Food Chemistry*, 108(3), 853-861. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.11.049>
- Le Feunteun, S., Verkempinck, S., Floury, J., Janssen, A., Kondjoyan, A., Marze, S., Mirade, P.-S., Pluschke, A., Sicard, J., van Aken, G., & Grauwet, T. (2021). Mathematical modelling of food hydrolysis during in vitro digestion: From single nutrient to complex foods in static and dynamic conditions. *Trends in Food Science & Technology*, 116, 870-883. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.08.030>
- Li, H., Xia, Y., Liu, H.-Y., Guo, H., He, X.-Q., Liu, Y., Wu, D.-T., Mai, Y.-H., Li, H.-B., Zou, L., & Gan, R.-Y. (2022). Nutritional values, beneficial effects, and food applications of broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica* Plenck). *Trends in Food Science & Technology*, 119, 288-308. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.12.015>
- Li, Z., Teng, J., Lyu, Y., Hu, X., Zhao, Y., & Wang, M. (2018). Enhanced Antioxidant Activity for Apple Juice Fermented with *Lactobacillus plantarum* ATCC14917. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 24(1), 51. <https://doi.org/10.3390/molecules24010051>
- 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 (Basel, Switzerland)*, 23(4), 900. <https://doi.org/10.3390/molecules23040900>
- Lombardi, G. V., Atzori, R., Acciaioli, A., Giannetti, B., Parrini, S., & Liu, G. (2019). Agricultural landscape modification and land food footprint from 1970 to 2010: A case study of Sardinia, Italy. *Journal of Cleaner Production*, 239(118097), 118097. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.118097>
- Lucas-González, R., Viuda-Martos, M., Pérez-Alvarez, J. A., & Fernández-López, J. (2018). In vitro digestion models suitable for foods: Opportunities for new fields of application and challenges. *Food Research International (Ottawa, Ont.)*, 107, 423-436. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.02.055>
- Luximon-Ramma, A., Neergehen, V. S., Bahorun, T., Crozier, A., Zbarsky, V., Datla, K. P., Dexter, D. T., & Aruoma, O. I. (2006). Assessment of the polyphenolic composition of the organic extracts of Mauritian black teas: a potential contributor to their antioxidant functions. *BioFactors (Oxford, England)*, 27(1-4), 79-91. <https://doi.org/10.1002/biof.5520270108>
- Mall, U. P., & Patel, V. H. (2023). Evaluation of pomegranate (*Punica granatum*) peel for bioaccessibility of polyphenols and prebiotic potential using in vitro model. *Food Chemistry Advances*, 2(100320), 100320. <https://doi.org/10.1016/j.focha.2023.100320>
- Martínez-Las Heras, R., Pinazo, A., Heredia, A., & Andrés, A. (2017). Evaluation studies of persimmon plant (*Diospyros kaki*) for physiological benefits and bioaccessibility of antioxidants by in vitro simulated gastrointestinal digestion. *Food chemistry*, 214, 478-485. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.07.104>

- Maskan, M. (2001). Drying, shrinkage and rehydration characteristics of kiwifruits during hot air and microwave drying. *Journal of Food Engineering*, 48(2), 177-182. [https://doi.org/10.1016/s0260-8774\(00\)00155-2](https://doi.org/10.1016/s0260-8774(00)00155-2)
- Mathur, H., Beresford, T. P., & Cotter, P. D. (2020). Health benefits of lactic acid bacteria (LAB) fermentates. *Nutrients*, 12(6), 1679. <https://doi.org/10.3390/nu12061679>
- Minekus, M., Alminger, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., Carrière, F., Boutrou, R., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Egger, L., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., Lesmes, U., Macierzanka, A., Mackie, A., Marze, S., ... Brodkorb, A. (2014). A standardised static in vitro digestion method suitable for food - an international consensus. *Food & function*, 5(6), 1113–1124. <https://doi.org/10.1039/c3fo60702j>
- Miranda, M., Maureira, H., Rodríguez, K., & Vega-Gálvez, A. (2009). Influence of temperature on the drying kinetics, physicochemical properties, and antioxidant capacity of Aloe Vera (*Aloe Barbadensis* Miller) gel. *Journal of Food Engineering*, 91(2), 297-304. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2008.09.007>
- Moran, M. (2015). *Consumo y producción sostenibles*. Desarrollo Sostenible. <https://www.un.org/sustainabledevelopment/es/sustainable-consumption-production/>
- Naciones Unidas (ONU). (2023). *El hambre aumenta por cuarto año consecutivo y azota ya a más de 250 millones de personas*. Noticias ONU. Consultado el 9/05/2023 en <https://news.un.org/es/story/2023/05/1520632>
- Neacsu, M., Vaughan, N., Raikos, V., Multari, S., Duncan, G. J., Duthie, G. G., & Russell, W. R. (2015). Phytochemical profile of commercially available food plant powders: their potential role in healthier food reformulations. *Food chemistry*, 179, 159–169. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.01.128>
- Ortega, N., Macià, A., Romero, M.-P., Reguant, J., & Motilva, M.-J. (2011). Matrix composition effect on the digestibility of carob flour phenols by an in-vitro digestion model. *Food Chemistry*, 124(1), 65-71. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.05.105>
- Östergren, K., Gustavsson, J., Bos-Brouwers, H., Timmermans, T., Hansen, O.-J., Møller, H., Anderson, G., O'Connor, C., Soethoudt, H., Quedsted, T., Eastal, S., Politano, A., Bellettato, C., Canali, M., Falasconi, L., Gaiani, S., Vittuari, M., Schneider, F., Moates, G., Waldron, K., Redlingshöfer, B. (2014). *FUSIONS Definitional Framework for Food Waste*. ISBN 978-91-7290-331-9
- Parada, R. B., Marguet, E., Campos, C., & Vallejo, M. (2023). Improved antioxidant capacity of three Brassica vegetables by two-step-controlled fermentation using isolated autochthonous strains of the genus *Leuconostoc* spp. and *Lactiplantibacillus* spp. *Food Chemistry. Molecular Sciences*, 6(100163), 100163. <https://doi.org/10.1016/j.fochms.2023.100163>
- Radünz, M., Hackbart, H. C. D. S., Bona, N. P., Pedra, N. S., Hoffmann, J. F., Stefanello, F. M., & Da Rosa Zavareze, E. (2020). Glucosinolates and phenolic compounds rich broccoli extract: Encapsulation by electrospraying and antitumor activity against glial tumor cells. *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces*, 192(111020), 111020. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.111020>
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*, 26(9-10), 1231-1237. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(98)00315-3)

- Rico-Lugo, S. D., Kimita, K., & Nishino, N. (2023). Characteristics of decision process towards circular food economy: A review. *Cleaner Logistics and Supply Chain*, 7(100104), 100104. <https://doi.org/10.1016/j.clscn.2023.100104>
- Rungapamestry, V., Duncan, A. J., Fuller, Z., & Ratcliffe, B. (2007). Effect of cooking brassica vegetables on the subsequent hydrolysis and metabolic fate of glucosinolates. *The Proceedings of the Nutrition Society*, 66(1), 69–81. <https://doi.org/10.1017/S0029665107005319>
- Sagar, N. A., Pareek, S., Sharma, S., Yahia, E. M., & Lobo, M. G. (2018). Fruit and vegetable waste: Bioactive compounds, their extraction, and possible utilization. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 17(3), 512-531. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12330>
- Santagata, R., Ripa, M., Genovese, A., & Ulgiati, S. (2021). Food waste recovery pathways: Challenges and opportunities for an emerging bio-based circular economy. A systematic review and an assessment. *Journal of Cleaner Production*, 286(125490), 125490. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.125490>
- Santos, P. H. S., & Silva, M. A. (2008). Retention of vitamin C in drying processes of fruits and vegetables—A review. *Drying Technology*, 26(12), 1421-1437. <https://doi.org/10.1080/07373930802458911>
- 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. En *Oxidants and Antioxidants Part A* (pp. 152-178). Elsevier.
- Su, D., Luo, M., Liu, H., Qi, X., Zeng, Q., He, S., Fen, S., & Zhang, J. (2019). The effect of simulated digestion on the composition of phenolic compounds and antioxidant activities in lychee pulp of different cultivars: Digestion improves lychee antioxidant activity. *International Journal of Food Science & Technology*, 54(11), 3042-3050. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14217>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.11.021>
- Touret T, Oliveira M, Semedo-Lemsaddek T (2018). Putative probiotic lactic acid bacteria isolated from sauerkraut fermentations. *PLoS ONE* 13(9): e0203501. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203501>
- Turkmen, N., Sari, F., & Velioglu, Y. (2005). The effect of cooking methods on total phenolics and antioxidant activity of selected green vegetables. *Food Chemistry*, 93(4), 713-718. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.12.038>
- Tylewicz, U., Nowacka, M., Rybak, K., Drozdal, K., Dalla Rosa, M., & Mozzon, M. (2020). Design of healthy snack based on kiwifruit. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(14), 3309. <https://doi.org/10.3390/molecules25143309>
- Van Buggenhout, S., Lille, M., Messagie, I., Van Loey, A., Autio, K., & Hendrickx, M. (2006). Impact of pretreatment and freezing conditions on the microstructure of frozen carrots: Quantification and relation to texture loss. *European Food Research and Technology*, 222(5-6), 543-553. <https://doi.org/10.1007/s00217-005-0135-6>
- Vargas, L., Kapoor, R., Nemzer, B., & Feng, H. (2022). Application of different drying methods for evaluation of phytochemical content and physical properties of broccoli, kale, and

- spinach. *Lebensmittel-Wissenschaft Und Technologie [Food Science and Technology]*, 155(112892), 112892. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112892>
- Vega-Gálvez, A., Ah-Hen, K., Chacana, M., Vergara, J., Martínez-Monzó, J., García-Segovia, P., Lemus-Mondaca, R., & Di Scala, K. (2012). Effect of temperature and air velocity on drying kinetics, antioxidant capacity, total phenolic content, colour, texture and microstructure of apple (var. Granny Smith) slices. *Food Chemistry*, 132(1), 51-59. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.10.029>
- Vikram-Simha, H. V., Sharanakumar, H., Udaykumar, N., Ramachandra, C. T., Tamil Vendan, K. & Prakash, K. V. (2012). Comparative studies on spray-drying and freeze-drying of pomegranate (*Punica granatum L.*) juice fermented with *L. acidophilus*. En *International Journal of Food and Nutritional Sciences*, vol. 1, no.1, pp. 118–127. Board.
- Wang, G.-Q., Pu, J., Yu, X.-Q., Xia, Y.-J., & Ai, L.-Z. (2020a). Influence of freezing temperature before freeze-drying on the viability of various *Lactobacillus plantarum* strains. *Journal of Dairy Science*, 103(4), 3066-3075. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17685>
- Wang, Z., Kwan, M. L., Pratt, R., Roh, J. M., Kushi, L. H., Danforth, K. N., Zhang, Y., Ambrosone, C. B., & Tang, L. (2020b). Effects of cooking methods on total isothiocyanate yield from cruciferous vegetables. *Food Science & Nutrition*, 8(10), 5673-5682. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1836>
- Wojtunik-Kulesza, K., Oniszczuk, A., Oniszczuk, T., Combrzyński, M., Nowakowska, D., & Matwijczuk, A. (2020). Influence of In Vitro Digestion on Composition, Bioaccessibility and Antioxidant Activity of Food Polyphenols-A Non-Systematic Review. *Nutrients*, 12(5), 1401. <https://doi.org/10.3390/nu12051401>
- Xu, Y., Xiao, Y., Lagnika, C., Li, D., Liu, C., Jiang, N., Song, J., & Zhang, M. (2020). A comparative evaluation of nutritional properties, antioxidant capacity and physical characteristics of cabbage (*Brassica oleracea* var. Capitata var L.) subjected to different drying methods. *Food chemistry*, 309, 124935. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.06.002>
- Yan, X., Gong, X., Zeng, Z., Wan, D., Xia, J., Ma, M., Zhao, J., Wang, P., Zhang, S., Yu, P., & Gong, D. (2023). Changes in structure, functional properties, and volatile compounds of *Cinnamomum camphora* seed kernel protein by Maillard reaction. *Food Bioscience*, 53(102628), 102628. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.102628>
- Yan, Y., Zhang, F., Chai, Z., Liu, M., Battino, M., & Meng, X. (2019). Mixed fermentation of blueberry pomace with *L. rhamnosus* GG and *L. plantarum*-1: Enhance the active ingredient, antioxidant activity and health-promoting benefits. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 131(110541), 110541. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.05.049>
- Yüceetepe, A., Altın, G., & Özçelik, B. (2021). A novel antioxidant source: evaluation of in vitro bioaccessibility, antioxidant activity and polyphenol profile of phenolic extract from black radish peel wastes (*Raphanus sativus L.* var. *niger*) during simulated gastrointestinal digestion. *International Journal of Food Science & Technology*, 56(3), 1376-1384. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14494>
- Zandani, G., Kaftori-Sandler, N., Sela, N., Nyska, A., & Madar, Z. (2021). Dietary broccoli improves markers associated with glucose and lipid metabolism through modulation of gut microbiota in mice. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*, 90(111240), 111240. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2021.111240>

- Zhang, C., Quek, S. Y., Fu, N., Su, Y., Kilmartin, P. A., & Chen, X. D. (2020). Storage stability and in vitro digestion of microencapsulated powder containing fermented noni juice and probiotics. *Food Bioscience*, 37(100740), 100740. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100740>
- Zhang, M., Chen, H., Mujumdar, A. S., Tang, J., Miao, S., & Wang, Y. (2017). Recent developments in high-quality drying of vegetables, fruits, and aquatic products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(6), 1239-1255. <https://doi.org/10.1080/10408398.2014.979280>
- Zhu, A., & Xia, K. (2013). Dynamics of convective hot air drying of filiform *Lagenaria siceraria*. *Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly*, 19(4), 485-492. <https://doi.org/10.2298/ciceq120313082z>



## ANEXO I: Relación del trabajo con los objetivos de desarrollo sostenible de la agenda 2030

### 1. Grado de relación del trabajo con los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS)

OBJETIVOS DE DESARROLLO SOSTENIBLES	ALTO	MEDIO	BAJO	NO PROCEDE
ODS 1. Fin de la pobreza			X	
ODS 2. Hambre cero	X			
ODS 3. Salud y bienestar	X			
ODS 4. Educación de calidad				X
ODS 5. Igualdad de género				X
ODS 6. Agua limpia y saneamiento				X
ODS 7. Energía asequible y no contaminante				X
ODS 8. Trabajo decente y crecimiento económico		X		
ODS 9. Industria, innovación e infraestructuras				X
ODS 10. Reducción de las desigualdades				X
ODS 11. Ciudades y comunidades sostenibles				X
ODS 12. Producción y consumo responsables	X			
ODS 13. Acción por el clima		X		
ODS 14. Vida submarina				X
ODS 15. Vida de ecosistemas terrestres			X	
ODS 16. Paz, justicia e instituciones sólidas				X
ODS 17. Alianzas para lograr los objetivos				X

### 2. Descripción de la alineación del TFG con los ODS con un grado de relación más alto

La industria alimentaria y su gestión ineficiente sobre las pérdidas producidas durante la cadena de producción juegan un papel importante en el deterioro de los ecosistemas, biodiversidad y recursos naturales. Asimismo, es necesaria la concienciación social para reducir alimentos desperdiciados que se descartan en lugar de ser consumidos, agravando aún más el impacto medioambiental de la industria alimentaria. En este sentido, con el fin de comprometerse con los ODS establecidos en 2015, se debe encontrar un equilibrio de sostenibilidad ambiental, así como social y económico. Para el cumplimiento de estos, se necesita una mayor implicación y responsabilidad colectiva, al igual que la colaboración entre los distintos sectores privados y públicos. El presente trabajo fin de grado aporta una posible solución que podría no solo reducir las pérdidas y desperdicios, sino que también revalorizar estas materias primas reintroduciéndolas en las cadenas de producción.

Uno de los objetivos de alto grado de relación es el ODS 2 “Hambre cero” que consiste en poner fin al hambre mundial. Se sabe que un tercio de los alimentos se pierde a lo largo de la cadena de producción durante cada año. Mientras la desnutrición es uno de los problemas que persiste tras décadas, donde 8,9 millones de personas en el mundo padecen hambre. Paradójicamente el número de los desperdicios producidos por el propio consumidor sigue en aumento, y con ello la demanda de producción de los alimentos.

Para alcanzar este objetivo debe producirse un cambio en el sistema agroalimentario, centrándose en promover la seguridad alimentaria mediante bases económicas y sociales que promuevan la sostenibilidad ambiental. Así, la obtención de ingredientes en polvo a partir de

residuos permite eliminar el concepto de usar y tirar, e introduce el de economía circular por la que se inician procesos de reutilización de los residuos generados. Además, las etapas del proceso de producción de los ingredientes en polvo como la fermentación o el secado son técnicas ampliamente utilizadas que las industrias pueden incorporar en su dinámica de trabajo.

Alguna meta del ODS 2 que más relación tiene es la meta 2.4: “Para 2030, asegurar la sostenibilidad de los sistemas de producción de alimentos y aplicar prácticas agrícolas resilientes que aumenten la productividad y la producción, contribuyan al mantenimiento de los ecosistemas, fortalezcan la capacidad de adaptación al cambio climático, los fenómenos meteorológicos extremos, las sequías, las inundaciones y otros desastres, y mejoren progresivamente la calidad del suelo y la tierra”. En el presente trabajo, se estudia un proceso de valorización de productos, con el fin de utilizar los desperdicios como nueva materia prima para la producción de ingredientes funcionales con aplicaciones en la industria alimentaria, desde *snacks*, bebidas hasta sustitutos nutricionales. Por tanto, es una técnica que promueve la preservación de los ecosistemas actuales garantizando el bienestar de las generaciones futuras.

Por otro lado, el ODS 3 “Salud y bienestar” busca garantizar una vida sana y promover el bienestar social y de las generaciones futuras. Por tanto, la obtención de ingredientes en polvo propone una alternativa al desperdicio de alimentos, de forma que las emisiones generadas no habrán sido en vano. Su reintroducción en la cadena alimentaria no solo reduce el impacto medioambiental, sino que también puede aportar propiedades excepcionales en la elaboración de alimentos con ingredientes en polvo de alto valor antioxidante y nutracéutico.

Una de las metas relacionadas con la propuesta como la meta 3.4: “Para 2030, reducir en un tercio la mortalidad prematura por enfermedades no transmisibles mediante la prevención y el tratamiento y promover la salud mental y el bienestar”. La fermentación con un microorganismo probiótico sobre el residuo de brócoli permite la obtención de polvos probióticos beneficiosos para la salud por sus propiedades antimicrobianas, antioxidantes e inmunomoduladoras. Su consumo promovería un estilo de vida saludable por su potencial en la prevención y tratamiento de enfermedades, como el cáncer, diabetes, cardiopatías, intestinales y microbianas.

Finalmente, el ODS 12 “Garantizar modalidades de consumo y producción sostenibles” tiene como objetivos impulsar a las fuerzas económicas mundiales que utilizan el medio ambiente natural y de los recursos de forma destructiva sobre el planeta, para que realicen cambios en el sistema actual. Para ello, se necesita concienciación individual y colectiva para llevar a cabo un consumo responsable y sostenible de los recursos.

Dentro del ODS 12, destacan las siguientes metas, la meta 12.3: “De aquí a 2030, reducir a la mitad el desperdicio de alimentos per cápita mundial en la venta al por menor y a nivel de los consumidores y reducir las pérdidas de alimentos en la cadena de producción y suministro, incluidas las pérdidas posteriores a la cosecha” y la meta 12.5: “De aquí a 2030, reducir considerablemente la generación de desechos mediante actividades de prevención, reducción, reciclado y reutilización”. Juntas describen los objetivos que el presente trabajo quiere llevar a cabo, en el que se busca reutilizar los residuos alimentarios como principal materia prima del proceso, de forma que las pérdidas en producción no se considerarían como tal, y se utilizarían en la obtención de polvos como ingredientes funcionales.