

UCUENCA

Universidad de Cuenca

Facultad de Ciencias Químicas

Carrera de Ingeniería Química

Obtención de productos de valor añadido a partir de residuales de brócoli (*Brassica oleracea* L. var. *Italica*)

Trabajo de titulación previo a la
obtención del título de Ingeniero
Químico

Autores:

Tannya Cristina Orellana Yumbla

Antonio Isaac Ortega Andrade

Director:

Jorge Washington Delgado Noboa

ORCID:  0000-0002-4765-8868

Cuenca, Ecuador

2024-01-30

Resumen

El constante crecimiento poblacional conlleva una sobreexplotación de recursos por parte de las industrias, generando una crisis climática. El propósito de esta investigación fue la búsqueda de dos alternativas o subproductos que mejoren la calidad y sostenibilidad de la industria, mediante la revalorización de los desechos provocados por la agroindustria, de manera específica, al generado por el Brócoli (*Brassica oleracea* L. var. *Itálica*), debido a que, en su empleo, alrededor del 70% de la biomasa de la planta es considerada no comestible. En la obtención de azúcares se empleó un pretratamiento de hidrólisis ácida, la cual se optimizó aplicando un diseño factorial 2^4 , resultando en parámetros de temperatura de 120 °C, tiempo de 30 minutos, una concentración de biomasa de 5% p/v, y una concentración de ácido de 0,1% v/v, obteniendo 187,31 g/L de azúcares. A este resultado se le aplicó una hidrólisis enzimática utilizando la enzima Cellic Ctec2, mezcla enzimática que contiene celulasas, β -glucosidasas y hemicelulasas; bajo las condiciones de pH 4,5, temperatura 50 °C, agitación de 600 rpm durante una hora, que resultó en 220,4 g/L de azúcares. Mediante revisión bibliográfica, se recomienda su uso en la elaboración de biocombustibles. Adicionalmente, en la elaboración de la harina/polvo se utilizó la liofilización como método de secado para preservar la composición y nutrientes. El análisis bromatológico realizado presenta el 37,306% de proteínas, 26,766% de fibra cruda, 25,58% de carbohidratos, 8,724% de cenizas y una humedad del 0,623%. Su uso puede implementarse en productos de la industria alimentaria, nutracéutica y cosmética.

Palabras clave: compuestos orgánicos, cambio climático, materia prima, compuestos químicos



El contenido de esta obra corresponde al derecho de expresión de los autores y no compromete el pensamiento institucional de la Universidad de Cuenca ni desata su responsabilidad frente a terceros. Los autores asumen la responsabilidad por la propiedad intelectual y los derechos de autor.

Repositorio Institucional: <https://dspace.ucuenca.edu.ec/>

Abstract

The constant population growth leads to an overexploitation of resources by industries, generating a climate crisis. The purpose of this research was the search for two alternatives or by-products that improve the quality and sustainability of the industry, through the revaluation of the waste produced by the agroindustry, specifically, the waste generated by Broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *Italica*), because, in its use, about 70% of the biomass of the plant is considered inedible. An acid hydrolysis pretreatment was used to obtain sugars, which was optimized by applying a 2⁴ factorial design, resulting in temperature parameters of 120 °C, time of 30 minutes, a biomass concentration of 5% w/v, and an acid concentration of 0.1% v/v, obtaining 187.31 g/L of sugars. An enzymatic hydrolysis was applied to this result using the enzyme Cellic Ctec2, an enzyme blend containing cellulases, β-glucosidases and hemicellulases; under the conditions of pH 4.5, temperature 50 °C, agitation of 600 rpm for one hour, which resulted in 220.4 g/L of sugars. By means of a bibliographic review, its use is recommended in the elaboration of biofuels. Additionally, freeze-drying was used in the preparation of the flour/powder as a drying method to preserve the composition and nutrients. The bromatological analysis carried out shows 37.306% protein, 26.766% crude fiber, 25.58% carbohydrates, 8.724% ash and 0.623% moisture. Its use can be implemented in products of the food, nutraceutical and cosmetic industries.

Keywords: organic compounds, climate change, raw material, chemical compounds



The content of this work corresponds to the right of expression of the authors and does not compromise the institutional thinking of the University of Cuenca, nor does it release its responsibility before third parties. The authors assume responsibility for the intellectual property and copyrights.

Institutional Repository: <https://dspace.ucuenca.edu.ec/>

Índice de contenido

Resumen.....	2
Abstract.....	3
Dedicatoria.....	10
Agradecimientos.....	12
Capítulo 1. Introducción.....	14
1.1 Objetivos Generales y Específicos.....	15
1.1.1 Objetivo General.....	15
1.1.2 Objetivos Específicos.....	15
Capítulo 2. Marco Teórico.....	16
2.1 Residuos Agroindustriales.....	16
2.1.1 Problemática de los residuos agroindustriales.....	16
2.1.2 Enfoques actuales de los residuos agroindustriales.....	17
2.2 Biomasa.....	18
2.2.1 Biomasa lignocelulósica.....	19
2.2.2 Componentes de la biomasa lignocelulósica.....	19
2.2.3 Origen.....	20
2.2.4 Clasificación.....	20
2.2.5 Ventajas e inconvenientes del uso de la biomasa.....	21
2.2.6 Caracterización y pretratamientos de la biomasa lignocelulósica.....	21
2.2.7 Biomasa como fuente de obtención de energía.....	22
2.2.8 Tecnologías aplicadas a la biomasa para la obtención de energía.....	23
2.3 Brócoli.....	24
2.3.1 Generalidades.....	24
2.3.2 Producción y consumo mundial.....	25
2.3.3 Producción en el Ecuador.....	26
2.3.4 Superficie cosechada y Rendimiento de la producción.....	27
2.3.5 Zonas de producción.....	27
2.3.6 Variedades de brócoli en el Ecuador.....	28
2.3.7 Estructura y Morfología.....	28
2.3.8 Propiedades nutritivas y prebióticas.....	30
2.3.9 Composición química.....	32
2.3.10 Potencial de los residuos de brócoli a nivel mundial.....	33

2.3.11 Procesos de Extracción y Obtención de Productos de Valor Añadido	34
2.4 Obtención de Azúcares.....	35
2.4.1 Pretratamiento de la biomasa	35
2.4.2 Hidrólisis	36
2.4.3 Cuantificación de azúcares	38
2.4.4 Diseño experimental factorial 2 ^k no replicado.	38
2.5 Obtención de harina/polvo	39
2.5.1 Liofilización	39
2.5.2 Molienda	41
2.5.3 Caracterización Físico química	42
Capítulo 3. Metodología.....	44
3.1 Tipo y Diseño de Metodología	44
3.1.1 Tipo de Metodología.....	44
3.1.2 Diseño de Metodología.....	45
3.2 Localización del estudio.....	45
3.3 Materia Prima	46
3.4 Metodología para la obtención de azúcares	46
3.4.1 Materiales, equipos y reactivos.....	48
3.4.2 Tratamiento de la materia prima	48
3.4.3 Pretratamiento ácido o Hidrólisis ácida	48
3.4.4 Hidrólisis Enzimática	52
3.4.5 Cuantificación de azúcares totales	53
3.5 Metodología para la obtención de harina	55
3.5.1 Materiales, equipos y reactivos.....	56
3.5.2 Tratamiento de la materia prima	56
3.5.3 Liofilización	56
3.5.4. Reducción de tamaño y tamizado.....	57
3.5.5. Análisis Bromatológico	57
Capítulo 4. Resultados y Discusiones.....	59
4.1 Hidrólisis Ácida.....	59
4.1.1 Parámetros de operación	59
4.1.2 Cuantificación de los azúcares generados	60
4.1.3 Replicas centrales	62
4.1.4 Selección de términos para la construcción del Análisis de la varianza estadística (ANOVA).....	62
4.1.5 Correlación de los parámetros y sus interacciones.....	65

4.1.6 Verificación de supuestos del modelo	66
4.1.7 Análisis de Varianza (ANOVA).....	68
4.1.8 Análisis de gráficas	69
4.1.9 Análisis de resultados de la hidrólisis ácida	73
4.2 Hidrólisis Enzimática	74
4.2.1 Análisis de resultados de la hidrólisis enzimática.....	74
4.3 Análisis de resultados de la obtención de harina/polvo	75
4.4 Rendimiento del secado y producto.	78
4.4.1 Humedad porcentual	79
4.4.2 Rendimiento de la materia prima (%)	79
Capítulo 5. Conclusiones y Recomendaciones.....	80
5.1 Conclusiones.....	80
5.2 Recomendaciones	80
Referencias	82
Anexos	97
Anexo A. Equipos.....	97
Anexo B. Metodología.....	98
Obtención de azúcares	98
Obtención de harina	100
Anexo C. Manual del liofilizador.....	103
Anexo D. Resultados del laboratorio del Análisis Bromatológico	108

Índice de figuras

Figura 1. Producción mundial de cultivos primarios por grupo de productos básicos..	16
Figura 2. Estructura de Biomasa Lignocelulósica..	20
Figura 3. Emisiones globales de CO2 procedentes de la combustión de energía y procesos industriales, 1900-2022..	23
Figura 4. Procesos o tratamientos de conversión de la biomasa..	24
Figura 5. Producción de brócoli por diferentes países en 2020 (top 10)..	25
Figura 6. Hectáreas de Brócoli cultivado en el Ecuador..	27
Figura 7. Áreas de Brócoli cultivadas en el Ecuador..	27
Figura 8. Variedades de Brócoli: a. Legacy, b. Domador y c. Marathon..	28
Figura 9. Porcentaje de pérdida de brócoli en diferentes pasos de 2012 a 2019..	34
Figura 10. Tipos de pretratamiento de la biomasa..	36
Figura 11. Perfil de temperatura del producto durante el proceso de liofilización..	40
Figura 12. Localización del laboratorio tecnológico de la Facultad de Ciencias Químicas..	45
Figura 13. Localización de la Facultad de Hospitalidad..	46
Figura 14. Diagrama de flujo de la obtención de azúcares del brócoli..	47
Figura 15. Diagrama de flujo de la hidrólisis ácida del brócoli..	52
Figura 16. Diagrama de flujo de la hidrólisis enzimática..	52
Figura 17. Curva de calibración de glucosa..	54
Figura 18. Diagrama de flujo para la cuantificación de azúcares totales..	54
Figura 19. Diagrama de flujo de la obtención de harina del brócoli..	55
Figura 20. Diagrama de flujo de la liofilización del brócoli..	57
Figura 21. Gráfica de Probabilidad Normal de los resultados de la hidrólisis ácida..	64
Figura 22. Gráfica de Pareto de los resultados de la hidrólisis ácida..	64
Figura 23. Gráfica de probabilidad normal de residuos..	67
Figura 24. Gráfica de dispersión de los residuos..	67
Figura 25. Diagrama de Pareto de los efectos seleccionados ..	70
Figura 26. Gráfica de Probabilidad Normal de los efectos seleccionados..	70
Figura 27. Gráfica de efectos principales para azúcares totales..	71
Figura 28. Gráfica de Interacciones..	72
Figura 29. Gráfica de cubos de cuantificación de azúcares..	72

Índice de tablas

Tabla 1. Composición nutricional del florete en 100 gramos de brócoli..	30
Tabla 2. Compuestos bioactivos del brócoli.	31
Tabla 3. Composición nutricional de las hojas y tallos en 100 gramos de brócoli..	31
Tabla 4. Composición química aproximada del brócoli fresco.	32
Tabla 5. Composición química de residuos de brócoli.	32
Tabla 6. Propiedades fisicoquímicas y bioquímicas de las harinas de florete, tallos, hojas..	33
Tabla 7. Datos experimentales usados y adaptados en diferentes estudios para la hidrólisis ácida.	37
Tabla 8. Etapas de Liofilización.	40
Tabla 9. Ventajas y desventajas de la Liofilización.	41
Tabla 10. Principios fundamentales de los métodos aplicados según la AOAC e ISO.	42
Tabla 11. Valores de referencia de Análisis Bromatológico de diferentes estudios.	43
Tabla 12. Materiales, equipos y reactivos para el proceso de obtención de azúcares.	48
Tabla 13. Características del reactor Batch.	49
Tabla 14. Condiciones de operación de la hidrólisis ácida.	50
Tabla 15. Matriz de experimentos para el diseño experimental.	51
Tabla 16. Materiales, equipos y reactivos para el método de cuantificación de azúcares de Dubois o Fenol-Sulfúrico.	53
Tabla 17. Materiales, equipos y reactivos para el proceso de liofilización.	56
Tabla 18. Parámetros y metodologías aplicadas en el análisis bromatológico.	58
Tabla 19. Plan de Experimentación.	60
Tabla 20. Cuantificación de azúcares de la hidrólisis ácida.	61
Tabla 21. Resultado de los valores de réplica centrales.	62
Tabla 22. Magnitudes y frecuencias de cada efecto.	63
Tabla 23. Análisis de Varianza para la cuantificación de azúcares.	68
Tabla 24. Resultados de la cuantificación de azúcares para la hidrólisis enzimática.	74
Tabla 25. Resultados del análisis bromatológico.	76

Índice de ecuaciones

Ecuación. 1	65
Ecuación. 2	66
Ecuación. 3	68
Ecuación. 4	69
Ecuación. 5	79
Ecuación. 6	79

Dedicatoria

A Dios por darme la fuerza y perseverancia para alcanzar esta meta.

A mi Mami, Olga Rebeca quien fue, es y será mi motivación para lograr todas las metas que me propongo, por ser mi apoyo incondicional de principio a fin, por creer en mí a pesar de todo, por su inmenso amor, esfuerzo, sacrificio y paciencia para superar todos los obstáculos que se presentaron a lo largo del camino, por hacer todo lo posible para culminar mi carrera universitaria y cumplir nuestro sueño.

A mi hermanita Nube Gabriela, por ser mi confidente y soporte en todo momento.

A mi primo Klever Yumbla, por su generosidad a lo largo de mi vida y por brindarme su apoyo de todas las maneras posibles para realizar esta tesis.

En memoria de mi abuelita T.M y primo C.C., quienes me enseñaron las lecciones más valiosas de la vida cuando más las necesitaba.

Tannya Cristina Orellana Yumbla.

Dedicatoria

Quisiera dedicar este logro a Dios, a mis padres y hermanos, a la familia y los amigos que estuvieron presente a lo largo de esta etapa de estudio y en mi vida brindándome, apoyo incondicional y compañía, aconsejándome en todo momento y por todos esos maravillosos momentos que hemos pasado juntos. Y aunque no muchas veces lo he mencionado, los quiero y los llevo presentes en mi vida.

Antonio Isaac Ortega Andrade.

Agradecimientos

A Dios por permitirme llegar aquí y cumplir este sueño por levantarme cuantas veces fueron necesarias.

A mi querida Universidad de Cuenca en donde su formación académica y humana fueron las mejores.

A mi profesor Ph.D. Jorge Delgado, tutor de Tesis por su enseñanza, conocimientos y comprensión en la elaboración de la misma.

A quienes fueron mis maestros durante la carrera y sobre todo a quienes fueron parte de la realización de esta tesis, pues de todos aprendí no sólo conocimientos académicos sino aquellos valores humanos que siempre formarán parte de mí y de mi vida profesional.

A todos los que formaron parte de este viaje, a quienes por cosas del destino se fueron o incluso no quisieron quedarse, pero especialmente a quienes a pesar del tiempo y la distancia continúan junto a mí.

Tannya Cristina Orellana Yumbla.

Agradecimientos

Agradecer a Dios todopoderoso por brindarme salud y fuerza cada día.

A mi padre Oswaldo que me ha demostrado la importancia de la perseverancia y responsabilidad, con su ejemplo de lucha y esfuerzo por seguir adelante, lo cual me ha permitido siempre contar con lo necesario y poder culminar con esta meta.

A mi madre Jinna que siempre me ha estado apoyando en todo momento, inculcando sus valores para que sea un hombre de bien y siendo un pilar muy importante de mi vida con su ejemplo y estilo de vida.

A mis hermanos Andrés, Diego y Anthonela, por brindarme compañía, por inspirarme y ser parte de todas esas anécdotas que hemos vivido juntos.

A mi tía Ceci y mis primos, que me han brindado acogida en su hogar a lo largo de la carrera, haciéndome sentir parte de su familia, sus apoyos y consejos en todo momento de la carrera, y por soportar todos mis aptitudes y errores.

A todos mis amigos que estuvieron a lo largo de la carrera, por todas esas anécdotas compartidas, sobre todo a mis mejores amigos gracias por el apoyo y las alegrías que me permitieron culminar exitosamente con la carrera.

A todos aquellos docentes que compartieron sus conocimientos y experiencias necesarias para forjar mi carácter profesional, en especial a mi tutor el ingeniero Jorge Delgado principal colaborador en la realización de este trabajo, que nos ha brindado su apoyo, dirección, enseñanza y colaboración en esta última etapa.

A todas las personas que nos ayudaron en la culminación de este trabajo.

Antonio Isaac Ortega Andrade.

Capítulo 1. Introducción

En la última década, se evidencia que el crecimiento poblacional genera un aumento en el desarrollo y consumo de materias primas a niveles preocupantes para el medio ambiente (Prieto-Sandoval et al., 2017). Se estima que 1.300 millones de toneladas de alimentos se desperdician anualmente en el mundo, debido a esto, la producción agroindustrial y la gestión eficiente de residuos adquieren importancia en la actualidad. La búsqueda de alternativas sostenibles y rentables se torna fundamental para promover una industria más respetuosa con el medio ambiente (Benítez, 2018).

Esta problemática abarca a todos los países del mundo, pero con mayor énfasis a países como el Ecuador, donde el sector agrícola posee un papel importante en la economía del país y representa el 7,81% del PIB nacional, lo equivalente a 8.410,8 millones de dólares (Banco Central del Ecuador [BCE], 2019). Entre las materias primas más utilizadas en la producción agroindustrial mundial, se destaca el brócoli que forma parte importante por el nivel de consumo en diferentes países en donde resaltan China, India, Estados Unidos, México, entre otros (Yan et al., 2023).

Así como, la agroindustria ecuatoriana representa el 2% de las exportaciones del país, cifra significativa por lo que enfrenta el reto de gestionar estos residuos de manera eficiente (Ministerio de Agricultura y Ganadería [MAG], 2021). Pero actualmente su uso se limita solo a la parte comestible, proveniente del florete, que compone sólo un 15% de la biomasa total de la planta, lo cual provoca que el 47% de biomasa perteneciente a las hojas y el 38% perteneciente a las raíces y tallo, no posea algún valor comercial, lo que genera una gran cantidad de residuo sin aprovechamiento útil y rentable (Liu et al., 2018).

Entre las soluciones más prometedoras para combatir esta problemática medioambiental se encuentra la revalorización de los residuos agroindustriales para la producción de compuestos con valor agregado como productos químicos, biocombustibles, alimentos, entre otros (Tirado et al., 2022). Debido a la composición lignocelulósica de la biomateria del brócoli sus residuos se pueden utilizar para formar biocombustibles (Damien, 2010). Otra alternativa es aprovechar sus destacadas propiedades anticancerígenas, cardiovasculares, entre otros compuestos de alto valor en la elaboración de un subproducto (Yan et al., 2023, Krupa-Kozak et al., 2019).

Al presentarse escasos estudios previos sobre la utilización de la biomasa residual del brócoli, uno de los enfoques de esta investigación fue probar la presencia de azúcares fermentables en una especie local y proceder a optimizar para obtener un mejor rendimiento en la producción de azúcares fermentables. A la vez, otro de los enfoques fue conservar la

composición nutricional en la elaboración de un complemento alimenticio. Para demostrar esto se realiza la elaboración de dos subproductos.

El procedimiento de hidrólisis ácida se destaca como una de las alternativas más efectivas para la obtención de azúcares fermentables como materia prima en la producción de biocombustibles a partir de residuos lignocelulósicos, como los que genera la producción de brócoli (Soto-Romo et al., 2023). Sin embargo, este proceso puede incluir la formación de inhibidores que afectan la fermentación. La optimización de las condiciones de este pretratamiento y la hidrólisis enzimática es esencial para superar estos obstáculos y obtener un mejor rendimiento de azúcares (Gilon Salazar, 2022).

En este contexto, el presente trabajo tuvo como primer objetivo la obtención de azúcares y dentro de este objetivo el identificar y optimizar las condiciones de pretratamiento mediante hidrólisis ácida en la cual se realiza el diseño factorial 2k, bajo condiciones de operación controladas como la temperatura, el tiempo, la concentración de biomasa y la concentración del ácido para la posterior hidrólisis enzimática con las condiciones óptimas resultantes para aumentar su rendimiento.

Como segunda opción planteada para la valorización de los residuos de brócoli se elaboró harina mediante el método de liofilización bajo parámetros de tiempo y temperatura específicos, y así conseguir que el producto final posea las propiedades físico químicas requeridas para su posterior uso en la industria alimentaria, cosmética y nutracéutica.

1.1 Objetivos Generales y Específicos

1.1.1 Objetivo General.

Obtener productos de valor añadido a partir de residuos de brócoli, con el fin de mejorar la sostenibilidad y la rentabilidad de la producción agroindustrial.

1.1.2 Objetivos Específicos.

- Obtener azúcares mediante el pretratamiento ácido y la hidrólisis enzimática a partir de residuos del brócoli.
- Elaborar y caracterizar una harina mediante el proceso de liofilización de los residuos de brócoli.
- Comparar propiedades de los productos obtenidos con información secundaria y sugerir posibles aplicaciones industriales.

Capítulo 2. Marco Teórico

2.1 Residuos Agroindustriales

Entre los años 2000 a 2021, se presenta un crecimiento de un 54% de los cultivos agrícolas primarios a nivel mundial, como se evidencia en la Figura 1, alcanzando los 9.5 billones de toneladas de productos que se distribuyen como alimentos, pienso e insumos de productos farmacéuticos, combustibles, entre otros (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Ganadería [FAO], 2022). Estas actividades agrícolas, y gran parte de las industrias agroalimentarias, son responsables de producir grandes cantidades de subproductos de sus operaciones, se estima que 1.300 millones de toneladas de alimentos se desperdician anualmente en el mundo, lo que equivale entre un tercio y un cuarto de lo que se produce, se relaciona esta pérdida a la conducta de descartar alimentos que aún tienen algún valor por parte de los mayoristas, minoristas y consumidores (Benítez, 2018). Estos residuos provenientes de materia vegetal se encuentran constituidos mayormente de biomasa lignocelulósica y poseen un alto potencial económico debido a sus características, pero, a su vez, tienen el inconveniente de que no pueden ser almacenados por grandes periodos de tiempo al aire libre debido a su naturaleza de rápido deterioro y descomposición (Damien, 2010).

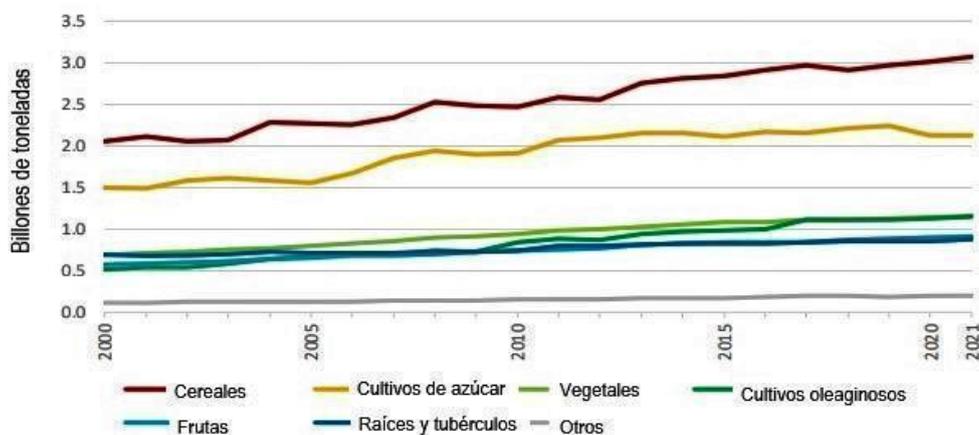


Figura 1. Producción mundial de cultivos primarios por grupo de productos básicos. Fuente: (FAO, 2022).

2.1.1 Problemática de los residuos agroindustriales

En la década de los setenta se llevan a cabo los primeros estudios sobre los residuos agroindustriales y su aprovechamiento, debido a que conforman una problemática en crecimiento por las cantidades significativamente altas de subproductos producidos, a la falta de interés por la naturaleza, al escaso avance de las tecnologías de tratamiento y una disposición final inadecuada al ser tratadas como residuos domésticos, lo que provoca costos

adicionales a las empresas y genera grandes perjuicios en ámbitos sociales, económicos y ambientales (Corredor & Pérez, 2018; Damien, 2010; Saval, 2012). Además, según la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), el 14% de todos los alimentos se desperdician antes de llegar al mercado, esto demuestra una ineficiencia del uso del producto cosechado, valorado en 400.000 millones de dólares, además, dichos desperdicios y la pérdida de estos productos generan emisiones de gases de efecto invernadero equivalentes al 8% del total en todo el mundo, lo cual ocasiona severas consecuencias al medio ambiente (FAO, 2020).

En Ecuador, país en vías de desarrollo, se demuestra que un porcentaje importante de su economía proviene de la agroindustria, motivo por el cual, los residuos agroindustriales se presentan en abundancia, concretamente se estima, a partir de los datos de cosecha registrados anualmente que se produce alrededor de 2.200 millones de kilogramos de desperdicios, entre los cuales, la mayoría tienen un potencial de uso debido a sus contenidos lignocelulósicos o de almidón pero son muy poco aprovechadas (Riera et al., 2018). Las zonas en donde se producen la mayoría de subproductos de la agroindustria ecuatoriana es en la región Costa principalmente, con productos cultivados en grandes cantidades para mercados externos como el cacao, banano y el café; seguido de la región Sierra en donde la producción de productos alimenticios y lácteos para el consumo en mercados internos del país es relevante (Quevedo, 2013). En el año 2013, según el Ministerio Coordinador de Sectores Estratégicos existe una tendencia hacia la disminución del empleo y consumo de biomásas, tales como la leña y los residuos de la caña de azúcar, como fuentes energéticas primarias en el país. Por lo que se relaciona el limitado uso de biomasa en el país a factores como: los precios más accesibles de otros combustibles, la falta de inventarios para la biomasa dentro del territorio que indiquen su ubicación y disponibilidad, la falta de impulso de las tecnologías de tratamiento y la falta de capital del gobierno (Samaniego & Abad, 2015).

2.1.2 Enfoques actuales de los residuos agroindustriales

En el siglo XXI, los residuos agroindustriales constituyen parte fundamental de la energía producida, especialmente en países menos desarrollados. Estos residuos se clasifican en: residuos de campo (hojas, vainas de semillas y tallos) que quedan después de realizar la cosecha y residuos de procesos (melaza, cáscara, bagazos, vástagos, semillas, hojas, tallo, paja, pulpa, rastrojo y raíces) aquellos existentes luego de transformarlos al producto final consumido (Romero-Sáez, 2022). Algunos ejemplos de residuos agroindustriales que se pueden aprovechar para la generación de bioetanol o biodiesel son la fibra de maíz, el orujo de uva, el rastrojo de maíz, tallo de algodón, bagazo de caña de azúcar o de sorgo dulce, entre otros (Romero-Sáez, 2022). Por lo que se sostiene la idea de reducir el desperdicio

mediante el aprovechamiento de los residuos, esto a su vez, es una solución a problemáticas mencionadas anteriormente, debido a que reduce el consumo de recursos naturales como materia prima y genera un nuevo ingreso para las empresas (Corredor & Pérez, 2018). Las grandes empresas toman la decisión de utilizar un gran porcentaje de los residuos como alimento de ganado o para mantener las condiciones óptimas del suelo destinado a cultivos y evitar su erosión, lo cual tiene un menor impacto en el ecosistema, pero no es del todo aprovechado el potencial oculto de estas materias residuales donde se puede recolectar una cantidad significativa en aquellas operaciones para fines energéticos, sin descuidar lo utilizado para el suelo (Fernández Salgado, 2009).

Por lo tanto, se estudian diversos avances tecnológicos para revalorizar estos subproductos de la industria agrícola y alimentaria, permitiendo tener procesos con mayor eficiencia y de forma más amigable con el ambiente (Fernández Salgado, 2009). Estos avances permiten generar una gran variedad de bioproductos nuevos, pero con un inconveniente latente de no ser energéticamente rentables por el momento. Uno de los principales usos de los residuos es emplear la biomasa presente en su interior para la producción de biocombustibles (Damien, 2010).

2.2 Biomasa

La biomasa según Tursi (2019) se define como “toda sustancia orgánica derivada directa o indirectamente de la fotosíntesis” (p. 2). Esto indica que la biomasa se encuentra presente en la mayoría de los seres vivos, tanto en plantas que las producen (forma directa) como en animales que las consumen (forma indirecta), también resalta lo esencial que es el proceso de síntesis para el origen de la misma.

Pero esta definición de biomasa se complementa con lo descrito por la RAE (Real Academia Española [RAE], 2023) “originada en un proceso biológico, espontáneo o provocado, utilizable como fuente de energía” y lo que menciona Puigdevall y Galindo (como se citó en Manrique, 2017) “pueden ser sometidos o no a diferentes procedimientos de transformación y que son susceptibles de ser utilizadas por debajo de su tasa de renovación natural” (p. 11). Estas definiciones hacen alusión a que este material mediante el proceso de fotosíntesis produce azúcares y otros compuestos, los cuales, se utilizan como materia prima de productos energéticos siempre que se cumpla con la regla de renovabilidad mencionada. No obstante, en el caso de los combustibles fósiles que se originan a partir de biomasa animal en los períodos geológicos, estos no cumplen con la tasa de renovación, es decir, no se consideran como una biomasa al ser una fuente de energía no renovable.

2.2.1 Biomasa lignocelulósica

La biomasa lignocelulósica se obtiene de los vegetales, cuya estructura está compuesta principalmente por celulosa, hemicelulosa y lignina, cuyos componentes comprenden más del 90% de la composición polimérica de la lignocelulosa presente en las plantas. Los sustratos lignocelulósicos se encuentran entre los recursos de biomasa de primera línea que deben explotarse para la producción de productos de valor añadido. Por ello resulta de gran interés para los investigadores de todo el mundo pues representa aproximadamente el 36% de los 1.300 millones de toneladas de residuos que se producen a nivel mundial cada año (Okonkwo et al., 2023). La valorización de este tipo de biomasa comprende estrategias de pretratamiento y transformación para su despolimerización y posterior producción de productos químicos, materiales, energía, forraje (alimento para ganado/animales), fertilizantes, entre otros (Tirado et al., 2022). Los pretratamientos que se aplican a la lignina hacen que la utilización final comprenda valores inferiores al 2%. Es por ello que se realizan investigaciones en la actualidad para encontrar una adecuada manera de obtener productos de valor añadido al utilizar todos los componentes lignocelulósicos y con el mínimo desperdicio posible en cuanto a la lignina (Dessie et al., 2023).

2.2.2 Componentes de la biomasa lignocelulósica

La totalidad de biomasa lignocelulósicas están compuestas de componentes estructurales mayoritariamente como la celulosa, hemicelulosa y lignina como se observa en la Figura 2. y de componentes no estructurales en menor medida, tales como compuestos orgánicos e inorgánicos, almidón, proteínas, entre otros (Pelaez Samaniego et al., 2013).

Los contenidos de las concentraciones de sus componentes estructurales están sujetos al tipo o fuente de biomasa. Pero en general se tiene entre un 40 a 50 % de celulosa (polímero de glucano lineal con más de 10.000 unidades de glucosa unidas por enlaces β -(1-4)-glucosídicos, de gran resistencia mecánica que permite formar la estructura de las plantas y es el polímero natural con mayor abundancia en el mundo), un 20 a 30 % de hemicelulosa (mezcla compleja de polímeros de hetero carbohidratos amorfos ramificados de cadena más corta conformado por una variedad de azúcares diferentes y de tres fenoles propiónicos, menos resistente térmicamente que el polímero de celulosa), y un 10 a 25 % de lignina (polímero amorfo complejo basado en estructuras fenólicas, responsables de liberar compuestos aromáticos en la degradación térmica, durabilidad, agente antimicrobiano y encargado del color de las plantas). La estructura de biomasa lignocelulósica está compuesta por fibrillas de celulosa unidas por hemicelulosa y cementadas por lignina (Pelaez Samaniego et al., 2013, Samaniego & Abad, 2015).

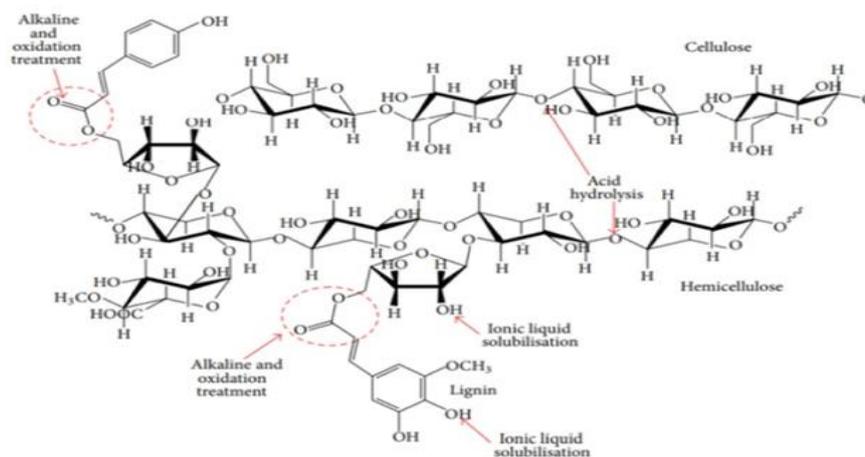


Figura 2. Estructura de Biomasa Lignocelulósica. **Adaptada de:** (Okonkwo et al., 2023).

2.2.3 Origen

La biomasa surge a partir de la energía solar que es captada por las plantas en forma de radiaciones lumínicas mediante un proceso denominado fotosíntesis, en el cual además se capta dióxido de carbono de la atmósfera, agua y minerales del suelo para transformar estas radiaciones en azúcares, las cuales se almacenan en forma de energía química en su organismo y llega a los animales mediante la cadena alimenticia (Madrid, 2012).

Se puede obtener este biomaterial de fuentes como los bosques naturales, plantaciones forestales, producciones de cultivos y algas o de los residuos de cualquiera de las fuentes que se mencionan. También pueden ser derivados de procesos industriales, municipales u otras operaciones gubernamentales (Nunes et al., 2020).

2.2.4 Clasificación

La biomasa al ser un término que abarca una amplia gama de conceptos y residuos se presentan diferentes opciones para su clasificación, las más comunes suelen ser: por su procedencia (naturales y antropológicas), su finalidad (cultivos energéticos y residuales), el contenido de humedad (biomasa residual húmeda y seca si su contenido de agua es mayor o menor al 50% respectivamente), los elementos que la componen (azucarada, lignocelulósica, oleaginosa, amilácea, entre otros) y el sector que lo suministra (deforestación, industria, agricultura, ganadería y residuos) (Fernández Salgado, 2009; Manrique, 2017).

Para el caso de este estudio, la biomasa de residuos de Brócoli se clasifica como antropológica, ya que se obtiene de las actividades agrícolas e industriales que realiza el ser humano. Además, se considera residual, debido a que no se emplea en procesos posteriores, salvo el compostaje y presenta un contenido de humedad mayor al 50%, en sus tallos y hojas, lo que la convierte en una biomasa húmeda (Rodríguez & Rojas, 2022). Por último, de

acuerdo a su contenido se encasilla como una biomasa lignocelulósica, según el estudio de Liu et al. (2018), la identifica como un material lignificado con un gran potencial.

2.2.5 Ventajas e inconvenientes del uso de la biomasa

Entre las principales ventajas de la biomasa destaca su carácter renovable lo que significa que tiene la capacidad de regenerarse por medios naturales. También posee otros beneficios, ya que en su combustión no desprende hidrocarburos y azufre, o lo hace en cantidades muy insignificantes lo cual evita la contaminación, además sus cultivos impiden la erosión de suelos (Roldán Viloría, 2013). Otras ventajas relacionadas con el medio ambiente incluyen un balance de dióxido de carbono neutro y la ausencia de emisión de partículas sólidas, contaminantes nitrogenados o sulfurados, a diferencia de otros combustibles (Fernández Salgado, 2009).

Entre los inconvenientes de la biomateria está su costo de producción a comparación de combustibles fósiles, además de ser estacional y necesitar un acondicionamiento o transformación en algunos casos (Fernández Salgado, 2009). Además, se conoce que no todos los productos de la biomasa son recuperables y para que su aprovechamiento sea rentable es necesario disponer grandes cantidades del biomaterial, lo cual dificulta procesos relacionados a su obtención como la recolección, el transporte y el almacenaje, esto incrementa los costos de su tratamiento (Roldán Viloría, 2013).

2.2.6 Caracterización y pretratamientos de la biomasa lignocelulósica.

La caracterización de cualquier tipo de biomasa se realiza con la finalidad de conocer sus características físico químicas, además que es un proceso fundamental, debido a que influye en la manera en la que se va a realizar procesos tales como el transporte, comercialización, transformación y utilización, con o sin fines energéticos (Samaniego & Abad, 2015). Entre los métodos que permiten conocer características básicas destacan el análisis proximal y elemental. El análisis proximal posibilita obtener de manera general su composición mientras que el análisis elemental obtiene información de la composición mineral y química de forma detallada. Otro análisis de importancia es el contenido energético que se mide mediante el poder calorífico el cual representa el calor desprendido de la combustión completa de la biomasa. También los valores del contenido de celulosa, hemicelulosa y lignina son relevantes (Puente Urbina, 2022).

El método más utilizado para caracterizar las biomásas es a través de un análisis proximal, incluye el contenido de humedad, compuestos volátiles, cenizas, carbohidratos, proteínas y grasas (Manals-Cutiño et al., 2019). El conocimiento de las características de la biomasa

estudiada del brócoli, permite diferenciarlos de otros tipos de biomasa con similares características, prever su comportamiento en tratamientos o equipos aplicados a lo largo de la investigación, o realizar aproximaciones del rendimiento de sus productos.

Las metodologías aplicadas para el pretratamiento de la biomasa lignocelulósica tienen como finalidad obtener un material compuesto principalmente de componentes como la celulosa, hemicelulosa y lignina en cantidades variables según la disponibilidad de la materia prima (Guarnizo et al., 2009). Se clasifican en pretratamientos físicos, químicos, físico químicos y biológicos (empleados en matrices de biomasa complejas) (Zhao et al., 2017). Estas deben cumplir con ciertos requisitos como evitar la degradación de los carbohidratos a formas no fermentables o tóxicas para la levadura (hidroximetilfurfural), y se debe minimizar los costos energéticos para que resulte económicamente rentable, al mismo tiempo, debe ser amigable con el ambiente (Guarnizo et al., 2009).

Los métodos más empleados son la hidrólisis ácida y básica, el blanqueo con ozono y peróxido, explosión de vapor, solventes orgánicos, disolventes, asistido por ultrasonido y combinaciones de los mismos (Abolore et al., 2023). Estos procesos suelen verse afectados por diversos factores como temperatura, presión, duración, agitación, pH, entre otros, por lo tanto, su eficiencia y calidad de la extracción de los componentes deseados dependen de estos factores, que se deben controlar y optimizar cuidadosamente (Pinto et al., 2022). Entre los beneficios que se presenta en la biomasa al aplicar este tipo de pretratamiento se encuentran la ruptura de la barrera de la lignina y el aumento de la superficie disponible para futuras reacciones químicas, microbianas y enzimáticas (Abolore et al., 2023).

2.2.7 Biomasa como fuente de obtención de energía

El dióxido de carbono (CO_2) se clasifica como uno de los principales gases de efecto invernadero responsables del calentamiento global. La combustión de combustibles fósiles es una de las principales fuentes de emisiones de CO_2 . Las emisiones globales de CO_2 originadas por la combustión de energía y procesos industriales experimentaron un aumento del 0,9%, equivalente a 321 millones de toneladas, durante el año 2022, alcanzando un récord de 36,8 Gt (mil millones de toneladas). Esta evaluación se basa en un análisis exhaustivo que realiza la Agencia Internacional de Energía (IEA), y que abarca un estudio detallado a nivel regional y según el tipo de combustible, el crecimiento a lo largo de los años desde 1900 hasta el 2022 que se presenta en la Figura 3. En la actualidad, estas emisiones incrementan el interés de la comunidad científica por resolver esta problemática medioambiental mediante alternativas sustentables, entre las cuales se destaca el uso de biomasa (AIE, 2022).

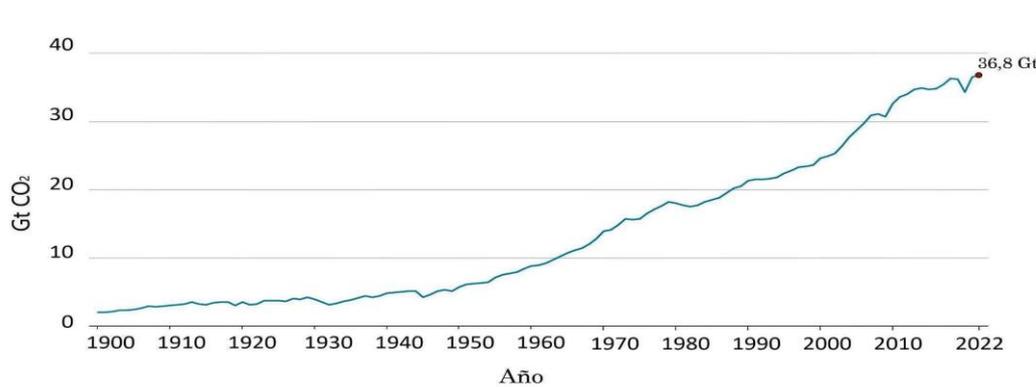


Figura 3. Emisiones globales de CO₂ procedentes de la combustión de energía y procesos industriales, 1900-2022. **Fuente:** (Agencia Internacional de Energía [AIE], 2022).

La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO, 2020) menciona la existencia de diversos procesos para producir energía a partir de la biomasa que van desde lo más simple hasta lo más complejo dependiendo del producto que se va a obtener. El desafío de esta alternativa para obtener energía, proviene de la cadena de suministro de materia prima, como ya se mencionó anteriormente, su bajo valor económico, su naturaleza variable y sus operaciones logísticas son desventajas que se necesitan optimizar para una producción rentable (Nunes et al., 2020).

La biomasa húmeda se puede transformar en biomasa seca, y viceversa, a través de pretratamientos que la adapten a las necesidades particulares, pero se debe tener en cuenta que el rendimiento energético se ve afectado negativamente a medida que se emplean más pretratamientos (Manrique, 2017). Mediante diversos métodos de conversión, detallados más adelante, es posible obtener diferentes formas de energía a partir de la biomasa incluyendo la eléctrica, la térmica mediante la combustión directa y la mecánica a través de biocarburantes o biocombustibles aplicados en motores de combustión interna (Roldán Vilorio, 2013).

2.2.8 Tecnologías aplicadas a la biomasa para la obtención de energía

Para la conversión de la biomasa en energía se utilizan diversos métodos de transformación que son aplicables a cualquier biomasa, pero se subdivide en tres categorías: termoquímicas, bioquímicas, y fisicoquímicas. Las termoquímicas se producen aplicando calor y procesos químicos, las bioquímicas descomponen la biomasa a través de agentes biológicos como bacterias, enzimas, levaduras, entre otros y los físicos químicos que emplean procesos como la esterificación y transesterificación para la producción de biocombustibles de alta calidad (Tursi, 2019). Los procesos, aplicaciones y/o productos de cada tipo de tratamiento se presentan en la Figura 4:

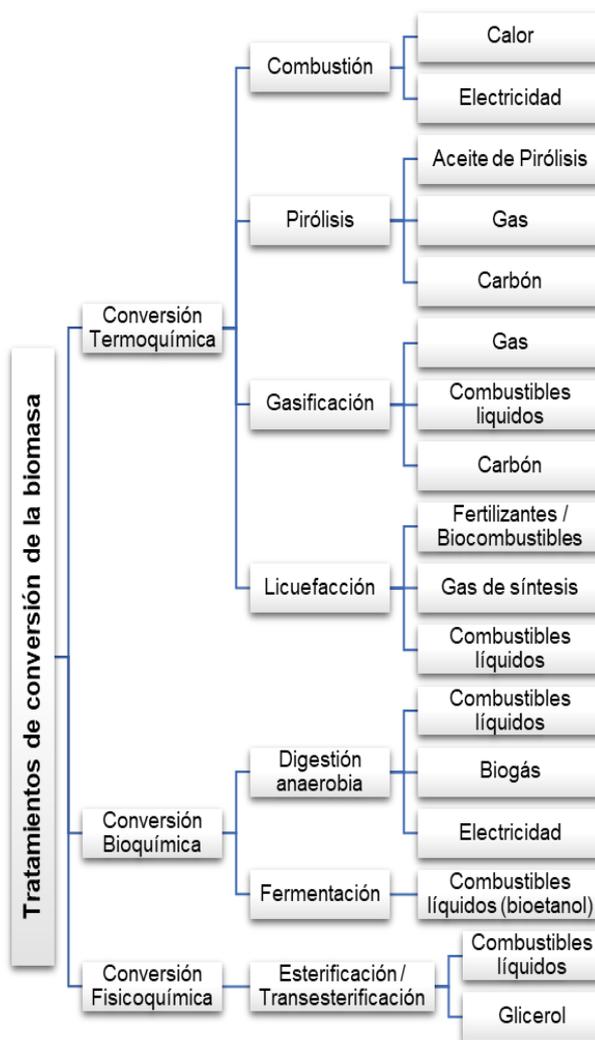


Figura 4. Procesos o tratamientos de conversión de la biomasa. Adaptado de: (Tursi, 2019).

2.3 Brócoli

2.3.1 Generalidades

El brócoli cuyo nombre científico es *Brassica oleracea* var. *Itálica* pertenece a la familia Brassicaceae (Cruciferae) la cual está compuesta de 372 géneros y 4060 especies (Yeşilyurt, 2023). Dentro de la familia Brassicaceae, se destacan seis especies que predominan por su importancia a nivel económico, por sus semillas oleaginosas, condimentos u hortalizas y consta de tres especies diploides (*B. rapa*, *B. nigra* y *B. oleracea*), que mediante hibridaciones da lugar a las tres especies alotetraploides (*B. napus*, *B. juncea* y *B. carinata*) (Koh et al., 2017). Es una planta cultivada por el contenido de nutrientes presentes en el mismo. La mayoría de las variedades de brócoli alcanzan su madurez en un lapso de 60 a 70 días después de su siembra (Ghimire et al., 2023).

Su nombre proviene del término italiano “broco” y su traducción significa brote o retoño, lo cual hace referencia a su parte comestible (Epigmenio, 2013). Esta hortaliza surge a partir de la col salvaje (planta silvestre que dio lugar a la coliflor, col, col de Bruselas entre otras especies), en países del Mediterráneo y del continente asiático. La introducción del brócoli a los Estados Unidos se realizó por italianos en 1806 y en 1920 se convirtió en una planta comestible muy conocida (Ortiz Huamani, 2019).

Debido a su adaptabilidad, su cultivo se extiende en todos los suelos del mundo que cumplan con las mínimas condiciones necesarias para su crecimiento, es decir, un ambiente adecuado y un suelo lleno de minerales, los cuales se absorben por la planta, y que posteriormente, aportan un gran valor nutricional y grandes beneficios a sus consumidores, como su capacidad de combatir el cáncer y enfermedades cardiovasculares (Keck & Finley, 2004).

2.3.2 Producción y consumo mundial

El brócoli es una de las hortalizas más consumidas del mundo, como se refleja en su incremento en las producciones mundiales en la Figura 5, los países con los mayores volúmenes de consumo en 2019 (combinada con la producción de coliflor), son China con 11 millones de toneladas con un valor de 9 mil millones de dólares; en India con 9,2 millones de toneladas valorado en 6 mil millones de dólares y Estados Unidos con 1,2 millones de toneladas por 1,6 mil millones de dólares; estos países representan el 78% de consumidores mientras que México representa el 1,9% (IndexBox, 2020).

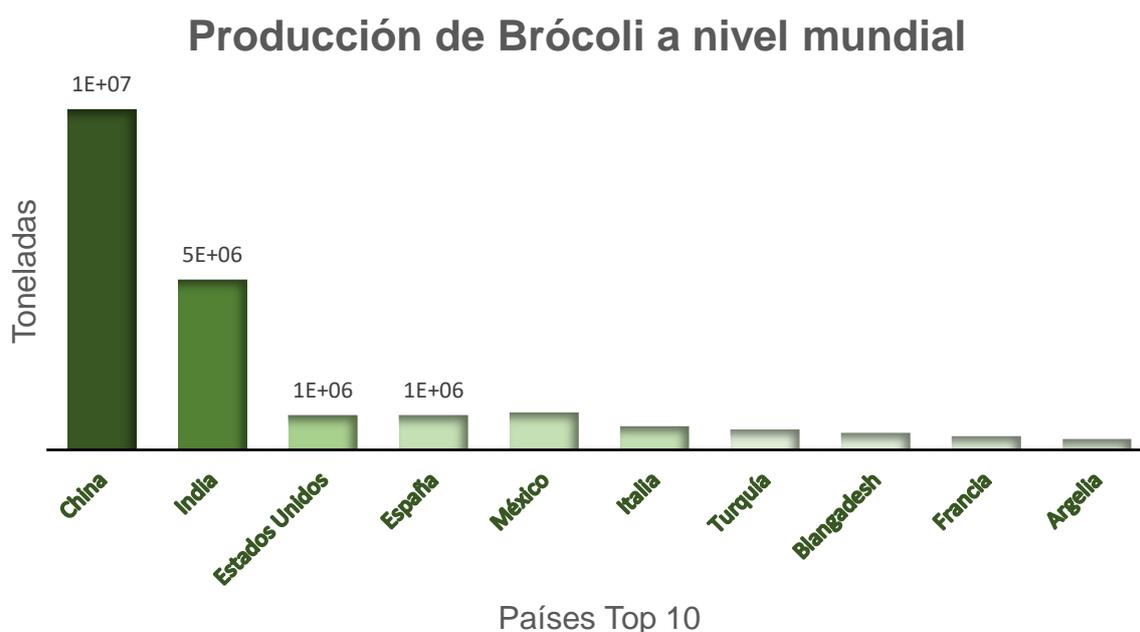


Figura 5. Producción de brócoli por diferentes países en 2020 (top 10). Fuente: (Yan et al., 2023).

La producción global en 2020 alcanzó los 25,53 millones de toneladas, liderada por China con 9,55 millones de toneladas, seguida por India y Estados Unidos, cada uno con más de 1 millón de toneladas (Yan et al., 2023). Según la base de datos *Market Data Forecast* el mercado del brócoli (combinado con el de la coliflor) se calcula en 23,1 mil millones de dólares y se estima un crecimiento anual con una tasa compuesta de 4,19% durante los años 2022 a 2027 (Market Data Forecast [MDF], 2023).

2.3.3 Producción en el Ecuador

La producción del brócoli en el Ecuador en el año 2021 alcanzó más de 129 mil toneladas, de las cuales se exportan 89 mil toneladas por un valor de 150 millones de dólares, esta representa el 2% de las exportaciones agrícolas de ese año, su cultivo cubre alrededor del 3% de la superficie de cultivos temporales en la región Sierra. El cultivo de brócoli es uno de los commodities más representativos en el comercio internacional del sector agrícola en el Ecuador, sus principales destinos durante los últimos años son Japón y Estados Unidos con 40% y 32% respectivamente (MAG, 2021). Según la Federación Ecuatoriana de Exportadores (Fedexpor, 2022) en el Reporte Estadístico de Comercio Exterior, las importaciones que Japón realiza a Ecuador aumentaron un 23%, sumando 74 millones de dólares.

Durante los últimos años se evidencia un auge en la región andina del país, su crecimiento puede observarse en la Figura 6, a causa de las numerosas hectáreas de brócoli que se cultivan en haciendas, la mayoría ubicadas al sur de Quito, para cinco grandes industrias transnacionales que exportan el brócoli congelado (Le Gall, 2009). Actualmente, gracias al aumento en su producción y su posterior consolidación en el mercado del brócoli en el Ecuador, apoya al sector económico significativamente y genera fuentes de empleo en las provincias de mayor producción (Vélez Duque & Álava Murillo, 2021).

En el último siglo, Ecuador ocupa el tercer lugar entre los principales exportadores de brócoli congelado a Europa y el noveno lugar de brócoli fresco a nivel mundial. El proceso desde el cultivo hasta su transformación generó más de 11.500 puestos de trabajo dentro del país, y se estima que sostiene a unas 4.000 familias ecuatorianas (Asociación de Productos Ecuatorianos de Frutas y Legumbres [Aprofel], 2003, como se citó en Le Gall, 2009).

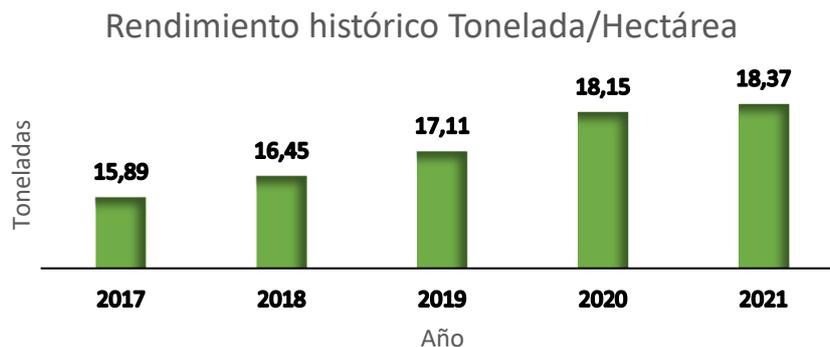


Figura 6. Hectáreas de Brócoli cultivado en el Ecuador. Fuente: (MAG,2021).

2.3.4 Superficie cosechada y Rendimiento de la producción

De acuerdo al ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG) y el Instituto Nacional de Estadísticas y Censos (INEC), en el 2021 el brócoli forma parte de los principales cultivos que se siembran en el Ecuador, ocupa una cantidad de superficie aproximada para las plantaciones que ronda las 9.089 hectáreas, 8.725 hectáreas de superficie por cosecha y un rendimiento 15,50% de toneladas por hectárea, produce una cantidad de 135.259 toneladas de producto anualmente (Sistema de Información Pública Agropecuaria del Ecuador [SIPA], 2021).

2.3.5 Zonas de producción

Debido a su posición geográfica estratégica, el Ecuador cuenta con una ubicación única. Las plantaciones se ubican en áreas donde reciben una amplia exposición a la luz solar directa. Su producción se concentra en la región Sierra del país, en donde se produce el 99% de brócoli, principalmente en 6 provincias del Ecuador, como se observa en la Figura 7. En Azuay, su uso es para consumo interno y se mantiene estable en los últimos años (MAG, 2021).

ÁREAS DE PRODUCCIÓN DE BRÓCOLI EN ECUADOR

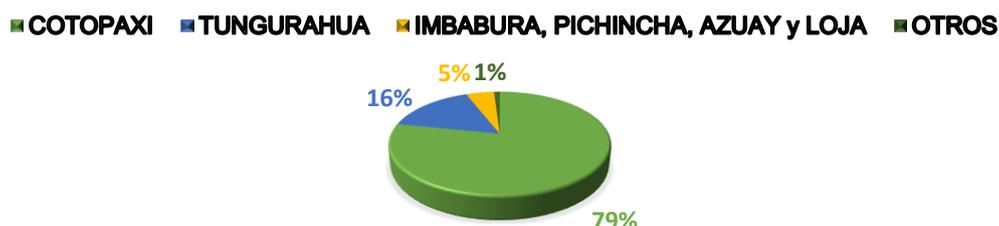


Figura 7. Áreas de Brócoli cultivadas en el Ecuador. Fuente: (MAG,2021).

Entre las empresas que predominan el mercado del brócoli congelado que se destina para la exportación se encuentran Provefrut, Padecoza IQF, Ecofroz, Pilvicsa y Valled Foods. Además, se estima que los dos tercios de la producción de brócoli proviene del 7% de productores cuyas haciendas contienen terrenos de cultivo mayores a las 100 hectáreas, lo que quiere decir que el 93% que representan a medianos y pequeños productores producen un tercio del total del país (Le Gall, 2009).

2.3.6 Variedades de brócoli en el Ecuador

Entre las variedades de brócoli que más se utilizan en el Ecuador según Santillan, J. (2021) están Avenger, Legacy, Marathon, Coronado y Domador. Se nombran otras especies híbridas como Shogún, Patriot, Arcadia, Samurai, Ninja y Vikingo, todas estas especies se diferencian en sus características físicas como en su coloración, tamaño de planta, tamaño del gránulo del florete y período de madurez (Vallejo López, 2013). Las más relevantes son el brócoli Legacy (presenta mayor cantidad de cabezas homogéneas, grandes tallos y buena calidad grano liso, apto para cultivos en la Sierra y de buena rentabilidad), Domador (cabeza compacta de grano fino, coloración verde oscuro, adaptable a 1.700 a 2.750 m.s.n.m.) y Marathon (color azul verdoso, cabeza grande de gránulos finos a intermedio, adaptable al clima de zonas intermedias y frías) estas características dan a estas variedades la importancia en su cultivo (Agroactivo, 2023). Las más representativas se encuentran en la Figura 8.

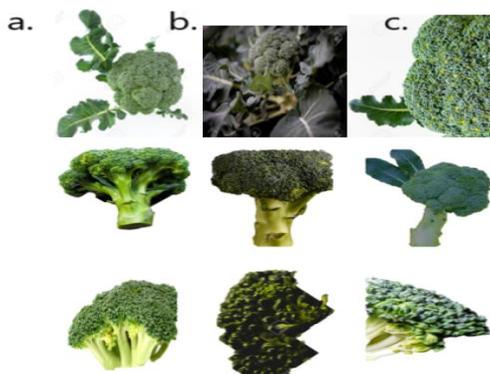


Figura 8. Variedades de Brócoli: a. Legacy, b. Domador y c. Marathon. **Fuente:** (Variedades Del Brócoli Imágenes y Fotos, 2023).

2.3.7 Estructura y Morfología

Su gran consumo se debe en gran parte a causa de su estructura y morfología del cultivo, que contiene varias partes distintivas que contribuyen a su apariencia y función general. La planta de brócoli consta del florete, hojas, tallo y raíces. Esta planta se caracteriza por tener una inflorescencia con forma de un florete con cabeza compacta y comestible de color verde,

sostenido en un tallo, cuyo crecimiento es limitado por la misma y presenta unas pocas ramificaciones con inflorescencias secundarias ubicadas en los nudos superiores. Su diámetro y altura varían aproximadamente entre 2 a 6 cm y 20 a 50 cm, respectivamente (Toledo, 2003). A continuación, se describe la morfología de cada parte del cultivo:

2.3.7.1 Florete. La inflorescencia tipo pella puede llegar a medir 20 cm de diámetro y pesar hasta 2 kg, está presente en forma granulada y se compone de numerosos brotes florales del brócoli de tamaño pequeño, conocidos como floretes, los cuales se encuentran unidos al tallo mediante un pedúnculo, estos se recolectan antes de que se desplieguen completamente. El momento óptimo para la cosecha comercial de brócoli es cuando las cabezas están firmemente compactas, momento en el cual tienen un color verde oscuro y brillante (Ghimire et al., 2023; Toledo, 2003).

2.3.7.2 Flores. Si se permite que la planta del brócoli madure completamente, los brotes florales se abrirán en pequeñas flores amarillas perfectas y actinomorfas, típicas de la familia Brassicaceae. Estas flores son cruzadas y tienen cuatro pétalos en forma de cruz, a esto se le atribuye su antiguo nombre de la variedad Cruciferae. Su polinización se realiza por vía cruzada, mediante insectos como las abejas y moscas (Borja Martínez, 2023; Toledo, 2003).

2.3.7.3 Tallo. El tallo es largo y cilíndrico, donde nacen las hojas y la parte superior sostiene el florete, su grosor puede variar dependiendo de su estado de maduración siendo delgado cuando es joven y grueso si este ya ha pasado el límite de madurez para el consumo (Borja Martínez, 2023).

2.3.7.4 Hojas. En los nudos del tallo del brócoli se encuentran las hojas estas se encuentran entre 15 a 30 hojas grandes, que presentan una silueta ondulada con peciolo alargado, limbo profundamente lobulado, un tamaño aproximado de 30 cm de ancho y 50 cm de largo, suelen tener bordes dentados y marcadas nervaduras de color blanco. Además, en su superficie cuentan con una cutícula cerosa impermeable (Borja Martínez, 2023; Toledo, 2003).

2.3.7.5 Raíz. Según Toledo (2003) describe a la cabellera ramificada de raíces que se extienden en el suelo del brócoli como: “el sistema radicular es pivotante y leñoso. La raíz primaria puede profundizar hasta 0,8 m en el perfil del suelo y generalmente se pierde durante la extracción del almácigo.” (p. 10)

2.3.7.6 Fruto. El fruto de esta hortaliza es una silicua que contiene más de 10 semillas que son liberadas espontáneamente cuando la planta alcanza la madurez. Estas

semillas tienen forma esférica con un diámetro de 2 mm y de coloración entre marrón y rojizo (Toledo, 2003).

2.3.8 Propiedades nutritivas y prebióticas

Según la escala de ANDI (Aggregate Nutrient Density Index) en el año 2022 se encuentra dentro de los 20 mejores alimentos por la relación de las calorías frente a las vitaminas, minerales y fitonutrientes medidas por esta escala (Cuesta & Fusari, 2022). Esto se debe a que su parte comestible aporta diferentes compuestos bioactivos a la salud como carotenoides, esteroides vegetales, vitaminas (A, B6, B12, C, D, E, K, tiamina, riboflavina, niacina, ácido fólico) principalmente C o K, minerales antioxidantes (calcio, potasio, sodio, fósforo y pequeñas cantidades de zinc, selenio, hierro, magnesio y manganeso) y fibra (Vélez Duque & Álava Murillo, 2021). Los valores de estas propiedades del florete se ven reflejadas en la Tabla 1.

Tabla 1. Composición nutricional del florete en 100 gramos de brócoli. **Fuente:** (Zamora, 2016).

Nutriente	Valor
Agua (%)	91
Energía (kcal)	28
Proteína (g)	3.0
Grasa (g)	0.4
Carbohidrato (g)	5.2
Fibra (g)	1.1
Ca (mg)	48
P (mg)	66
Fe (mg)	0.9
Na (mg)	27
K (mg)	325
Vitamina A (UI)	1542
Tiamina (mg)	0.07
Riboflavina (mg)	0.12
Niacina (mg)	0.64
Ácido ascórbico (mg)	93.2
Vitamina B6 (mg)	0.16

Las propiedades prebióticas del brócoli hacen de ella una de las plantas de cultivo de gran interés pues favorecen en la salud humana, inhibiendo el crecimiento tumoral dando lugar a la muerte de células cancerígenas, impidiendo la aparición de enfermedades cardiovasculares o neurodegenerativas, la diabetes y la anemia, también actúa como antioxidante, desintoxicante celular y actividad antimicrobiana, y esto se debe al contenido de compuestos anticancerígenos denominados glucosinolatos. (Cuesta & Fusari, 2022; Zamora, 2016)

Los compuestos bioactivos del brócoli se describen en la Tabla 2, en donde los glucosinolatos son compuestos que contienen nitrógeno y azufre (Langston et al., 2023). Tienen propiedades antioxidantes, antitumorales y cardioprotectores. Los compuestos fenólicos son antioxidantes que pueden evitar enfermedades cardiovasculares (Cuesta & Fusari, 2022).

Esta planta contiene enzimas llamadas mirosinas producidas por la hidrólisis enzimática de las B-Glucosidasas y como consecuencia se forman los isotiocianatos en altas concentraciones siendo tóxicas para insectos o microorganismos. Por ello resulta de interés su uso como pesticidas naturales (Cuesta & Fusari, 2022).

Tabla 2. Compuestos bioactivos del brócoli. **Fuente:** (Cuesta & Fusari, 2022; Golli et al., 2023).

Compuestos Bioactivos	Derivados
Glucosinolatos	Glucorafanina, Glucobrasicina.
Isotiocianatos	Sulforafano, Indol-3-Corbinol.
Compuestos Fenólicos	Flavonoides (quercetina, kaempferol y rutina son los más abundantes en el brócoli), antocianos, ácidos hidroxicinámicos.

Los metabolitos bioactivos del glucosinolato (isotiocianatos) en la quimioprevención, la neuroprotección, y tratamiento del síndrome metabólico hacen de la estructura de este alimento un tema a estudiar con minuciosidad en los últimos años (Langston et al., 2023). Pero al ser el objeto de estudio las partes no consumidas de la planta de brócoli, las partes como el tallo y las hojas principalmente, debido a que abarcan la mayor cantidad de biomasa de la planta (70%), y al poseer distintas características de composición del florete, se detalla sus características nutricionales con su valor en la Tabla 3.

Tabla 3. Composición nutricional de las hojas y tallos en 100 gramos de brócoli. **Adaptado de:** (Rodríguez & Rojas, 2022).

Características Nutricionales	Brócoli	
	Hoja	Tallo
Energía (Kcal)	50,9	29,8
Carbohidratos disponibles (g)	9,0	6,3
Materia grasa (g)	0,5	0,1
Proteínas (g)	2,5	1,0
Azúcares totales (g)	1,2	1,2
Sodio (mg)	5,5	49,38
Fibra dietética total (g)	10,4	8,3
Fibra dietética soluble (g)	1,9	1,3
Fibra dietética insoluble (g)	7,9	6,8
Humedad (g)	76,3	82,5
Cenizas (g)	1,3	1,8

2.3.9 Composición química

El brócoli presenta ciertas características fisicoquímicas y bioquímicas propias de la hortaliza, que difieren ligeramente entre especies, debido a factores propios de la variedad o mezcla de variedades en el caso de los híbridos, las condiciones climatológicas de la zona de cosecha y los fertilizantes a utilizar (Wadmare et al., 2019). Pero al no ser significativas aquellas diferencias se emplea la información de brócoli fresco descrita en la Tabla 4, que presentan los siguientes resultados:

Tabla 4. Composición química aproximada del brócoli fresco. **Adaptado de:** (Wadmare et al., 2019).

Parámetros	Valor promedio (%)
Humedad	86.36
Grasa	0.37±0.01
Proteína	4.98±0.02
Carbohidrato	5.59±0.12
Fibra Cruda	89.53±0.20
Ceniza	1.3±0.2

En comparación a estudios realizados por Albán y Velásquez (2019) presentados en la Tabla 5, los residuos de brócoli no presentan una diferencia en las composiciones químicas que tienen en común en la Tabla 4 del brócoli fresco; pero estos al ser la materia prima utilizada en esta investigación, se utilizarán de referencia los siguientes datos.

Tabla 5. Composición química de residuos de brócoli. **Adaptado:** (Albán & Velásquez, 2019).

Parámetros	Valor (%)
Proteína	2.27
Humedad	92.00
Grasa	0.35
Cenizas	1.49
Carbohidratos	3.89
Fibra Cruda	2.23

No obstante, sus propiedades cambian en operaciones de conversión de productos, tal es el caso en la producción de harina, sus propiedades cambian debido a los procesos de secado,

por las temperaturas de calentamiento, perdiendo agua libre en el proceso y la desintegración de algunos compuestos volátiles presentes en su interior, como se puede ver en los resultados de la Tabla 6.

Tabla 6. Propiedades fisicoquímicas y bioquímicas de las harinas de florete, tallos, hojas. **Adaptado de:** (Campas-Baypoli et al., 2009).

Propiedades	Florete	Tallos	Hojas
Proteína (g/100g peso seco) ^a	22.41±0.41	12.13±0.71	8.76±0.71
Ceniza (g/100g peso seco) ^a	7.87±0.12	14.67±0.21	9.24±0.34
Grasa (Lípidos totales) (g/100g peso seco) ^a	4.59±0.35	6.72±0.21	6.58±0.44
Carbohidratos totales (g/100g peso seco) ^b	65.13	66.48	75.42
Fibra cruda (g/100g peso seco) ^a	11.65±0.24	12.83±0.36	15.74±0.77
Índice de absorbancia de agua (g gel/g sólidos) ^c	7.26±0.24	13.04±0.59	15.64±0.75
Índice de solubilidad al agua (g sólidos/g sólidos originales) ^c	40.57±0.87	28.5±1.21	24.35±0.97
Índice de tamaño de partícula ^c	54.47±2.00	62.37±1.16	44.30±3.47
pH ^c	5.18±0.03	5.31±0.05	5.47±0.03

Nota: ^a datos expresados con desviación estándar de 5 ensayos por triplicado, ^b Carbohidratos totales = 100 - Σ (Proteína +Ceniza +Grasa), ^c datos expresados con desviación estándar de 3 ensayos por triplicado.

2.3.10 Potencial de los residuos de brócoli a nivel mundial

El florete de brócoli, se exporta congelado para preservar sus propiedades naturales y se utiliza en diversas aplicaciones, como infusiones de té, sazónadores y concentrados. Su composición nutricional es similar al brócoli residual, con carbohidratos (55,7%), fibras (32,6%-36,5%), proteínas (23,2%-25%), y fitonutrientes. Los residuos de esta hortaliza son abundantes en toda la cadena alimentaria y se analiza anualmente por su potencial crecimiento en el mercado, se tiene pérdida en varios sectores y etapas a lo largo de los años, como se observa en la Figura 9, que presentan los datos de Australia con una pérdida de hasta 65% (FAO, 2022).

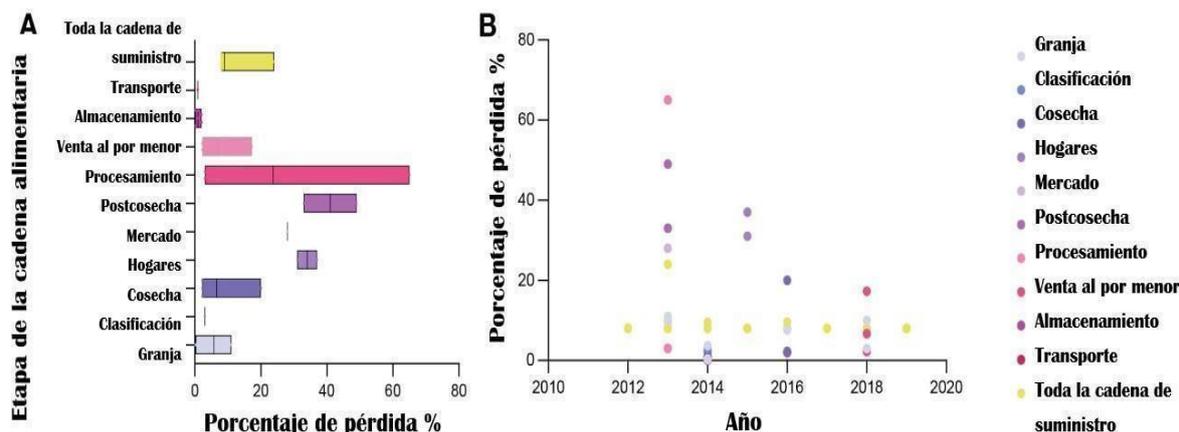


Figura 9. Porcentaje de pérdida de brócoli en diferentes pasos de 2012 a 2019. *Adaptado de:* (Yan et al., 2023).

Nota: (A) Porcentaje de pérdida de brócoli en diferentes etapas. (B) Porcentaje de pérdida de brócoli en diferentes años.

Estos residuos se pueden aprovechar para la fabricación de alimentos, la producción de biocombustibles (bioetanol y biodiesel) mediante extracción de azúcares, alimentos para animales, obtención de extractos, y otros usos, promoviendo una producción circular con cero residuos. Cabe destacar que alrededor del 70% de la planta es residual después de la cosecha, ya que al exportar y consumir generalmente solo el 30% se aprovecha (Cuesta & Fusari, 2022; Instituto de Promoción de Exportaciones e Inversiones [PRO ECUADOR], 2018; Soto-Romo et al., 2023).

2.3.11 Procesos de Extracción y Obtención de Productos de Valor Añadido

Existen varios estudios sobre el procesamiento de residuos agroindustriales, sin embargo, específicamente de residuos de Brócoli las investigaciones son limitadas, el interés de mejorar estos procesos para que sean económicamente viables tiene especial relevancia en la actualidad. Se pueden obtener extractos para tratamientos postcosecha (Damas-Job et al., 2023), y alternativas que incluyen producción de compost, alimento balanceado, biofumigantes y fertilizantes (Cuesta & Fusari, 2022). Además, otros estudios sugieren beneficios para la salud, como su contribución a la prevención de los síntomas graves de COVID-19 (Bousquet et al., 2021); y la extracción de compuestos bioactivos con aplicaciones en medicina, cosmética y nutracéutica (Borja Martínez, 2023; Keck & Finley, 2004). En biorrefinerías y producción de bioetanol a partir de tallos de brócoli (Soto-Romo et al., 2023), mientras que la producción polvo de hoja de brócoli (Krupa-Kozak et al., 2019) es otra opción viable.

En la presente investigación, se da un enfoque en la etapa de pretratamiento para optimizar la eficiencia en la obtención de azúcares como materia prima para biocombustibles

específicamente para la producción de bioetanol y emplear su potencial para subproductos alimentarios con la elaboración de harina mediante liofilización a partir de estos residuos.

2.4 Obtención de Azúcares

2.4.1 Pretratamiento de la biomasa

El pretratamiento de la biomasa es la etapa inicial del proceso de conversión de la biomasa en biocombustible, en esta etapa se mejora la biodigestibilidad del material y su accesibilidad enzimática, modifica la estructura y composición química de la biomasa lignocelulósica de manera que se simplifiquen sus componentes, se elimine la lignina, se conserve la hemicelulosa y se reduzca la cristalinidad de la celulosa, facilita que los ácidos o enzimas puedan acceder con facilidad a la biomasa y descomponerla en monómeros mediante la hidrólisis, tienen el efecto de aumentar la superficie y la porosidad de la biomasa (Espinosa Negrín et al., 2021). Los principales pretratamientos tradicionales que se aplican a la biomasa lignocelulósica son físicos, químicos, físico químicos, biológicos o su combinación, otros métodos son aquellos que se basan en solventes más limpios (Gorozabel et al., 2022). La efectividad del pretratamiento a usar depende del producto final que se desea obtener. El pretratamiento adecuado permite obtener un rendimiento ideal de carbohidratos óptimos para procesos de fermentación, ventajas como la velocidad o el rendimiento o desventajas como la formación de sustancias inhibitoras dependiendo del tipo, en el desarrollo del proceso de producción del producto final (Malik et al., 2022). Los tipos de pretratamientos que se mencionan se presentan en la Figura 10.

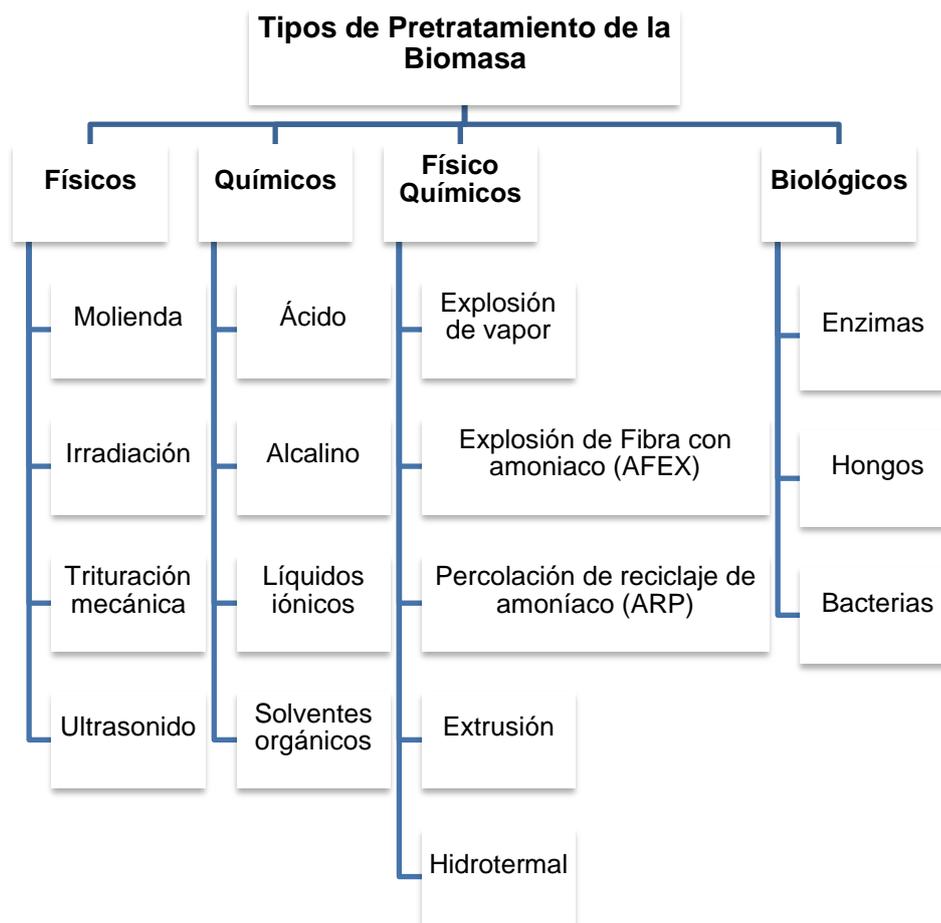


Figura 10. Tipos de pretratamiento de la biomasa. **Adaptado de:** (Espinosa Negrín et al., 2021).

2.4.2 Hidrólisis

La hidrólisis de la biomasa es fundamental en la formación de azúcares, al hidrolizar a la biomasa lignocelulósica bruta en productos intermedios, es más sencillo realizar una transformación química o biológica (Świątek et al., 2020).

2.4.2.1 Hidrólisis ácida. Este proceso elimina la hemicelulosa de la biomasa mediante el uso de soluciones ácidas diluidas o concentradas para la producción directa de azúcares monoméricos, tanto de celulosa como de hemicelulosa dependiendo de las condiciones del proceso, emplea reactores resistentes a la corrosión. El uso de ácidos concentrados tiene la desventaja de producir grandes cantidades de residuos de neutralización por tanto el uso de soluciones diluidas previene la degradación de azúcares y la formación de inhibidores como el hidroximetilfurfural o el furfural (Liao et al., 2020). Los factores que se pueden controlar en la hidrólisis ácida pueden ser, el tiempo y temperatura, como emplea Gundupalli & Bhattacharyya (2019) con tiempos de reacción cortos y temperaturas altas o tiempos de reacción mayor con temperaturas más bajas, que al aplicarse en diferentes

biomasas lignocelulósicas muestran una diferencia significativa en el rendimiento de sacarificación, al añadir otros factores como la concentración de la biomasa y la concentración del ácido, son cuatro factores que se experimentan en varios estudios con este tipo de biomasa, se citan algunos en la Tabla 7.

Tabla 7. Datos experimentales usados y adaptados en diferentes estudios para la hidrólisis ácida.

T	CB	CA	t	Autor y Año	Artículo
150	1.84	0,54	90	Sigüencia, J. Soler, J. & Menéndez, M. (2018)	Hidrólisis ácida de cascarilla de arroz para la generación de azúcares reductores.
120	10	3,26	90	Suárez Rumiche, J. A., Castillo Valdiviezo, A., & Souza Najar, R. I. (2021).	Obtención de azúcares reductores por hidrólisis ácida a partir de un consorcio de microalgas amazónicas cultivadas en agua residual.
125	2.5	0.5 y 0.75	30	Sánchez Orozco, R., & Vázquez Velázquez, J. (2017)	Hidrólisis de residuos de naranja para la obtención de carbohidratos fermentables.
120	-	2	90	Gutiérrez, J. A., Reyes, H., & Castañeda, J. F. (2017).	Análisis fisicoquímico de las hojas de eucalipto camaldulensis y su hidrolizado, como sustrato en la producción de xilitol.
60	5	-	60	Santos Tanamachi, K., Alvarado Ahedo, N. C., Gárate Ruiz, J. R., Restrepo Elorza, M. del P., González Guerra, G. M., Gómez Castro, F. I., & Hernández Castro, S. (2022).	Revaloración de residuos de fruta y verdura para la producción de biocombustibles.
121	0.5	0.5	30	Vargas Rico, M. P., Díaz Rodríguez, A. G., Manríquez Zúñiga, A. N., Martínez Iñiguez, F. G., de la Cruz Bosques, A., Arenas Grimaldo, C., & Molina Guerrero, C. E. (2022)	Evaluación de la producción de azúcares fermentables usando residuos de hojas de brócoli.

Nota: T= Temperatura en Celsius, CB= Concentración de biomasa en % peso/volumen, CA= Concentración de ácido en % volumen/volumen, t= Tiempo en minutos.

2.4.2.2 Hidrólisis enzimática. La hidrólisis enzimática es un proceso de reacción catalítica en donde se usan enzimas principalmente celulasas y hemicelulasas, producidas por bacterias y hongos. Las enzimas que se utilizan en la sacarificación son las celulasas que consisten de tres tipos de enzimas endoglucanasas, celobiohidrolasas y β -glucosidasas que actúan en conjunto (Yang et al., 2011). “Las endoglucanasas se encargan de hidrolizar los enlaces β -(1,4) glucosídicos para generar extremos de cadena no reductores; las celobiohidrolasas actúan sobre los extremos no reductores y reductores hidrolizando cadenas cortas de celulosa, liberando celobiosa y las β -glucosidasas hidrolizan la celobiosa y oligosacáridos pequeños a glucosa” (Arismendy et al., 2019, p. 65). La enzima comercial *Cellic Ctec2*, contiene celulasas, β -glucosidasas y hemicelulasas, se utiliza en la investigación de biocombustibles, para convertir los carbohidratos de biomasa lignocelulósicas en azúcares simples antes de la fermentación (Sinche Arias et al., 2022). El pretratamiento de la biomasa es fundamental para la hidrólisis enzimática, debido a que prepara el sustrato para las enzimas. Las condiciones óptimas para este tipo de enzima incluyen un pH de 4,5 a 5 y una temperatura de 45°C a 50°C, con control de pH y tiempo de reacción. Mayor cantidad de enzimas implica mayor actividad y rendimiento. La degradación de la biomasa depende de la estructura de la celulosa, el mecanismo enzimático y factores ambientales (Yang et al., 2011).

2.4.3 Cuantificación de azúcares

Los métodos de cuantificación de azúcares en investigaciones científicas abarcan tanto técnicas tradicionales, tales como espectrometría de absorción atómica y cromatografía líquida de alto rendimiento, como métodos colorimétricos que involucran reactivos como antrona, fenol, orcinol o resorcinol. Uno de los más utilizados es el método Fenol Sulfúrico para cuantificar azúcares totales, se basa en la reacción del ácido sulfúrico con carbohidratos, genera complejos coloridos que se cuantifican por espectrofotometría y simplifican la determinación de carbohidratos. La espectrometría de absorción atómica se emplea para obtener resultados cualitativos y cuantitativos mediante curvas de análisis conocidas por ejemplo con soluciones de glucosa, destaca por su alta sensibilidad, simplicidad y rapidez en la cuantificación de azúcares (López-Legarda et al., 2017; Navarro et al., 2022; Skoog, 2001).

2.4.4 Diseño experimental factorial 2^k no replicado.

El diseño factorial 2^k es una herramienta valiosa en la investigación y optimización de procesos científicos e industriales, por ejemplo, en la síntesis de nanopartículas de plata que analiza Cuervo-Osorio et al. (2020), la obtención de azúcares fermentables a partir de aserrín

de pino por; López-Miranda et al. (2009) y en la optimización de productos a base de soja por Rojas Villa et al. (2010). Para la obtención de productos de valor añadido de residuos de brócoli, se utiliza un diseño factorial 2^k no replicado, debido a que es una estrategia que recomienda Gutiérrez & De La Vara (2008) con experimentos iniciales que contienen cuatro o más factores, como en el caso de esta investigación que tiene cuatro parámetros controlables (concentración de biomasa, concentración de ácido, temperatura y tiempo) y la concentración de azúcares como variable de respuesta. El objetivo es obtener el mayor rendimiento posible en el pretratamiento de esta biomasa para su uso en la producción de biocombustibles, especialmente bioetanol.

El análisis se basa en el principio de disparidad de efectos y utiliza la Gráfica de probabilidad de Daniel para identificar interacciones significativas y despreciables. En la estimación de efectos en un diseño factorial $k=4$, se analizan los efectos individuales y combinación de factores con niveles superiores e inferiores de la Tabla 14 (Capítulo 3). Los valores significativos, que se evalúan mediante contrastes específicos, son esenciales para optimizar el rendimiento de azúcares en el pretratamiento o hidrólisis ácida. La adición de puntos centrales en el diseño factorial 2^k ayuda a estimar si se presenta curvatura en los resultados y si esta va o no a afectar en las estimaciones de efectos. Con cuatro factores ($k=4$) el contraste ABCD se representa como $(a \pm 1) (b \pm 1) (c \pm 1) (d \pm 1)$ con efectos individuales y combinados (a, b, ab, c, ac, bc, abc, d, ad, bd, abd, cd, acd, bcd y abcd) (Gutiérrez & de la Vara, 2008, Montgomery 2004).

2.5 Obtención de harina/polvo

En la industria de productos alimenticios, el mercado de productos secos experimenta una expansión significativa en los últimos años; y muchos productos se ofrecen en forma de polvo. Las investigaciones sobre las frutas y verduras secas registran una tasa de crecimiento anual del 3,3% en la mayoría de los países del mundo. Los alimentos en polvo son de especial interés para profesionales activos en la industria alimentaria porque pueden utilizarse como materia prima en la producción de otros subproductos o pueden ser el producto final en sí mismos (Oyinloye & Yoon, 2020).

2.5.1 Liofilización

La liofilización según Reale & Giner (2021) es un procedimiento físico en el cual se extrae el agua de un producto que ha sido congelado previamente. Se basa en el mecanismo de sublimación por deshidratación directa (Oyinloye & Yoon, 2020). Su finalidad es disminuir la descomposición de compuestos volátiles responsables del sabor y aroma de los alimentos, como comúnmente sucede en otros tipos de secado convencionales (Orrego, 2008). Se

fundamenta en el fenómeno de la sublimación en donde la temperatura del agua y la presión de vapor deben ser inferiores del punto triple del agua (0,01°C y 0,612 KPa) . El producto debe congelarse al reducir su temperatura, después la presión de vapor tiene que disminuir del punto triple, para recibir un aumento de temperatura en la sublimación (Bhatta et al., 2020). El proceso de liofilización produce un perfil de temperatura en tres etapas, como se visualiza en la Figura 11.

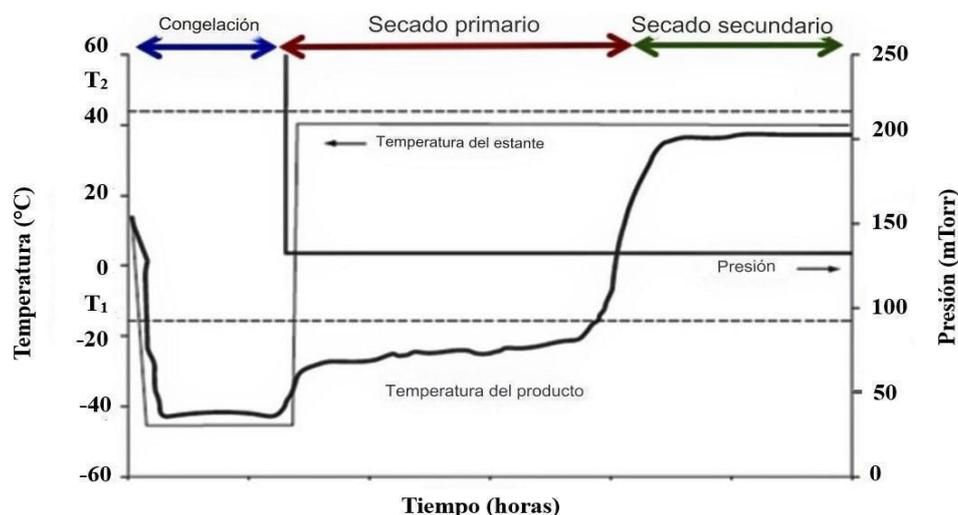


Figura 11. Perfil de temperatura del producto durante el proceso de liofilización. **Fuente:** (Bhatta et al., 2020).

Nota: T1 (línea de puntos) es la temperatura crítica y T2 (línea de puntos) es la temperatura de transición vítrea de los sólidos secos.

2.5.1.1 Etapas de liofilización. El proceso consta de un enfriamiento bajo cero y de un secado en dos etapas a través de la sublimación en la etapa de secado primario, y mediante la desorción en la etapa de secado secundario descrito en la Tabla 8. (Bhatta et al.,2020; Orrego, 2008).

Tabla 8. Etapas de Liofilización. **Fuente:** (Bhatta et al., 2020; Orrego, 2008; Oyinloye & Yoon, 2020).

Etapa	Descripción
Primera etapa	Usa estantes pre enfriados a -40°C para congelar y transportar las gotas congeladas y sublimación.
Segunda etapa	Secado primario en cámara de vacío a temperaturas entre 20°C y 50°C bajo temperatura crítica o estimación con la temperatura de transición vítrea, extrayendo el 70 - 80% del agua.
Tercera etapa	Secado secundario y desorción del agua ocluida en matriz amorfa, a veces a 50°C para mejorar la difusividad de aromas.

2.5.1.2 Aplicaciones. Es un método de mayor aplicación en alimentos que contienen compuestos térmicamente sensibles y propensos a la oxidación, compuestos sólidos con contenido de celulosa y polisacáridos, estado líquido, acuoso o emulsiones. (Bhatta et al., 2020). Se utiliza en el estudio de múltiples investigaciones para la deshidratación de frutas y verduras, para su conversión en polvo y su aplicación como materia prima en la industria alimentaria (confitería, panadería, dulces, destilería, té, pudines, colorantes naturales, cremas, aditivos, suplementos, etc.) (Oyinloye & Yoon, 2020), y alimentos especiales para astronautas (Watkins et al., 2022). Sus aplicaciones son amplias, en diferentes tipos de industria que incluyen la cosmética y la industria farmacéutica. En las cuales los requisitos para su producción son el satisfacer las necesidades nutricionales y poseer una larga duración de 1 a 5 años (Bhatta et al., 2020).

2.5.1.3 Ventajas y desventajas de la liofilización. En la Tabla 9, se describen las ventajas que son mayores que las desventajas de este proceso lo cual ratifica su uso en la industria por la calidad del producto final.

Tabla 9. Ventajas y desventajas de la Liofilización. **Fuente:** (Bhatta et al., 2020).

Ventajas	Desventajas
Estabilidad estructural, características físicas y químicas.	Tiempos largos de proceso.
Máxima retención de compuestos bioactivos y nutricionales.	Costo energético y económico alto.
Mínima reducción de volumen del producto final.	
Retiene mayor porcentaje de vitamina C y contenido fenólico.	
Facilidad de manipulación, transporte y almacenamiento.	
Larga vida útil y estabilidad microbiológica.	

2.5.2 Molienda

En la industria alimentaria, la molienda es una operación unitaria de uso común que sirve para reducir el tamaño de los materiales con el fin de crear una forma utilizable o extraer ciertos componentes. Este proceso particular emplea una amplia gama de equipos, que incluyen, entre otros, trituradoras, molinos, desintegradores, cortadores, trituradoras y homogeneizadores (Oyinloye & Yoon, 2020).

Se evalúa que el tamaño mediano de un material particulado para que pueda considerarse como polvo debe ser inferior a un milímetro. Esto asegurará que el polvo sea aceptado como

un producto de alta calidad y seguro para su consumo o uso en aplicaciones posteriores (Barbosa-Cánovas et al., 2005).

2.5.3 Caracterización Físico química

En el procesamiento de obtención de harina/polvo de tallos y hojas de brócoli, factores como el oxígeno y altas temperaturas pueden impactar negativamente los compuestos bioactivos, fenólicos, carotenoides y vitamina C (Vázquez-González et al., 2020). Para evaluar su idoneidad en aplicaciones alimentarias y de salud, es esencial determinar las propiedades fisicoquímicas, al aplicar las normas establecidas por la INEN 616 (2015); que establecen límites de parámetros como humedad (máximo 14,5%), cenizas (máximo 3,5%), proteínas (mínimo 9%), grasa (entre 19% y 24%), y fibra (mínimo 7-9%).

Tabla 10. Principios fundamentales de los métodos aplicados según la AOAC e ISO.

Parámetro	Principio Fundamental y Características
Cenizas	Incineración en mufla y gravimetría: Indica minerales e impurezas en harinas (Salvatierra Hurtado, D., 2015).
Fibra	Método con filtración intermedia: Afecta textura y sabor, importante en alimentos ayuda a mantener una dieta equilibrada y saludable (Berndtsson, 2019).
Grasas	Extracción continua Soxhlet y método gravimétrico: Cuantifica ceras, esteroides, vitaminas liposolubles (Córdova & Jácome, 2016).
Humedad	Método de sólidos totales y pérdida por secado: Afecta sabor, frescura y vida útil del producto (Ballesteros et al., 2020).
Proteínas	Método de Kjeldahl: Compuestos con nitrógeno, se aplica en varias normativas AOAC e ISO (García Martínez & Fernández Segovia, 2012).
Carbohidratos totales	Cálculo proximal: Suministran energía al cuerpo humano, cálculo de diferencia entre componentes (Salvatierra Hurtado, D., 2015).

Estos valores indican la composición nutricional y funcional de la harina de brócoli. Las normas de la “Association of Analytical Communities” o “Asociación Científica Dedicada a la Excelencia Analítica” (AOAC) y la “International Organization for Standardization” o “Organización Internacional de Normalización” (ISO) que se utilizan se especifican en la Tabla 18 (Capítulo 3) y se guían estas mediciones bajo los principios que se mencionan en la Tabla 10 (Quishpe Guanotuña, 2023).

La caracterización se compara con otros estudios que se mencionan en la Tabla 11, para evaluar su calidad y valor nutricional, permitiendo conocer su potencial en la industria

alimentaria y de suplementos. Estas evaluaciones son fundamentales para garantizar la idoneidad del polvo de brócoli que se obtiene mediante liofilización en diversas aplicaciones y la eficiencia del proceso que se aplica (Valenzuela, 2010).

Tabla 11. Valores de referencia de Análisis Bromatológico de diferentes estudios.

Producto		Análisis Bromatológico						Referencia
Harina	Técnica	%C	%Ash	%F	%G	%H	%P	
Col morada.	Horno de secado.	68,61	8,71	0,1	0,55	6,01	15,57	(Vázquez-García et al., 2023)
Rastrojo de brócoli.	Deshidratado aire caliente.	-	8,57	15,29	2,03	5,64	20,67	(Ganchala Casa, 2022)
Hojas de brócoli.	Secado al aire.	53,17	1,44	14,21	1,77	12,17	17,24	(Quishpe Mendoza, 2021)
Brócoli fresco.	Deshidratación por bandejas.	64,47	5,07	10,64	2,43	7,90	9,49	(Quishpe Guanotuña, 2023)
Brócoli fresco.	Liofilización.	63,05	5,35	12,66	1,13	6,10	11,71	(Quishpe Guanotuña, 2023)
Tronco de brócoli	Secador de bandejas.	41,34	14,93	21,20	1,68	4,31	16,55	(Valenzuela, 2010)

Nota: %C=%Carbohidratos, %Ash= %Cenizas, %F=%Fibra, %G=%Grasa, %H=%Humedad, %P=%Proteína

Capítulo 3. Metodología

El trabajo de investigación se segmentó en la obtención de dos productos. En el cual la obtención de azúcares (primer producto) se desarrolló un diseño factorial, en donde se emplearon diferentes condiciones de operación a variables controlables de la hidrólisis ácida, que se aplicó como pretratamiento de la hidrólisis enzimática, las variables fueron la temperatura, el tiempo, la concentración de biomasa y la concentración del ácido. Estos factores fueron seleccionados mediante estudios bibliográficos y ensayos preliminares por su efecto en la extracción de azúcares que fue la variable dependiente y por las limitaciones que presentó el equipo reactor Batch, posteriormente en el experimento que presentó las condiciones óptimas para el proceso se realizó la hidrólisis enzimática con la finalidad de determinar si es posible aumentar el rendimiento de azúcares, en ambos casos de hidrólisis se empleó la cuantificación de azúcares totales. Para la elaboración de la harina/polvo (segundo producto) se aplicó un proceso de liofilización a la materia prima que se trató con métodos tradicionales de conservación de alimentos para garantizar la inocuidad del producto, se realizó una posterior molienda hasta obtener una granulometría propia del producto final, además se analizó algunas propiedades bromatológicas como las cantidades de carbohidratos, proteínas, fibra, grasa humedad y cenizas. Estos análisis fueron aplicados con el propósito de determinar las características de esta harina y encontrar una o varias aplicaciones de la misma.

3.1 Tipo y Diseño de Metodología

3.1.1 Tipo de Metodología

El tipo de investigación posee un enfoque cuantitativo, por el diseño experimental que se aplicó en el proceso de hidrólisis de los residuos de brócoli, con la cuantificación de azúcares del pretratamiento ácido y en la hidrólisis enzimática y en el proceso de elaboración de harina al aplicar el análisis bromatológico al producto obtenido por liofilización. Los procesos y el análisis son métodos estandarizados por el “Instituto de Normalización Ecuatoriano” (INEN), por la AOAC y por la ISO. Además, el contexto en el cual se desarrolló la investigación fue a nivel de laboratorio debido, al acondicionamiento exhaustivo y riguroso necesario, tanto en las variables independientes aplicadas en el pretratamiento de la hidrólisis para lograr una correcta cuantificación de la variable dependiente, es decir en la cuantificación de azúcares; al controlar parámetros en la hidrólisis enzimática para el funcionamiento de la enzima que se utilizó y en las condiciones higiénico - sanitarias de la elaboración de la harina para preservar la inocuidad del producto.

3.1.2 Diseño de Metodología

Según su diseño forma parte de una metodología cuasi-experimental, en donde se manipuló en el primer proceso variables independientes seleccionadas para el tratamiento, tales como la temperatura, el tiempo, la concentración del ácido sulfúrico y la concentración de la biomasa proveniente de la materia prima; con la finalidad de encontrar el proceso que optimice el efecto que tienen con respecto a la variable dependiente que fue la concentración de azúcares totales, basándose comparación con otros estudios.

3.2 Localización del estudio

Los experimentos realizados fueron efectuados en las instalaciones del laboratorio tecnológico de la facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Cuenca, ubicado en las calles Alfonso Borrero y Lorenzo Piedra, en su laboratorio de operaciones unitarias para el pretratamiento ácido o hidrólisis ácida, el laboratorio de análisis bromatológico para la hidrólisis enzimática y la preparación de reactivos, el laboratorio de energía e ingeniería de reacciones para el proceso de cuantificación de azúcares; el laboratorio de humidificación y secado para el proceso de liofilización y en el laboratorio de conservas para medición de parámetros. En el caso de la elaboración de la harina para procesos de selección, cortado y trituración de la materia prima se utilizaron equipos y herramientas del Laboratorio de “Cocina I” de la carrera de gastronomía de la facultad de Ciencias de la Hospitalidad, ubicado en las calles Tarqui y Pio Bravo. Adicionalmente, la caracterización de la harina obtenida mediante la liofilización se realizó por analistas externos del MSV laboratorio, entidad acreditada para análisis de alimentos.



Figura 12. Localización del laboratorio tecnológico de la Facultad de Ciencias Químicas. **Fuente:** (Google Maps, 2023b).



Figura 13. Localización de la Facultad de Hospitalidad. **Fuente:** (Google Maps, 2023a).

3.3 Materia Prima

La materia prima que se utilizó en esta investigación fue la hortaliza denominada brócoli (*Brassica Oleracea* var. *Itálica*) que se adquirió en el mercado “10 de Agosto” ubicado en la ciudad de Cuenca, Ecuador. Esta ubicación fue seleccionada debido a las características presentes de la materia prima como el tamaño de los tallos largos y de grosor prominente, una cabeza compacta de grano fino, su coloración verde oscuro, estado de frescura, etc. Otro motivo fue por su fácil acceso, en cuanto al transporte y valor económico que nos brindó esta ubicación a comparación de los otros mercados de la ciudad.

De esta hortaliza fueron seleccionadas las hojas, las nervaduras foliares de las hojas y tallos en buen estado que no presentaron descomposición, plagas y/o contaminantes. La cantidad de materia prima que se recolectó fue de 6.000 gramos aproximadamente en total; de los cuales 2.170,89 gramos de residuos de brócoli fueron triturados hasta obtener 100 gramos de harina por el método de liofilización para cumplir con la cantidad necesaria para el posterior análisis bromatológico, previo a esto se realizó una prueba de rendimiento mediante la liofilización de hojas y tallos por separado; y el resto se sometieron a secado con la finalidad de obtener biomasa deshidratada para ser utilizados en cantidades específicas en las 19 experimentaciones de hidrólisis ácida y en la hidrólisis enzimática.

Se realizó una preselección y se procedió a limpiar con agua para evitar residuos de tierra, nematodos u otras plagas que pudieran estar presentes y se guardó en refrigeración a $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso.

3.4 Metodología para la obtención de azúcares

La obtención de azúcares de materia prima se realizó respetando la secuencia de pasos descritos en la Figura 14.

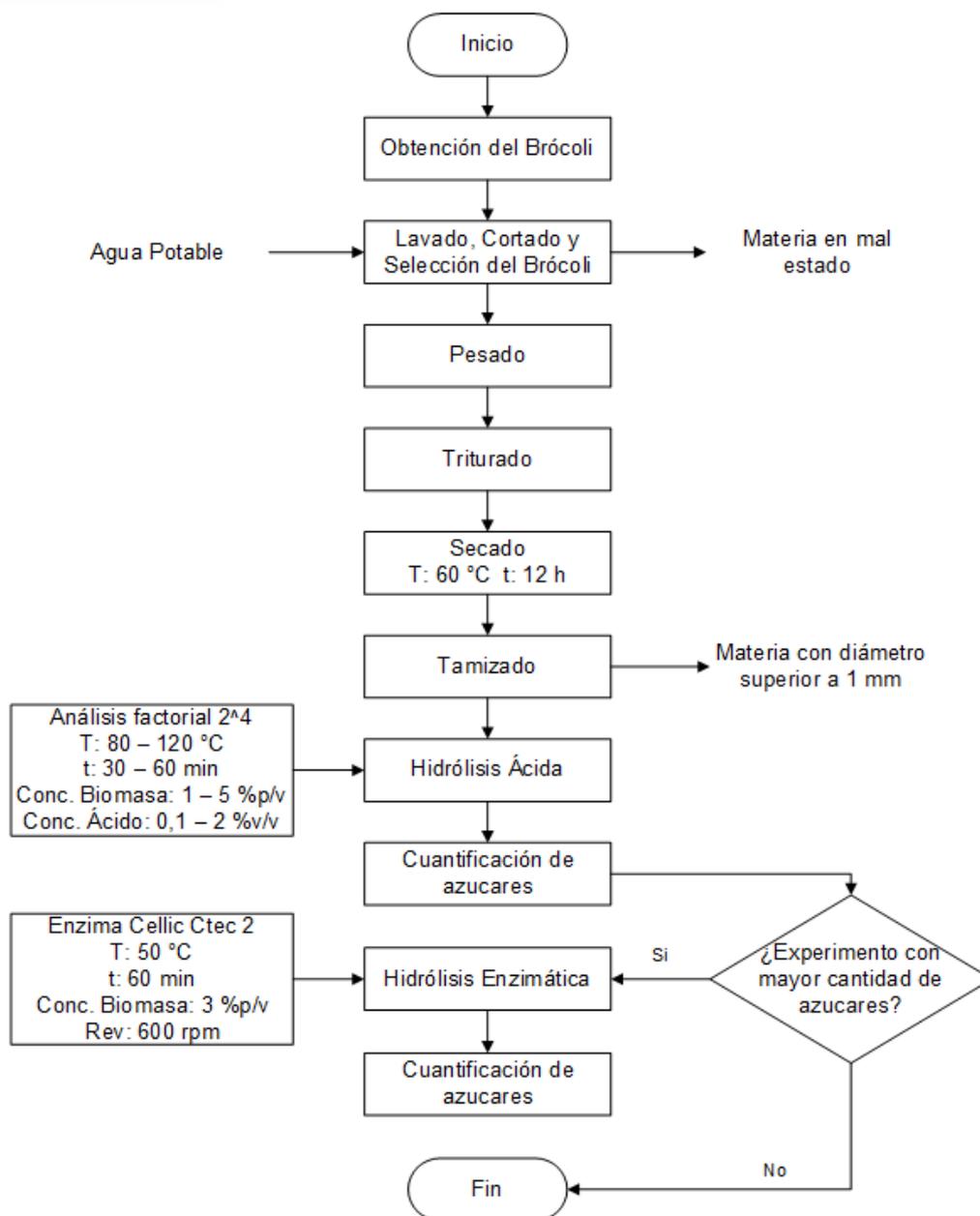


Figura 14. Diagrama de flujo de la obtención de azúcares del brócoli. **Fuente:** (Vargas Rico et al., 2022).

La hidrólisis ácida y enzimática fueron las metodologías utilizadas para la obtención de azúcares a partir de biomásas lignocelulósicas y se aplican en la actualidad con énfasis a los residuos agroindustriales, pero el estudio en los mismos resulta complejo, debido a que cada materia prima posee características distintas, estas deben realizarse controlando ciertas variables para así obtener una cantidad significativa de azúcares. Esto se determina solamente con la experimentación, por consiguiente, primero se realizó en cantidades pequeñas y acorde a los resultados obtenidos existe la posibilidad de escalar el proceso mediante los cálculos del costo energético y monetario necesario para obtener cierta cantidad de azúcares (Manzanares et al., 2020).

3.4.1 Materiales, equipos y reactivos

Tabla 12. Materiales, equipos y reactivos para el proceso de obtención de azúcares.

Materiales	Equipos	Reactivos
Tamices ASTM.	Procesador de alimentos Robot Coupe R2 (disco de corte de 5/32 in. y una potencia de 1000 W.	Ácido sulfúrico 96% riqueza Marca Fisher.
Tubos de ensayo	Reactor <i>Batch</i> .	Agua destilada.
Vasos de precipitación metálico y de vidrio.	Deshidratador Gander MTN modelo CD80.	Enzima <i>Cellic Ctec2</i> .
Embudo de cristal y soporte para embudos.	Agitador digital de placa de cocción Scilogex MS7-H550-Procon.	Buffer de Citrato de sodio.
Pipetas volumétricas.	Tamizadora vibratoria AS 200 para tamices de ensayo de hasta 203 mm / 8" Ø.	

3.4.2 Tratamiento de la materia prima

Se procedió a una reducción de tamaño de la materia prima total, se cortó con cuchillo y se trituró con el procesador de alimentos Robot Coupe R2, con el disco de corte de 5/32 pulgadas a una potencia de 1000 vatios, hasta que se obtuvo un tamaño de partícula menor a 1 mm según el tamiz ASTM E11 de malla 18 de la ASTM (Sociedad estadounidense para pruebas y materiales). Posteriormente se aplicó un secado convencional en un Desecador de la marca Gander MTN modelo CD80 a una temperatura de 60 °C por un tiempo de 12 horas.

3.4.3 Pretratamiento ácido o Hidrólisis ácida

Una vez que se obtuvo la materia prima tratada se sometió a la biomasa a un proceso de hidrólisis ácida en donde se añadió una cantidad de solución de ácido sulfúrico al 96% de riqueza de la marca Fisher a concentraciones de 0,1% y 2% con variaciones del resto de parámetros, se aplicó el diseño factorial 2⁴. Para cada experimento fueron ajustados diferentes valores de temperatura, concentración de biomasa, concentración de ácido

sulfúrico y tiempo, especificados en la Tabla 14, todo esto se realizó en un reactor *Batch* detallado a continuación.

3.4.3.1 Equipo. El equipo utilizado para el pretratamiento ácido fue un reactor tipo *Batch* totalmente hermético que tiene una temperatura máxima de trabajo de 400°C por efectos de seguridad, se trabajó con cantidades de biomasa inferiores a 5 g. A continuación, se describen algunas características generales del reactor.

Tabla 13. Características del reactor *Batch*. **Fuente:** Datos proporcionados por su constructor Ingeniero Vinicio Astudillo.

Características	Especificaciones
Volumen total	2000 ml
Dimensiones	L 30 cm X A 30 cm X H 35 cm.
Materiales Utilizados	<p>Recipiente: Acero Inoxidable 304.</p> <p>Tapa: Acero Inoxidable 304.</p> <p>Niquelina: Niquelina circular tipo anillo de 1500 W y 220 V.</p> <p>Aislante térmico: ladrillo refractario, lana de vidrio.</p> <p>Estructura de acero inoxidable.</p>
Sistema de Control	<p>Digital para la temperatura. Válvula de seguridad de presión.</p> <p>Manómetro. Tensión Ac 220 V. Potencia 1500 W.</p> <p>Conectividad USB. Compatible con Windows.</p>
Control Manual	<p>La carga de muestra fue de forma discontinua y sus condiciones de operación dependen del proceso. En el manejo del reactor con aumento de temperatura y presión se procede a sellar el reactor.</p>

3.4.3.2 Diseño Experimental. Para obtener las condiciones óptimas de los factores del pretratamiento ácido se aplicó un diseño factorial de dos niveles (2^k), ya que resulta de gran utilidad en las primeras etapas de cualquier experimento en el cual se desconoce la influencia de los factores, esto se realizó con la finalidad de estudiar el efecto conjunto de los cuatro factores y sus interacciones sobre la variable respuesta, los niveles utilizados son máximo y mínimo. Los parámetros seleccionados fueron la temperatura (A), tiempo (B), concentración de la biomasa tratada (C) y concentración

del ácido sulfúrico (D). La variable de salida que se analizó en este diseño fue la concentración de azúcares (Fernández Bao, 2020; Montgomery, 2004).

La selección de los valores máximos y mínimos de cada variable en los experimentos fueron adaptados, en base, a un dominio experimental en el cual se utilizaron las referencias bibliográficas presentadas en la Tabla 7 (Capítulo 2) y los resultados de ensayos preliminares. En particular un estudio efectuado por Vargas Rico, et. al. (2022) proporcionó valores experimentales que ayudaron a determinar los parámetros críticos para mejorar el proceso de obtención de azúcares. Se emplearon valores de los resultados favorables según la capacidad del equipo, cuya finalidad fue establecer nuevos límites en las variables experimentales, adecuadas para la biomasa aplicada en esta investigación, los valores mencionados se presentan en la siguiente tabla:

Tabla 14. Condiciones de operación de la hidrólisis ácida.

Factores	Variables	Valor	
		Mínimo	Máximo
Temperatura (°C)	A	80	120
Tiempo (min)	B	30	60
Concentración de la biomasa (% p/v)	C	1	5
Concentración del ácido (%v/v)	D	0,1	2

3.4.3.3 Matriz de diseño experimental. Los 19 experimentos realizados (16 del diseño original y 3 réplicas centrales) se encuentran en la matriz de experimentos, en la Tabla 15, respectivamente y el orden en el que se efectuó cada experimento, el mismo, fue aleatorizado con el programa Statgraphics® Centurion XVI, con la finalidad de evitar que los efectos de cada factor o interacción sean confundidos con otro factor no controlable y se forme un sesgo en los resultados.

Tabla 15. Matriz de experimentos para el diseño experimental. **Fuente:** (Montgomery, 2004).

N°	Orden experimental	A	B	C	D
1	6	-1	-1	-1	-1
2	15	1	-1	-1	-1
3	2	-1	1	-1	-1
4	10	1	1	-1	-1
5	3	-1	-1	1	-1
6	4	1	-1	1	-1
7	14	-1	1	1	-1
8	11	1	1	1	-1
9	18	-1	-1	-1	1
10	7	1	-1	-1	1
11	19	-1	1	-1	1
12	1	1	1	-1	1
13	17	-1	-1	1	1
14	12	1	-1	1	1
15	16	-1	1	1	1
16	5	1	1	1	1
17	9	0	0	0	0
18	8	0	0	0	0
19	13	0	0	0	0

Nota: Se incluyeron las réplicas centrales en los tres últimos experimentos.

3.5.3.4 Proceso. Cabe aclarar que las cantidades utilizadas de biomasa y ácido sulfúrico fueron proporcionales para un volumen de 100 ml, y su valor, así como el de la temperatura de seteo y del tiempo de la hidrólisis se detallaron en la Tabla 19, su combinación de valores resultó diferente para cada experimento debido al diseño factorial aplicado.

Además, en cada experimento se revisó constantemente la presión, con el fin de regular la misma con una válvula compuerta, por seguridad, en donde posiblemente hubo pérdida de contenido en estado de vapor.

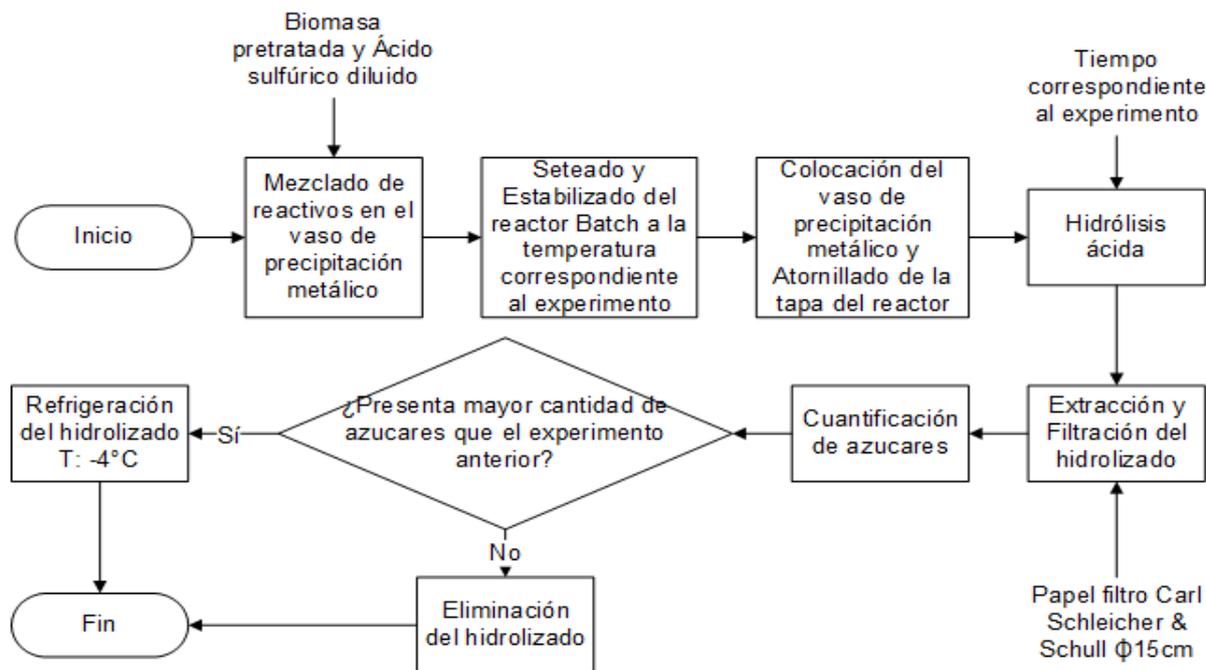


Figura 15. Diagrama de flujo de la hidrólisis ácida del brócoli.

3.4.4 Hidrólisis Enzimática

3.4.4.1 Proceso. El proceso de la hidrólisis enzimática se realizó de forma anaerobia en el Agitador digital de placa de cocción Scilogex MS7-H550-Procon con 100 ml de solución en un vaso de precipitación de vidrio de 250 ml, se empleó el 3% de biomasa que equivale a 3 ml de hidrolizado filtrado, 1 ml de la enzima *Cellic CTec2* y 96 ml de buffer de citrato de sodio, este tiene la finalidad de mantener el pH de la solución en 4,8 durante el proceso. Se verificó la temperatura del proceso con un termómetro de mercurio y el pH con un Medidor multiparamétrico de pH Edge.

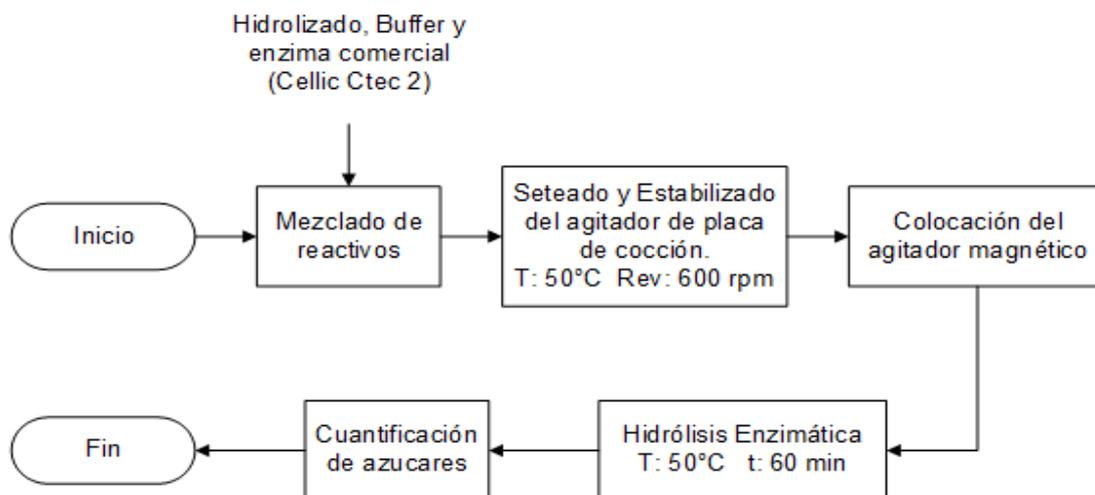


Figura 16. Diagrama de flujo de la hidrólisis enzimática.

3.4.5 Cuantificación de azúcares totales

Se realizó la cuantificación de azúcares totales para los procesos de hidrólisis ácida e hidrólisis enzimática mediante el método de Dubois o método fenol - ácido sulfúrico.

3.4.5.1 Materiales, equipos y reactivos. El método descrito por Dubois requirió de una serie de reactivos y equipos necesarios para una correcta cuantificación. Los reactivos utilizados para la ejecución de este método fueron: ácido sulfúrico (H_2SO_4) de la marca Fisher con una riqueza del 96% con una densidad de $1,84 \text{ g/cm}^3$; fenol (C_6H_6O) preparado a partir de una riqueza del 95,5% a una concentración del 5% p/v. Los demás reactivos, equipos y materiales empleados se describen en la Tabla 16.

Tabla 16. Materiales, equipos y reactivos para el método de cuantificación de azúcares de Dubois o Fenol-Sulfúrico.

Materiales	Equipos	Reactivos
Cubetas de vidrio para el espectrofotómetro.	Espectrofotómetro de UV-visible.	Agua destilada.
Tubos de ensayo de vidrio.	Campana de extracción.	Ácido sulfúrico concentrado.
Gradilla para tubos de ensayo.		Fenol al 5%.
Vaso de precipitación de 250ml.		Muestras en análisis (hidrolizado).
Balones de aforo.		
Piseta.		
Pipeta de 5ml, 10ml y de 1 ml.		
Peras de succión.		

3.4.5.2 Curva de calibración. En la curva de calibración de la Figura 17, se utilizó glucosa como solución patrón para la cuantificación de azúcares del método colorimétrico de Dubois. En donde, se obtuvo una absorbancia en nanómetros frente a la concentración obtenida en miligramos por mililitro.

El coeficiente de correlación alto $R^2 = 0,995$ obtenido por Guncay Buestán & Silva Ibarra (2018) en la curva patrón, permitió que las diferentes muestras que se midieron en absorbancias con una longitud de onda de 490 nm sean confiables, esas absorbancias se transformaron en concentración de azúcares totales a través de la ecuación de la curva. La cual se realizó con soluciones de glucosa de grado analítico partiendo de concentraciones conocidas en mg/ml, se prepararon las concentraciones

suficientes para formar la curva de calibración y se aplicó la técnica de Dubois, usando agua destilada como blanco (López-Legarda et al., 2017; Salvatierra Hurtado, 2015).

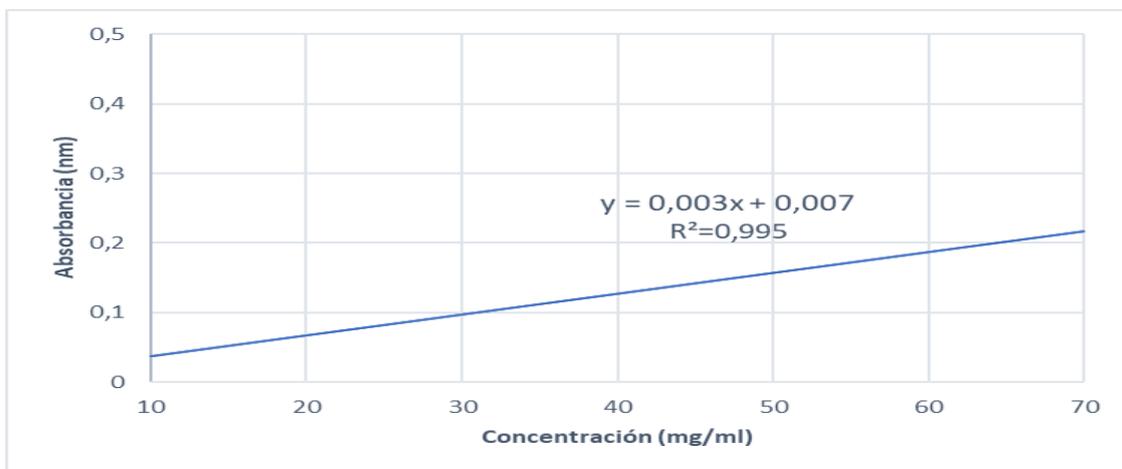


Figura 17. Curva de calibración de glucosa. **Fuente:** (Guncay Buestán & Silva Ibarra, 2018).

3.4.5.3 Procedimiento. Para este método colorimétrico se empleó un espectrofotómetro de UV - visible GENESYS™ 140/150 de la marca Thermo Scientific™ 840-300300, en donde se requirió de una curva de calibración anteriormente presentada, para comparar los resultados. Como paso previo a la cuantificación de sólidos del sustrato en cuestión, se procedió a disolver los hidrolizados en agua destilada hasta que se logró alcanzar una absorbancia que se encontrara dentro de los límites de la curva patrón de glucosa. Esto se logró mediante diluciones seriadas y se determinó que en una disolución de 1/5000 producía resultados adecuados en todas las hidrólisis, por lo tanto, se trabajó con esta disolución, llevando a cabo el procedimiento presentado en la Figura 18.

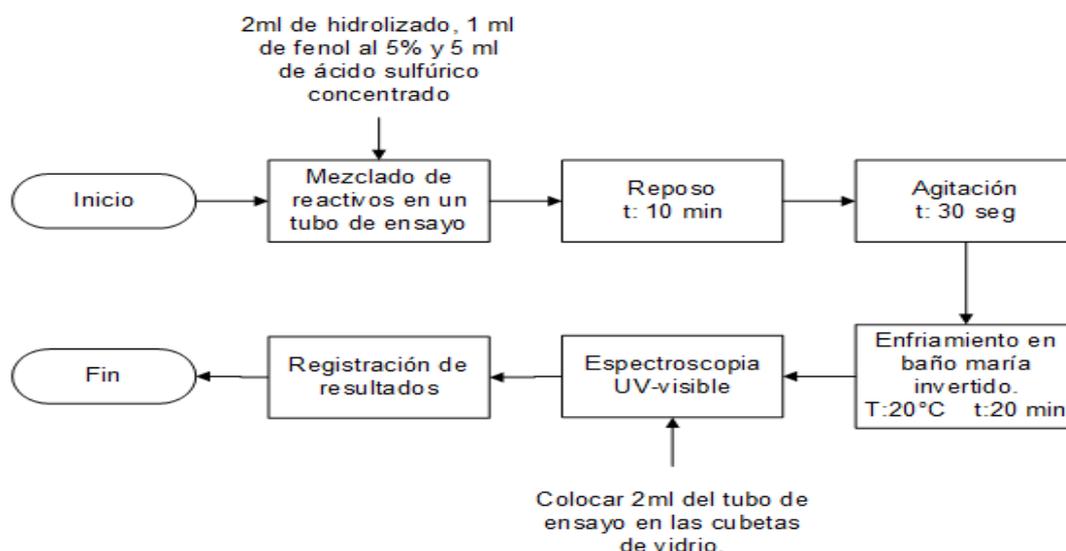


Figura 18. Diagrama de flujo para la cuantificación de azúcares totales.

3.5 Metodología para la obtención de harina

La revalorización de productos alimenticios es una temática que ha tomado importancia en los últimos años. Por este motivo, se elaboró un producto alimenticio a partir de los residuos del brócoli mediante procesos de preparación de la materia prima, un ciclo de liofilización y la reducción de tamaño, los cuales otorgaron un valor agregado a los residuos de la hortaliza comprendida por los tallos, hojas y nervaduras que son desechados en un buen estado del vegetal y puede constituir un polvo con alto potencial de uso. Los procesos de tratamiento se realizaron con el propósito de evitar cualquier suciedad o impureza que disminuya la calidad del producto final y para preservar la inocuidad del mismo. La Figura 19 sintetiza los pasos para la elaboración de la harina de brócoli.

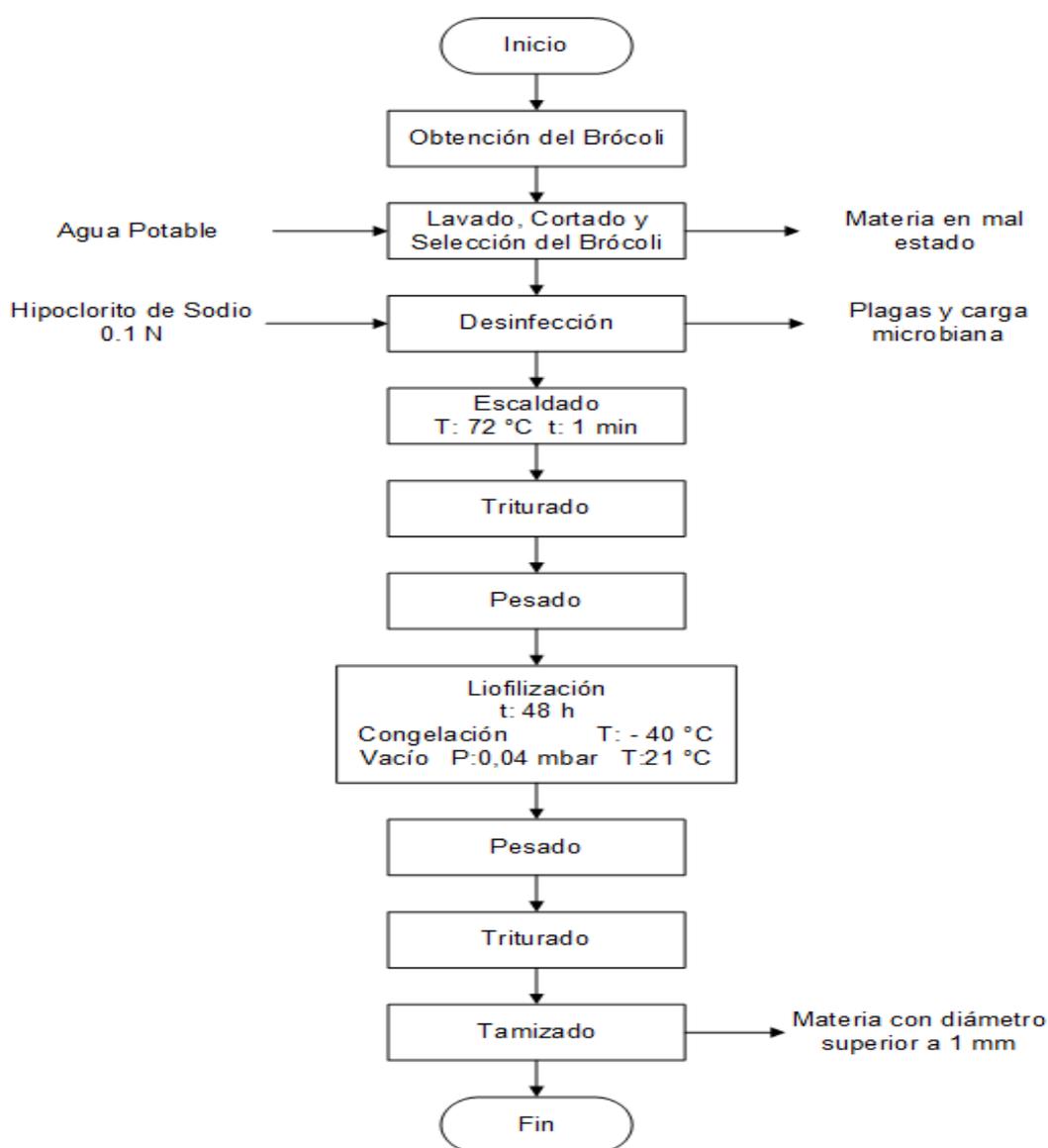


Figura 19. Diagrama de flujo de la obtención de harina del brócoli. **Fuente:** (Rejón Segura, 2022).

3.5.1 Materiales, equipos y reactivos

Tabla 17. Materiales, equipos y reactivos para el proceso de liofilización.

Materiales	Equipos	Reactivos
Envase plástico (PET).	Procesador de alimentos Robot Coupe R2 (disco de corte de 5/32 in. y una potencia de 1000W).	Hipoclorito de sodio 0.1 N.
Cuchillo y tablas de cortar.	Liofilizador marca Armfield, modelo FFT33-B, serie: 35137-00.	Agua destilada.
Mortero	Tamizadora vibratoria AS 200 para tamices de ensayo de hasta 203 mm / 8" Ø.	

3.5.2 Tratamiento de la materia prima

A la materia prima seleccionada se aplicó un proceso de desinfección o reducción de carga microbiana con una solución de hipoclorito de sodio 0.1 N por 10 minutos a temperatura ambiente. Posterior a esto se aplicó un escaldado de la materia prima a 72 °C por 1 minuto, se escurrió el sobrante de agua y se enfrió con agua a temperatura ambiente, esto fue realizado con la finalidad de conservar la inocuidad del producto final y facilitar el proceso de reducción de tamaño. Se cortaron manualmente los tallos, las venas foliares y hojas con un espesor de 2 a 3 mm aproximadamente. Se llevó toda la materia prima resultante al procesador de alimentos Robot Coupe R2, proceso por el cual se redujo a un tamaño de partícula aumentando la superficie específica de partícula para mejorar el rendimiento del secado, se formó una masa homogénea, la cual se colocó en los platos del liofilizador con suficiente cantidad hasta la mitad de su altura. Se pesó cada uno de los platos del liofilizador antes y después del ciclo de liofilización para obtener el rendimiento final del proceso.

3.5.3 Liofilización

El liofilizador que se utilizó es de la marca Armfield, modelo FFT33-B, serie: 35137-001, equipado con un conjunto de controles y procedimientos que garantizan la estandarización y conservación de las muestras durante el proceso de liofilización, este equipo de laboratorio posibilitó el obtener una harina de residuos de brócoli que conserve en gran medida las características iniciales de la materia prima reduciendo la humedad considerablemente.

3.5.3.1 Procedimiento. La etapa de congelación se realizó hasta que las temperaturas de las termocuplas alcanzaron valores cercanos a la temperatura de la cámara de muestras. Y la etapa del vacío hasta que las temperaturas de la cámara de muestra y de las termocuplas llegaron a la temperatura ambiente. Resultando en un total de 48 horas de duración total del proceso de liofilización, donde se registraron los datos del peso inicial y peso final, con estos datos se calculó la cantidad de agua eliminada, el porcentaje de humedad inicial y humedad final.

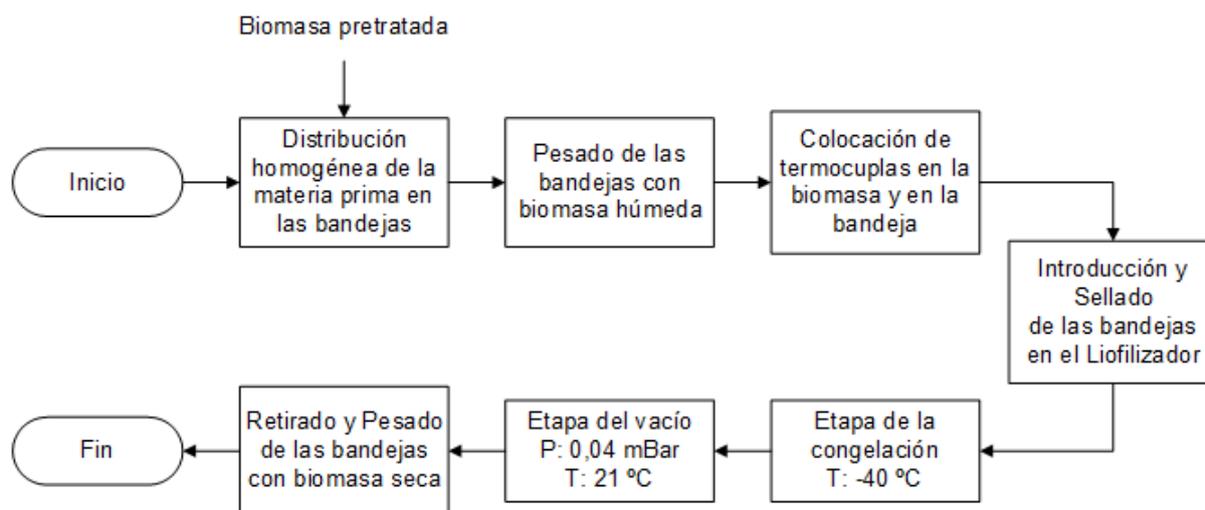


Figura 20. Diagrama de flujo de la liofilización del brócoli.

3.5.4. Reducción de tamaño y tamizado

Para determinar el tamaño de partícula se debe aplicar la normativa NTE INEN 517:2013 (Harina de origen vegetal. Determinación del tamaño de las partículas), mediante tamices de malla pertenecientes a la estandarización, vigente para la determinación de harina vegetal en Ecuador. En este caso, todo el producto que se obtuvo del ciclo de liofilización fue sometido a una reducción de tamaño mediante un mortero para obtener un diámetro de partícula adecuado. Luego de esto se procedió al tamizado utilizando una tamizadora analítica de la serie AS 200, se utilizó los tamices ASTM E11 con malla número 60, 35, 18 y bandeja colectora. Se dejó durante 20 minutos con una amplitud controlada de 0,50 mm/g. Se pesó en una balanza de precisión modelo BOECO BWL 61, el resultante del tamizado de las mallas N°60 y N°35 partículas de tamaño inferior a 1 mm, se obtuvo un total de 107 gramos de harina de residuos de Brócoli. Esta harina resultante fue colocada en un envase PET para su conservación y respectivo análisis bromatológico.

3.5.5. Análisis Bromatológico

La caracterización fisicoquímica de la harina que se obtuvo mediante el proceso de liofilización se realizó mediante un análisis bromatológico que constó de la determinación de

la humedad, cenizas, proteínas, grasas y fibra cruda. Estos análisis se realizaron en el laboratorio MSV (Análisis de alimentos, aguas y suelos) con acreditación SAE (Servicio de Acreditación Ecuatoriano) con una muestra de 100 gramos. A continuación, se presentan las normas utilizadas para cada análisis en la Tabla 18.

Tabla 18. *Parámetros y metodologías aplicadas en el análisis bromatológico.*

Análisis Físico - Químico	
Parámetros	Metodologías
CENIZAS	AOAC 923.03 - GRAVIMETRÍA
FIBRA	NTE INEN-ISO 6865 - GRAVIMETRÍA
GRASA	AOAC 920.85 - GRAVIMETRÍA
HUMEDAD	AOAC 925.10 - GRAVIMETRÍA
PROTEÍNA	AOAC 991.20 - VOLUMETRÍA
CARBOHIDRATOS TOTALES	CÁLCULO PROXIMAL - CÁLCULO

Capítulo 4. Resultados y Discusiones

4.1 Hidrólisis Ácida

En este proceso se aplicó un diseño factorial 2^4 no replicado con la finalidad de encontrar los valores óptimos de cada factor que nos proporcionen un mayor rendimiento de azúcares, estos valores fueron evaluados mediante los programas estadísticos de Statgraphics® Centurion versión 19.5 y Minitab® versión 20.1.2

4.1.1 Parámetros de operación

Los parámetros de operación establecidos como temperatura, tiempo, concentración de biomasa y ácido fueron seleccionados en función de su relevancia en los procesos de hidrólisis ácida aplicados a distintas biomásas lignocelulósicas presentadas en la Tabla 7 (Capítulo 2) debido a que pueden ser controladas durante el proceso. Los datos utilizados en los parámetros en cada experimento se encuentran detallados en el plan de experimentación de la Tabla 19.

Un ejemplo de estudio realizado por Gundupalli & Bhattacharyya (2019) demuestra la factibilidad de optimizar factores mediante el análisis factorial en la hidrólisis ácida de la biomasa con la finalidad de mejorar el rendimiento de azúcares reductores, en dicha investigación, se estudió dos casos de la fibra de coco en donde varían factores como temperatura, tiempo y concentración de ácido sulfúrico, en donde sus mejores resultados presentaron una tasa de recuperación de azúcares del 50% aproximadamente y rendimientos de glucosa altos. Lo que nos indica la factibilidad de aplicar dicho análisis factorial en la biomasa estudiada.

El parámetro de la presión representa un factor importante, pero no fue considerado para el estudio debido a las limitaciones del equipo. Otros parámetros como el pH y el diámetro de partículas no fueron considerados por no ser significativos para el estudio.

Tabla 19. Plan de Experimentación.

N°	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Concentración de la biomasa (% p/v)	Concentración del ácido (% v/v)
1	80	30	1	0,1
2	120	30	1	0,1
3	80	60	1	0,1
4	120	60	1	0,1
5	80	30	5	0,1
6	120	30	5	0,1
7	80	60	5	0,1
8	120	60	5	0,1
9	80	30	1	2
10	120	30	1	2
11	80	60	1	2
12	120	60	1	2
13	80	30	5	2
14	120	30	5	2
15	80	60	5	2
16	120	60	5	2
17*	100	45	2,5	1
18*	100	45	2,5	1
19*	100	45	2,5	1

Nota: * Los tres últimos experimentos corresponden a las réplicas centrales del experimento.

4.1.2 Cuantificación de los azúcares generados

La cantidad de azúcares totales se cuantifica mediante el método de Dubois y es la variable dependiente en la cual los factores independientes fueron analizados con el uso del diseño experimental 2^4 de la hidrólisis ácida. Esta cuantificación fue realizada por triplicado para obtener resultados con mayor precisión realizando la desviación estándar, estos valores se presentan en la Tabla 20.

Tabla 20. Cuantificación de azúcares de la hidrólisis ácida.

N° de experimento	N ° de Réplicas (mg/ml)			Promedio (mg/ml)	Cuantificación de Azúcares* (mg/ml o g/L)	Desviación estándar.
	1	2	3			
1	28,537	26,295	29,759	28,20	140,99	1,76
2	9,947	13,407	16,569	13,31	66,54	3,31
3	10,948	6,714	-	5,89	44,16	2,99
4	10,654	17,503	7,872	12,01	60,05	4,96
5	8,000	9,417	11,968	9,80	48,98	2,01
6	41,418	33,976	36,992	37,46	187,31	3,74
7	28,192	25,983	27,297	27,16	135,79	1,11
8	22,125	-	31,891	18,01	135,04	6,91
9	39,951	30,534	28,96	33,15	165,74	5,94
10	20,814	12,142	10,245	14,40	72,00	5,63
11	27,873	17,517	21,165	22,19	110,93	5,25
12	-	9,495	8,142	5,88	44,09	0,96
13	31,660	29,386	34,448	31,83	159,16	2,55
14	26,249	28,477	28,615	27,78	138,90	1,33
15	29,429	34,004	38,193	33,88	169,38	4,38
16	17,538	11,687	20,5551	16,59	82,97	4,51
17	11,080	13,798	14,068	12,98	64,91	1,65
18	15,670	26,029	20,327	20,68	103,38	5,19
19	24,270	28,757	37,869	30,30	151,49	6,93

Nota: *Se obtiene a partir de la fórmula de dilución seriada con un factor de dilución de 1/5000. Los resultados omitidos son productos de una lectura fuera del rango. Los experimentos 17,18 y 19 corresponden a los valores centrales.

El experimento 6 presenta los mejores resultados del proceso, con una cantidad de azúcares de 187,31 g/L; este resultado presenta una desviación estándar relativamente baja de $\pm 3,74$; lo que acredita la veracidad del resultado. En este experimento el valor de la temperatura fue de 120°C (nivel alto), con un tiempo de 30 minutos (nivel bajo), una concentración de ácido

sulfúrico de 0,1% (nivel bajo) y la concentración de biomasa de 5% (nivel alto). Este resultado presenta semejanzas con lo obtenido por Sigüencia et al. (2018) en cuanto al aumento de la temperatura y la utilización de menor porcentaje de ácido que contribuyen a la obtención de azúcares. Sin embargo, en su investigación al trabajar con el 5% p/v de concentración de biomasa se obtiene una disminución de azúcares, contrario a lo obtenido en los resultados. Esto podría ocurrir debido a la diferencia composicional entre las biomásas utilizadas.

4.1.3 Replicas centrales

La suposición de linealidad de los efectos de los factores, es uno de los puntos de revisión para evitar errores en el diseño factorial de dos niveles; por ello se realizan experimentos en los puntos centrales en donde se aplica el método para determinar la existencia o no de la curvatura, y al no existir diferencia no se incluyen estos valores (Rodrigo Gómez, 2009). Analizando los resultados de la diferencia entre el valor final (Y_f) y la media central (Y_c) esta es lo suficientemente pequeña como para considerarla insignificante, es decir estos valores no muestran diferencias sustanciales. El valor Mse "Mean Squared Error" (error cuadrático medio) es alto, mientras que el Sscurv (suma de cuadrados para la curvatura) presenta un valor bajo lo que sugiere un buen ajuste del modelo (Barzola, 2021; Fernández Bao, 2020; Montgomery, 2004). Estos valores se observan en la Tabla 21.

Tabla 21. Resultado de los valores de réplica centrales.

Cálculo	Valor
$Y_f - Y_c$	6,232291667
Mse	1940,030422
Sscurv	98,12579221

Debido a la inexistencia de la curvatura, los experimentos 17, 18 y 19 serán omitidos del resto de los análisis del diseño experimental.

4.1.4 Selección de términos para la construcción del Análisis de la varianza estadística (ANOVA).

Según, Gutiérrez & De La Vara (2008) indica que mediante técnicas numéricas, gráficas o tabulares tales como eliminar o mandar al error aquellos efectos principales, interacciones dobles, o interacciones triples; se pueden mejorar los coeficientes de determinación para que estos puedan ser bien estimados.

Una de las técnicas más empleadas para diseños experimentales con cuatro o más factores es la gráfica de efectos en papel normal o gráfica de Daniel, en la cual, los efectos no significativos van a seguir una distribución normal, es decir, poseen una media igual a cero y

una varianza constante (Rodrigo Gómez, 2009). Esto reflejado en un papel probabilístico normal presenta una línea recta, al contrario de los efectos significativos que no se presentan en la línea recta de la gráfica. Los resultados de las magnitudes de cada efecto y su frecuencia se observan en la Tabla 22, realizada según lo descrito por Montgomery (2004).

Tabla 22. Magnitudes y frecuencias de cada efecto.

Orden (j)	Resultado	Efecto	Frecuencia A
1	-49,33625	AD	0,03333333
2	-34,26125	ABC	0,1
3	-22,52375	ACD	0,16666667
4	-19,90875	B	0,23333333
5	-18,78625	A	0,3
6	-17,35125	BCD	0,36666667
7	-13,50875	BD	0,43333333
8	-9,46375	CD	0,5
9	-6,25375	AB	0,56666667
10	-4,86375	ABD	0,63333333
11	9,48875	D	0,7
12	12,29875	ABCD	0,76666667
13	27,90875	BC	0,83333333
14	37,30625	AC	0,9
15	50,17625	C	0,96666667

En la gráfica de probabilidad realizada usando el software Excel © 2019, en la Figura 21, se observa la ausencia de puntos significativos.

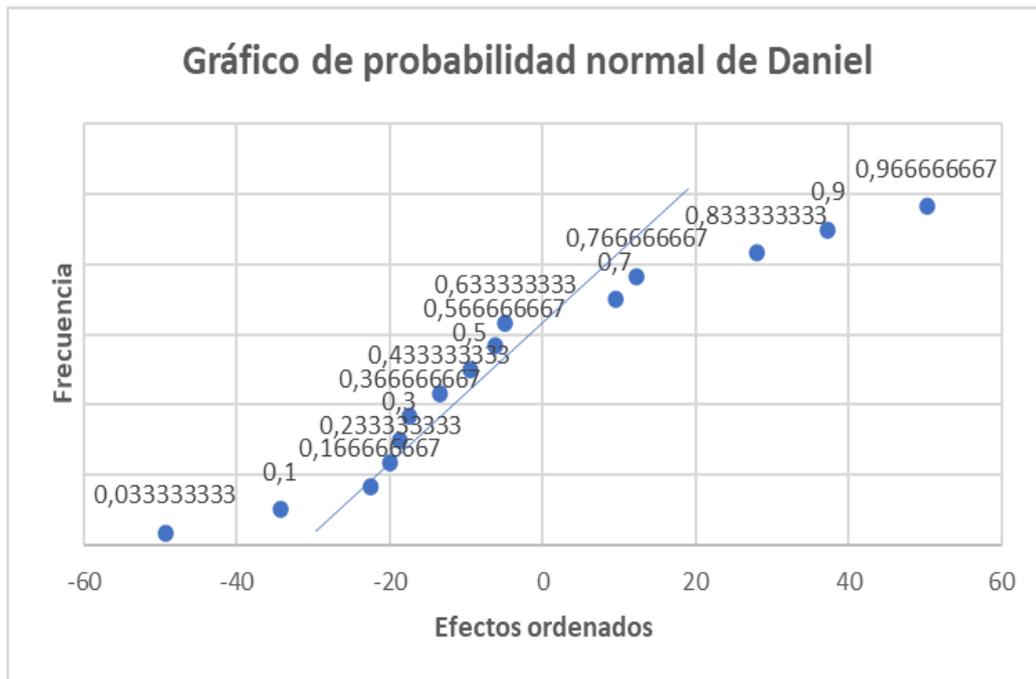


Figura 21. Gráfica de Probabilidad Normal de los resultados de la hidrólisis ácida.

En el diagrama de Pareto representado en la Figura 22, otra de las técnicas utilizadas para estos diseños que permite identificar los efectos que se deben excluir, se observa que los datos no pasan la línea punteada lo cual no permite ver con claridad la existencia de estos puntos significativos, por tanto, se hace necesario aplicar el criterio que permita mandar al error o excluir dichos efectos (Gutiérrez & De La Vara, 2008).

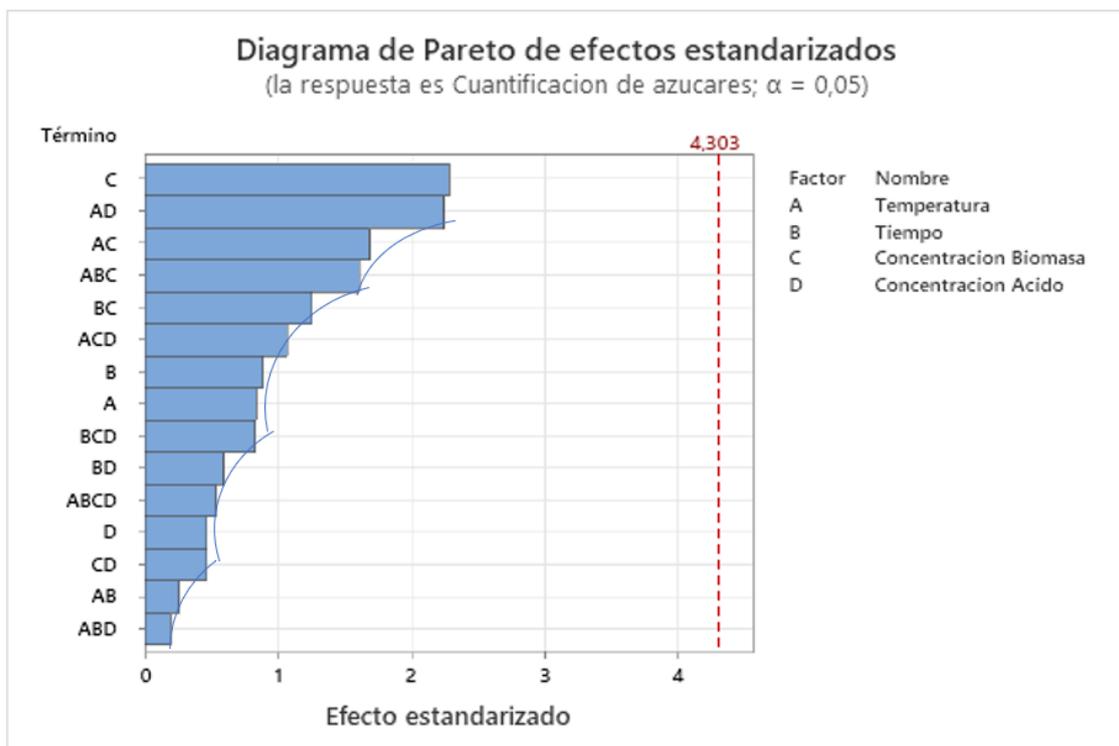


Figura 22. Gráfica de Pareto de los resultados de la hidrólisis ácida.

Ambas gráficas nos permiten identificar el comportamiento de los efectos. Sin embargo, en la Figura 21, gráfica de probabilidad normal, se pueden identificar los efectos más dispersos a la linealidad, como C (concentración de biomasa), AD (temperatura*concentración del ácido), AC (temperatura*concentración de biomasa) y ABC (temperatura*tiempo*concentración de biomasa); mientras que, en el diagrama de Pareto, Figura 22, se puede distinguir la relevancia de cada uno de los efectos. Donde se comprueba que se observan efectos más destacados, pero según la desviación estándar (sigma) empleada por el software no son significantes.

Por lo tanto, es necesario mandar al error es decir excluir términos, haciendo referencia a estos como términos de la primera “oleada” que representan a los efectos de menor importancia, que en este caso los eliminados serían CD (concentración de biomasa*concentración de ácido), AB (temperatura*tiempo) y ABD (temperatura*tiempo*concentración de ácido).

4.1.5 Correlación de los parámetros y sus interacciones

La ecuación de regresión lineal en un diseño factorial demuestra la relación entre los factores del diseño experimental y la variable de respuesta, en donde se observan las contribuciones individuales de los factores y sus interacciones. En la Ecuación 1, se representa la ecuación de regresión lineal ajustada y simplificada de la Ecuación 2, que actúa en los efectos seleccionados, esta ecuación permite tener aproximaciones de parámetros no estudiados mediante interpolaciones y extrapolaciones.

$$Y = 110,13 - 11,77 A - 12,33 B + 22,06 C + 7,77 D + 15,63 A*C - 21,64 A*D + 10,93 B*C - 3,73 B*D - 20,16 A*B*C - 8,89 A*C*D - 6,30 B*C*D \quad (\text{Ecuación. 1})$$

Donde:

Y= representa el resultado de la cuantificación de azúcares.

A= representa el factor de la temperatura.

B= representa el factor del tiempo.

C= representa el factor de la concentración de biomasa.

D= representa el factor de la concentración del ácido.

En la Ecuación 1 se observa que el promedio de todos los valores de las cuantificaciones estudiadas en el primer término es de 110,13; seguido de las mitades del valor de los efectos principales y de las interacciones dobles, triples y cuádruples, en la cual, mientras mayor sea el valor absoluto a partir del segundo término, mayor es el efecto que tiene en la variable de respuesta y el signo positivo o negativo indica si favorece o perjudica respectivamente a la respuesta (Álvarez et al., 2018).

Cuantificación de azúcares = 110,13 - 11,77 *Temperatura* - 12,33 *Tiempo* + 22,06 *Concentración de Biomasa* + 7,77 *Concentración de Ácido* + 15,63 *Temperatura*Concentración de Biomasa* - 21,64 *Temperatura*Concentración de Ácido* + 10,93 *Tiempo*Concentración de Biomasa* - 3,73 *Tiempo*Concentración de Ácido* - 20,16 *Temperatura*Tiempo*Concentración de Biomasa* - 8,89 *Temperatura*Concentración de Biomasa*Concentración de Ácido* - 6,30 *Tiempo*Concentración de Biomasa*Concentración de Ácido*. (Ecuación. 2)

4.1.6 Verificación de supuestos del modelo

La validez de los resultados de cualquier análisis de varianza se sustenta mediante el cumplimiento de los supuestos del modelo, tales como la normalidad y la varianza constante, estos supuestos se basan en que la variable de respuesta debe distribuir normalmente y poseer la misma varianza en cada tratamiento (Gutiérrez & De La Vara, 2008). Para su análisis se emplea comúnmente la muestra de los residuos, como requisito necesario para los diseños experimentales donde se necesita obtener un ANOVA confiable (Acosta et al., 2021; Cuautle et al., 2016).

El análisis de residuos según Rodrigo Gómez (2009) se basa en que los “errores residuales deben ser independientes y tener una distribución normal con media cero y varianza desconocida pero constante”. (p. 303). Para este análisis de residuos se emplearon las gráficas de probabilidad normal y la gráfica de residuos frente a los valores ajustados.

4.1.6.1 Supuesto de Normalidad. En la gráfica de probabilidad normal, ilustrada en la Figura 23, los residuos deben encontrarse cercanos a la línea recta de la gráfica, es decir siguen una distribución normal, significa que los errores se encuentran distribuidos de manera simétrica alrededor de cero y de manera aleatoria, en esta investigación los resultados de la cuantificación de azúcares esta norma se cumple en la mayoría de residuos (Gutiérrez & De La Vara, 2008).

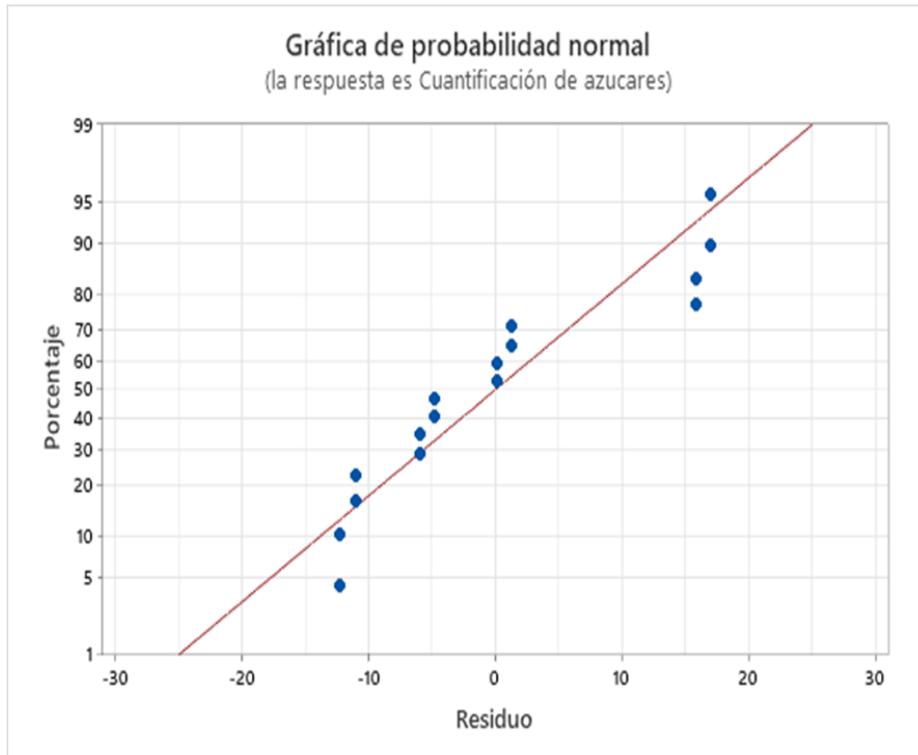


Figura 23. Gráfica de probabilidad normal de residuos.

4.1.6.2 Supuesto de varianza constante. Los puntos caen de forma aleatoria, pero la mayoría deben encontrarse cercanos a la banda horizontal asegurando la dispersión de los residuos a lo largo del rango de los valores predichos por el modelo (Gutiérrez & De La Vara, 2008). La Figura 24, presenta diez de sus dieciséis puntos cercanos al eje central, comprobando este supuesto de varianza constante.

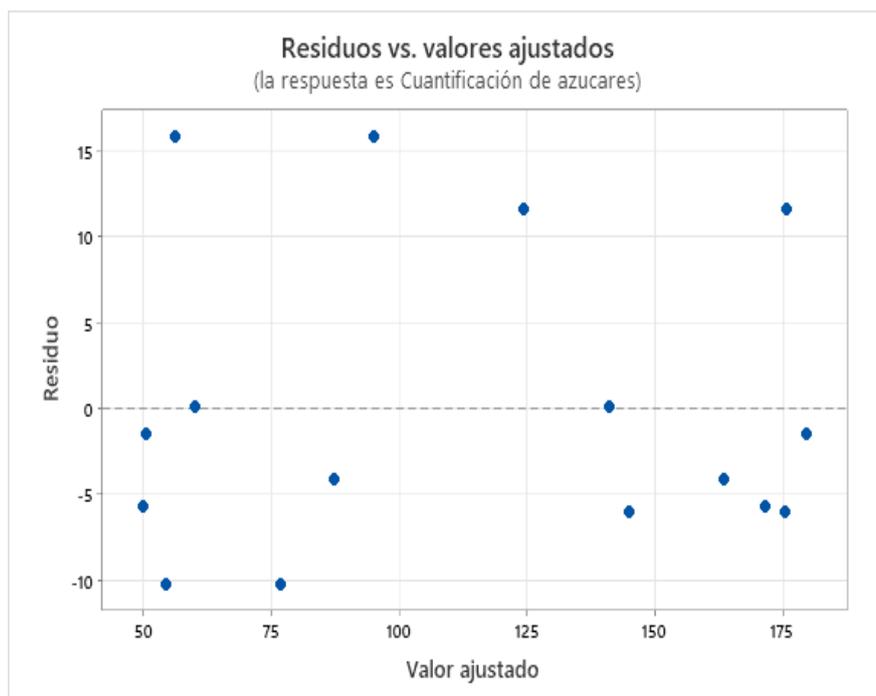


Figura 24. Gráfica de dispersión de los residuos.

4.1.7 Análisis de Varianza (ANOVA)

En la Tabla 23, se presenta la variabilidad de cada uno de los efectos seleccionados, donde se encuentran separadas las variables independientes e interacciones de segundo y tercer orden para su posterior análisis individual. Se determina un nivel de significancia que comúnmente es igual a $\alpha=0,05$; otro valor estadístico a considerar es el valor de p que representa el nivel más pequeño de significancia de α para el cual el tratamiento de estudio es significativo (Rodrigo Gómez, 2009).

Tabla 23. Análisis de Varianza para la cuantificación de azúcares.

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: Temperatura	2339,42	1	2339,42	5,02	0,0885
B: Tiempo	2561,63	1	2561,63	5,50	0,0789
C: Concentración de la Biomasa.	8020,55	1	8020,55	17,22	0,0143
D: Concentración del ácido.	886,402	1	886,402	1,90	0,2398
AC	4072,67	1	4072,67	8,74	0,0417
AD	7722,46	1	7722,46	16,58	0,0152
BC	2027,03	1	2027,03	4,35	0,1053
BD	263,17	1	263,17	0,57	0,4940
ABC	6291,27	1	6291,27	13,51	0,0213
ACD	1173,23	1	1173,23	2,52	0,1877
BCD	571,569	1	571,569	1,23	0,3301
Error total	1862,91	4	465,728		
Total (corr.)	37792,3	15			

Mediante los valores obtenidos en la tabla como la sumatoria total de cuadrados (SC total) y la sumatoria de cuadrados del error (SC error) y los grados de libertad (GI) del total y del error se obtienen el cuadrado medio del total (CM total) y del cuadrado medio del error (CM error), se aplican los coeficientes de determinación presentados en la Ecuación 3 y Ecuación 4.

$$R^2 = \frac{SC\ total - SC\ error}{SC\ total} * 100 \quad \text{(Ecuación. 3)}$$

$$R^2_{aj} = \frac{CM\ total - CM\ error}{CM\ total} * 100 \quad (\text{Ecuación. 4})$$

Además, mediante la Tabla 23 se denota aquellas fuentes significativamente diferentes de cero con un nivel de confianza del 95% que es la proporción de variabilidad, mediante el valor de p, donde los valores menores a 0,05 presentan dicha significancia (Montgomery, 2004; Rodrigo Gómez, 2009). Esto se cumple en cuatro efectos ordenados de la siguiente manera; el factor principal C que representa la concentración de la biomasa con un valor de $p=0,0143$; la interacción doble AD que representa la relación temperatura*concentración de ácido con un valor de $p= 0,0152$; la interacción triple ABC que representa la relación entre la temperatura*tiempo*concentración de biomasa con un valor de $p=0,0213$ y la doble interacción de AC que representa la relación entre la temperatura*concentración de biomasa con el valor de $p=0,0417$; estos efectos se representan en las gráficas mostradas posteriormente, los cuales afectan el rendimiento en la cuantificación de azúcares. Estos resultados muestran que la concentración de biomasa C es el factor más relevante tanto individualmente como en las interacciones, pero las interacciones dobles se encuentran en mayor cantidad.

Además, en este modelo los coeficientes de determinación muestran valores altos, con un valor de $R^2= 95,0707\%$ y R^2 ajustado= $81,515\%$. Según Gutiérrez & De La Vara (2008) para los diseños con varios factores se emplea el R^2 ajustado, debido a que el R^2 tiende a aumentar de manera artificial con el incremento de términos, aunque dichos términos sean pocos significantes, resultando en porcentajes altos que son ajenos a lo que realmente se rige el modelo, esto no sucede con el R^2 ajustado, donde disminuye su valor con términos no relevantes, además, recomienda que este valor sea superior al 70% para fines de predicción seguras.

4.1.8 Análisis de gráficas

Los valores del ANOVA con la finalidad de facilitar la interpretación de las variaciones de los efectos principales y sus interacciones, se presentan mediante gráficas realizadas utilizando el software Minitab® versión 20.1.2.

4.1.8.1 Diagramas basados en los efectos. En la gráfica de Pareto (Figura 25) y la gráfica de Daniel (Figura 26), se puede observar la relevancia de cada efecto, en la primera gráfica se presentan los efectos con significancia superior a la sigma estipulada (2,776) por Minitab® 20.1.2, en donde se encuentra un efecto principal C, dos interacciones dobles AD, AC y una interacción triple ABC. Lo mismo sucede con la gráfica de probabilidad normal Figura 26, donde los no significativos se encuentran

cerca de la recta, mientras que los significativos se alejan de ella (Gutiérrez & De La Vara, 2008).

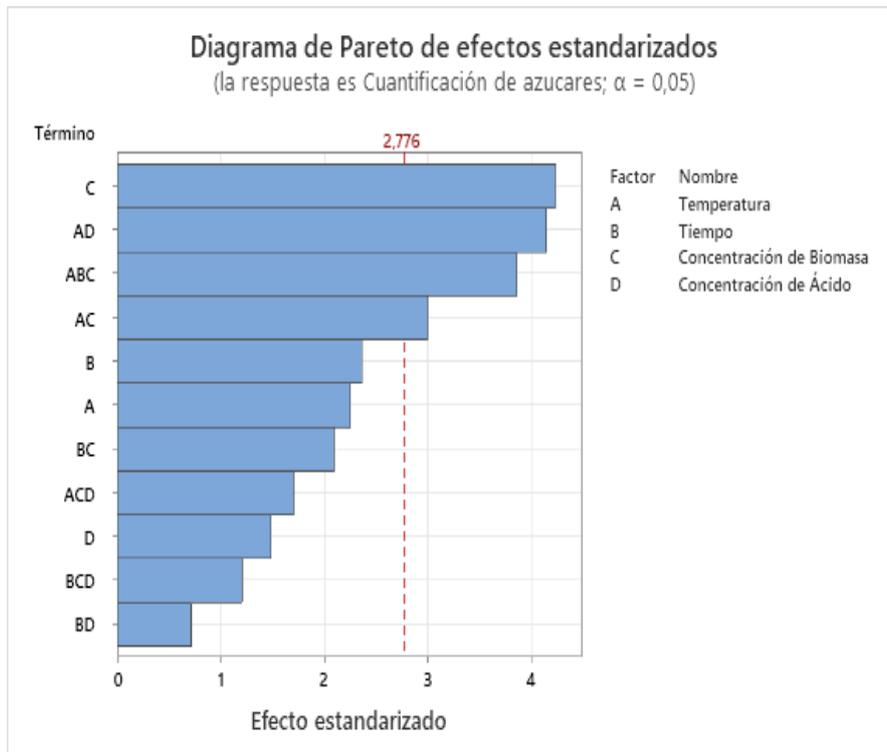


Figura 25. Diagrama de Pareto de los efectos seleccionados

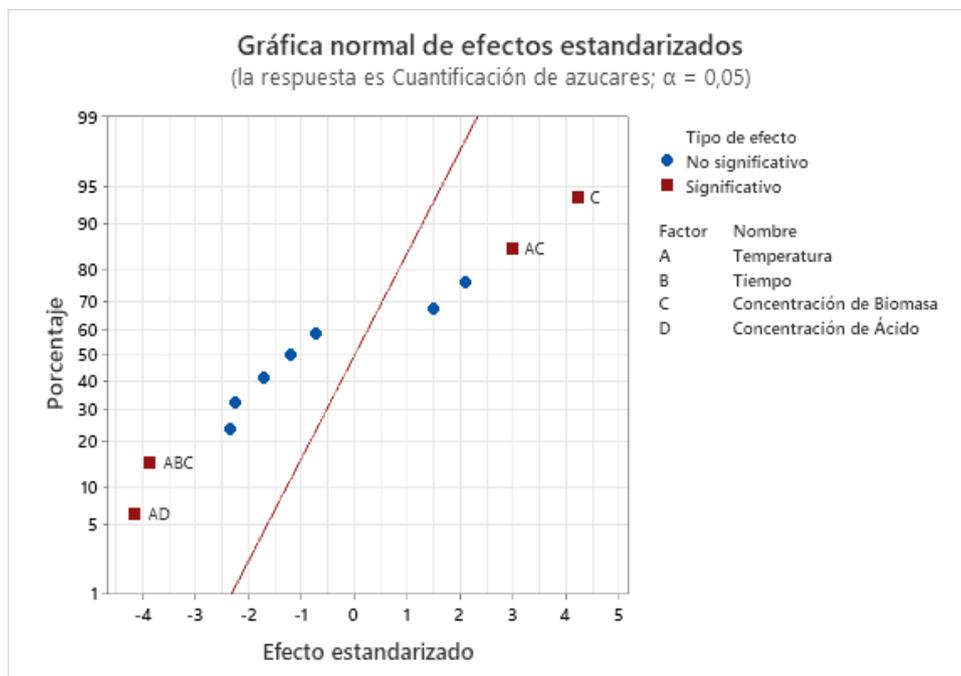


Figura 26. Gráfica de Probabilidad Normal de los efectos seleccionados.

4.1.8.2 Gráfica de efectos principales. El comportamiento de los efectos principales se puede observar en la Figura 27. Aquí los niveles de cada factor se encuentran en el eje horizontal mientras que la media de la respuesta se encuentra en el eje vertical.

La concentración de biomasa es el efecto más significativo debido que al aumentar la concentración de 1 a 5 % se obtuvo mayor cantidad de azúcares totales, de igual manera en la concentración del ácido de 0,1% a 2% se observa que se eleva la variable de respuesta, pero su efecto es menor debido a que los resultados cambian ligeramente. Mientras que para el caso de la temperatura y el tiempo ocurre lo contrario, el resultado mayor se observa en el nivel bajo de cada factor y de igual manera los cambios no son de mayor impacto como en el caso de la concentración de la biomasa. Se puede expresar también que el efecto de estos dos últimos es inversamente proporcional al efecto de la concentración de biomasa y del ácido.

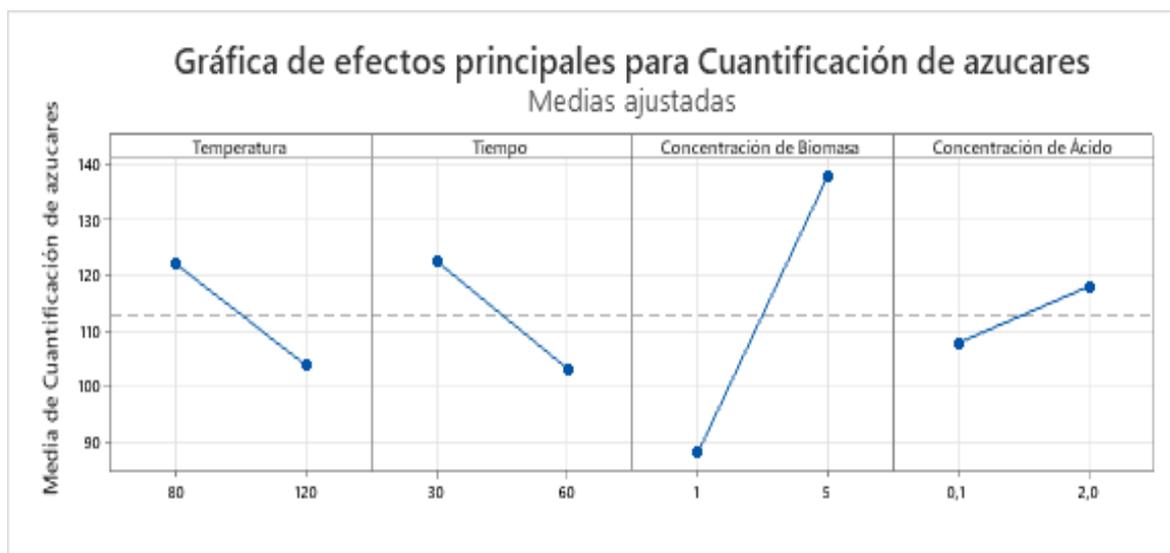


Figura 27. Gráfica de efectos principales para azúcares totales.

4.1.8.3 Gráfica de Interacciones. Los efectos de las interacciones presentan la influencia de las combinaciones de los factores sobre la variable de respuesta (Fernández Bao, 2020). En la Figura 28, se encuentra el perfil de interacciones dobles de los cuatro efectos. Las relaciones del tiempo con la concentración de la biomasa y con la concentración del ácido son relativamente paralelas para la región estudiada, por lo tanto, no existe una interacción entre estos factores, resultando en un valor menor de estos efectos en comparación al resto. Mientras tanto en las interacciones más relevantes de la Tabla 22 las relaciones entre la temperatura y la concentración de biomasa, así como la temperatura y la concentración de ácido presentan una intersección entre líneas, lo que manifiesta un alto rendimiento cuando la concentración de biomasa presenta su valor más alto y, al mismo tiempo, cuando la concentración del ácido sulfúrico se encuentra en su nivel más bajo (Ramírez et al., 2015).

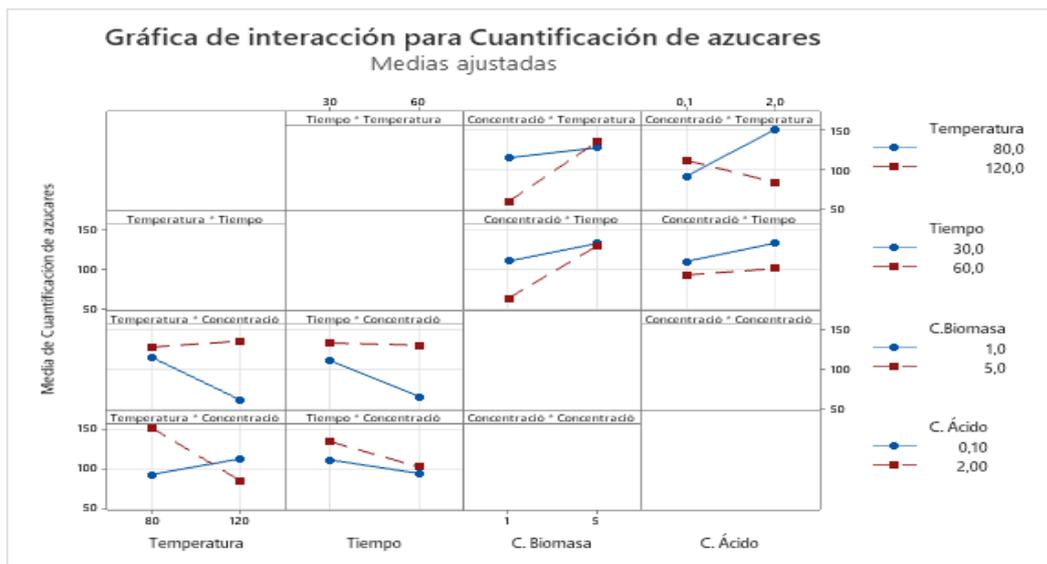


Figura 28. Gráfica de Interacciones.

4.1.8.4 Diagrama de cubo. La región experimental de esta investigación es representada en forma de cubo en la Figura 29, para cada uno de los experimentos con su valor promedio de respuesta (Cuautle et al., 2016). Los cuatro factores no pueden ser representados en las dimensiones correspondientes, por lo que el software representa estos valores en dos gráficas de 3 dimensiones (cubos), el primero para la concentración de 0,1% v/v y el segundo para la concentración del 2% v/v de ácido sulfúrico concentrado. En particular, el mejor tratamiento se tiene con una temperatura de 120 °C, tiempo de 60 minutos, concentración de ácido sulfúrico de 0.1% v/v y una concentración de biomasa de 5% p/v; con un rendimiento promedio de 179,680 g/L de azúcares.

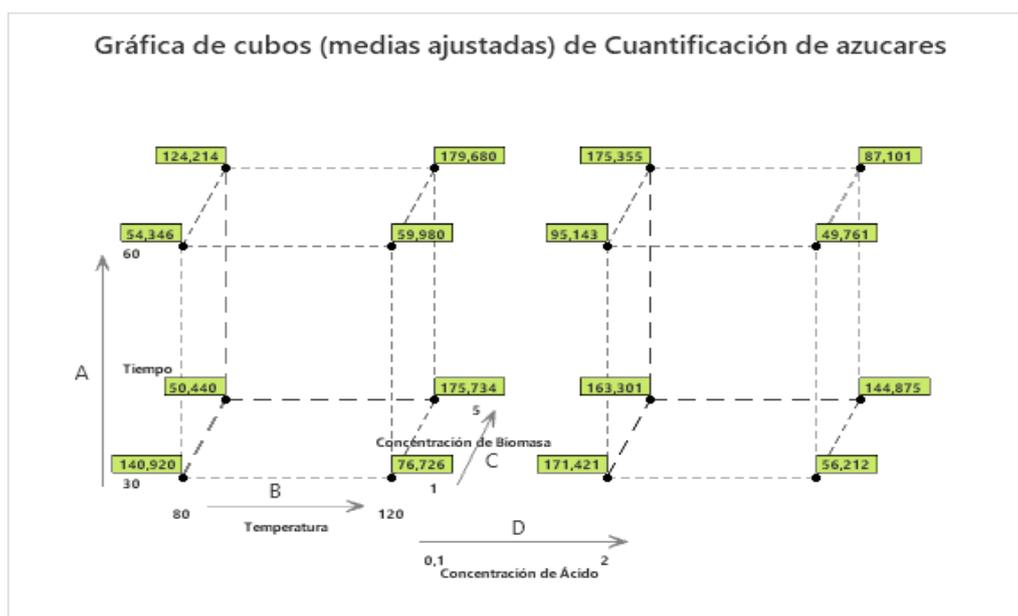


Figura 29. Gráfica de cubos de cuantificación de azúcares.

4.1.9 Análisis de resultados de la hidrólisis ácida

El rendimiento de azúcares, con el mejor resultado alcanzado, mediante los parámetros obtenidos (120°C, 30min, 5% p/v concentración de biomasa y 0,1% v/v concentración de ácido) del diseño factorial 2^4 , fue 187,31 g/L de azúcares totales. La interacción de los factores como la temperatura y el tiempo es importante en el rendimiento, debido a que, a tiempos menores aumenta el rendimiento y a mayores temperaturas, mayor es el rendimiento de azúcares (Sigüencia et al., 2018). Esto se cumple en esta experimentación con los residuos de brócoli confirmando esta relación mediante la gráfica de interacciones (Figura 28), cuyo resultado favorable se asemeja a los parámetros (150°C, 1.84% biomasa; 0,54% ácido, 90min) usados en el estudio de la Hidrólisis ácida de cascarilla de arroz, en el que obtiene mayor rendimiento cuando se cumple esta relación entre el tiempo y la temperatura (Sigüencia et al., 2018).

Así mismo, la concentración de ácido es otro factor a controlar pues determina un mayor o menor rendimiento; como en el caso de estudio de hidrólisis ácida de microalgas estudiada por Rumiche et al. (2021) en el cual se obtienen mejores resultados con mayor concentración de ácido sulfúrico y tiempo de hidrólisis. Sin embargo, se debe tener en cuenta que, en condiciones extremas de hidrólisis, como el aumentar la concentración del ácido puede desfavorecer el rendimiento de azúcares, debido a que este exceso puede ocasionar la degradación de estos azúcares a otros productos como el furfural, hidroximetilfurfural y compuestos fenólicos, así lo mencionan Sánchez & Vázquez (2017) en su estudio de hidrólisis ácida de residuos de naranja. Los valores utilizados en los estudios con la cantidad de ácido empleada en el presente estudio (0,1% v/v) de ácido sulfúrico se comprobó la relación de que a menor cantidad de ácido mejores son los resultados en la obtención de azúcares.

En esta experimentación con residuos de brócoli se demostró que un tiempo de 30 minutos es adecuado, lo que podría resultar en un menor costo energético siendo un resultado positivo en aplicaciones industriales, puesto que la influencia del tiempo no determina mayor diferencia en el aumento de los resultados durante la hidrólisis ácida como en el caso de la biomasa de hojas de eucalipto estudiada por Gutiérrez et al. (2017) que menciona que al aplicar menor tiempo (30 minutos) se obtiene una cantidad aceptable de azúcares, cuantificada como sólidos solubles (6,2 °Brix).

Con respecto al rendimiento de azúcares obtenidos en esta experimentación (187,31 g/L) en el que se incluyen las hojas y los tallos se observa un incremento considerable comparado al obtenido por Vargas Rico et al. (2022) en el que utilizó solamente las hojas del brócoli y obtuvo azúcares reductores con una concentración de ácido sulfúrico 0,5% v/v; esta concentración

se utilizó en esta experimentación comprobando que la misma es favorable para obtener un buen rendimiento de operación en la hidrólisis ácida. A diferencia de este autor este estudio aprovechó el uso tanto de las hojas como de los tallos lo que incrementó significativamente el rendimiento de azúcares, además se está cuantificando la totalidad de azúcares lo que justifica el resultado más alto.

4.2 Hidrólisis Enzimática

En el sustrato del experimento 6, que presentó los mejores resultados después de someter la muestra de biomasa al pretratamiento de hidrólisis ácida (187,31 g/L), se llevó a cabo la hidrólisis enzimática bajo las siguientes condiciones controladas: temperatura de 50 ± 5 °C, pH de 4,8; agitación a 600 rpm en ambiente anaeróbico, y se obtuvieron los siguientes resultados por triplicado, presentados en la Tabla 24.

Tabla 24. Resultados de la cuantificación de azúcares para la hidrólisis enzimática.

Carga enzimática <i>Cellic Ctec2</i>	Hidrolizado filtrado (3%)	Buffer de citrato de Sodio	Tiempo	Réplicas			Cuantificación de azúcares* (mg/ml o g/L)	Desviación Estándar
				(mg/ml)				
				1	2	3		
1ml	3ml	96ml	1h	41,03	44,21	46,98	220,4	2,975797

Nota: *Se obtiene multiplicando el promedio por el factor de dilución (5000) y convirtiendo a las unidades correspondientes.

4.2.1 Análisis de resultados de la hidrólisis enzimática.

El rendimiento se incrementó notablemente en este sustrato específico, alcanzando una cantidad de azúcares resultante de 220,4 g/L; como se puede observar en la Tabla 24. Así lo sugieren Sánchez & Vázquez (2017) en un estudio realizado a residuos de cáscara de naranja, al generar un rendimiento promedio solamente aplicando el pretratamiento y señalan que se puede incrementar el total de azúcares complementando este resultado con la hidrólisis enzimática; partiendo de cargas enzimáticas según sea el caso es decir el tipo de biomasa a emplear. Aplicando este criterio se trabajó con una carga enzimática de la enzima *Cellic Ctec2* de 1 ml, en 3% de sustrato hidrolizado y para mantener el pH entre 4,5 y 5 se utilizó una solución Buffer de citrato de potasio de pH igual a 4,8 durante 60 minutos a una temperatura de 50°C. Este resultado equivale a un aumento del 17.7% con respecto a lo obtenido por la hidrólisis ácida. Según, Gilon Salazar (2022) aplicando la hidrólisis enzimática da lugar a un mayor rendimiento de azúcares que se comprueba con los resultados obtenidos. Además, en un estudio realizado por este autor; para determinar el potencial de hojas de

eucalipto como materia prima para producción de polialcoholes declara que puede existir pérdida de azúcares en procesos posteriores para su producción (detoxificación, centrifugación y clarificación) en los que se reduce la cantidad de azúcares obtenidos, por ello conseguir la máxima producción al complementar con la hidrólisis enzimática se asegura mejor rendimiento en la producción del producto final. Este tratamiento de hidrólisis enzimática, disminuye las posibles pérdidas que puedan dar a lugar procesos posteriores para obtener productos de valor como en el caso de este estudio en la obtención de azúcares a partir de residuos de brócoli como materia prima en la producción de etanol.

En esta experimentación con residuos de brócoli (hojas y tallos) se obtuvo mayor cantidad de azúcares totales después de la hidrólisis enzimática aplicando 1 ml enzima, 3 ml de sustrato/biomasa y 96 ml de Buffer, 60 min, 50 °C, contrario de la investigación realizada por Vargas Rico et al. (2022); que evalúa la producción de azúcares en el que solamente emplea las hojas de brócoli, en el cual la obtención de azúcares con respecto a la etapa de la hidrólisis enzimática (5 min, 10µl de enzima; 0,03 ml de biomasa), disminuyó de 0,5 g/L de azúcares obtenida en la hidrólisis ácida a $0,454 \pm 0,004$ g/L obtenida en la hidrólisis enzimática, y expresa que esto puede ocurrir debido a las interferencias de sustancias inhibitoras producidas en el pretratamiento e indica que se deben hacer pruebas con tiempos mayores, debido a esto en esta experimentación se realizaron pruebas previas en las cuales cuando se realizó durante 60 minutos resultó favorable.

En consecuencia, la etapa de producción de bioetanol a partir de biomasa lignocelulósicas que implica cuatro etapas principales: pretratamiento, hidrólisis enzimática, fermentación y destilación resultaría factible realizando el pretratamiento mediante hidrólisis ácida y posterior a ello la hidrólisis enzimática con los parámetros adecuados para este tipo de biomasa, presentados en la Tabla 24 (Soto-Romo et al., 2023).

4.3 Análisis de resultados de la obtención de harina/polvo

En esta sección se presentan los resultados de uno de los procesos propuestos para reducir el desperdicio de residuos de brócoli y la obtención de un producto de alto valor nutricional, elaborando una harina utilizando las hojas y tallos de esta hortaliza, considerados como residuos del brócoli. Debido a que esta hortaliza contiene una cantidad relevante de compuestos que promueven la salud, tal como lo menciona Ares et al. (2013), en su estudio resalta la cantidad de investigaciones sobre los beneficios y aplicaciones de la misma, así como las diferentes técnicas de extracción y caracterización de sus compuestos de valor. Los valores resultantes del análisis fisicoquímico son necesarios para comprender la calidad nutricional y las propiedades de la harina obtenida, que contribuye al desarrollo de alternativas

de aplicaciones de estos residuos. Según Krupa Kozak et al. (2019) menciona una de sus posibles aplicaciones y su potencial empleo del polvo de hojas de brócoli como reemplazo en el uso de almidones tradicionales de maíz y papa.

En la Tabla 25 se presentan los resultados del análisis bromatológico obtenidos por el laboratorio MSV de la harina de hojas y tallos de brócoli, que incluyen los valores de cenizas, fibra, grasa, humedad, proteína y carbohidratos, estos análisis se realizaron en una muestra de 100g de harina obtenida en la experimentación.

Tabla 25. Resultados del análisis bromatológico. **Fuente:** MSV laboratorio.

Análisis Físico - Químico					
Parámetros	Metodologías	Unidad	Resultado	U(k=2)	
Cenizas	AOAC 923.03 - Gravimetría	%	8,724	±9,3%	
Fibra	NTE INEN-ISO 6865 - Gravimetría	%	26,766	-	
Grasa	AOAC 920.85 - Gravimetría	%	1,001	-	
Humedad	AOAC 925.10 - Gravimetría	%	0,623	±4,28	
Proteína	AOAC 991.20 - Volumetría	%	37,306	-	
Carbohidratos Totales	Cálculo proximal - Cálculo	%	25,58	-	

Nota: U:Incertidumbre

Esta harina fue elaborada por el método de Liofilización planteado por Quishpe Guanotuña (2023) en el cual realiza harina de brócoli fresco a partir de este método, así como en el estudio de Drabińska et al. (2018) en el cual realiza la liofilización de hojas de brócoli y analiza sus propiedades y efectos en productos libres de gluten.

Los resultados del análisis bromatológico de la harina elaborada con hojas y tallos de brócoli se comparan con los resultados presentados en la Tabla 11 (Capítulo 2) en el que se presentan los valores de estas propiedades en harinas elaboradas a partir de distintas partes del brócoli por diferentes métodos de obtención, incluyendo la col morada como referencia dentro de la misma familia a la que pertenece el brócoli.

El contenido de cenizas obtenido (8,724±9,3%) es similar al que se obtuvo en la harina de col morada (8,71%) estudiada por Vázquez-García et al. (2023); sin embargo, debido a la variabilidad de este resultado en la desviación estándar se compara con el obtenido por Valenzuela (2010); quien realizó la harina usando el tronco de brócoli mediante secado por bandejas con un valor de cenizas de (14,93%) en donde no hay diferencia sustancial. Mientras que para los valores obtenidos por Ganchala Casa (2022); quien usa el rastrojo de brócoli y para Quishpe Mendoza (2021); quien usa las hojas obtiene valores muy bajos (8,57% y 1,44%) con respecto al obtenido en esta experimentación usando tanto hojas como tallos lo cual significa que se obtuvo una mejora en cuanto al contenido de cenizas, que refleja el contenido mineral de las muestras y la cantidad de minerales presentes, lo que indica la

importancia de un control preciso en el proceso de producción de harina (Salvatierra Hurtado, D., 2015).

El contenido de fibra de hojas y tallos obtenida en la harina experimental tiene un valor superior (26,766%) a todos los valores referenciales de la Tabla 11, el contenido de fibra mayor de esta lista es el reportado por Valenzuela (2010) quien realizó la harina a partir del tronco de brócoli que contiene 21,20%; le sigue el contenido de fibra de la harina elaborada a partir de rastrojo de brócoli con 15,29% estudiado por Ganchala Casa (2022), el de hojas de brócoli con 14,21% estudiado por Quishpe Mendoza, 2021; y en la harina de brócoli fresco por liofilización un valor de 12,66% reportado por Quishpe Guanotuña (2023). La harina experimental de tallo y hojas de brócoli mostró un contenido elevado de fibra lo que la convierte en una excelente fuente de este componente dietético (Berndtsson, 2019).

En cuanto al porcentaje de grasa, la harina realizada en esta experimentación se encuentra dentro del rango de la Tabla 11, el valor mínimo del porcentaje de grasa que se observa en la tabla de referencias es en la harina de col morada con 0,55% (Vázquez-García et al., 2023) y el valor más alto con 2,43% de grasa en la harina de brócoli fresco realizado por deshidratación por bandejas (Quishpe Guanotuña, 2023). La harina de brócoli experimental mostró un contenido reducido de grasa (1,001 %) similar al realizado por liofilización a partir de brócoli fresco con un valor de 1,13% (Quishpe Guanotuña, 2023), siendo adecuada para su uso en alimentos que requieren un bajo contenido de grasa (Córdova & Jácome, 2016).

La humedad de la harina obtenida experimentalmente es mínima (0,623%) en comparación a la realizada mediante secado al aire en el que usa hojas de brócoli cuya humedad es de 12,17% realizado por (Quishpe Mendoza, 2021), comprobando que este es el mejor método para obtener valores bajos de humedad, como en el caso de la harina de brócoli fresco secado por liofilización en donde su valor es del 6,10% reportado por Quishpe Guanotuña (2023). Este porcentaje de humedad es representativo dentro de las propiedades, debido a que es un indicador crítico para el almacenamiento y la vida útil de los productos; puesto que en la harina de residuos de brócoli experimental mostró un bajo contenido adecuado para el almacenamiento a largo plazo (Ballesteros et al., 2020).

En la harina a partir del residual de brócoli experimental, en cuanto al contenido de proteínas supera a todas las muestras analizadas en bibliografía, y se convierte en una importante fuente de proteínas. El valor más alto de la tabla de referencia es de 20,67% en la harina a partir del rastrojo de brócoli, esto quiere decir que el valor de proteínas es un valor alto en harinas a partir de brócoli (Ganchala Casa, 2022).

En la harina de hojas y tallos de brócoli experimental tiene un contenido total de carbohidratos de 25,58%, mientras que entre las muestras de referencia se tienen valores altos de carbohidratos puesto que en la harina de brócoli fresco secada en bandeja mostró el contenido más elevado de 64,47% (Quishpe Guanotuña, 2023) al igual que en la harina de hojas de brócoli con 53,17% de carbohidratos (Quishpe Mendoza, 2021) el valor más bajo lo reporta Valenzuela (2010) en la harina de tronco de brócoli con un valor de 41,34% , todos los valores mencionados difieren entre sí por la diferencia de materia prima y metodología de secado.

En el caso de los carbohidratos totales y de las proteínas, se obtiene un valor inferior y superior respectivamente, con respecto a la tabla referencial, por consiguiente, se sugiere analizar una mayor cantidad de muestras para comprobar estos resultados, y así poder descartar posibles interferencias en los métodos.

En cuanto a las variaciones en las propiedades de la harina obtenida experimentalmente a partir de hojas y tallos, como se detalla en la Tabla 25, se observan diferencias al comparar estos resultados con los valores de las hojas y tallos frescos. Estos últimos presentan un contenido de cenizas del 1,3% y 1,8%; fibra del 10,4% y 8,3%; grasa del 0,5% y 0,1%; humedad del 76,3% y 82,5%; proteína del 2,5% y 1%; carbohidratos del 9% y 6,3%, respectivamente, según lo informado por Rodríguez & Rojas (2022). Estas diferencias se atribuyen a la diversidad de la variedad del brócoli utilizada, y al emplear tanto tallos como hojas, se fortalecen estas propiedades en la harina resultante. En consecuencia, el producto final presenta una cantidad representativa de proteínas, fibra y carbohidratos totales y en menor porcentaje el contenido de cenizas y grasa.

4.4 Rendimiento del secado y producto.

De 1,43 kg de hojas y tallos de brócoli triturado se obtuvo un total de 107 g de harina liofilizada. Con un porcentaje de materia seca es decir del rendimiento total en cuanto a materia prima de 7,46%; este valor no difiere en un valor significativo con el rendimiento de harina de brócoli a partir de inflorescencias de brócoli, obtenido mediante el mismo método, estudiado por Quishpe Guanotuña (2023); el cual obtuvo el 11,20% de rendimiento. Esto quiere decir que se pueden usar tallos y hojas y se obtendrá un rendimiento similar que con la materia prima tradicional. La humedad del producto final experimental posee el 0,623% según los resultados del análisis bromatológico existiendo una reducción de humedad significativa de la inicial con 87,03% y aceptada según la normativa INEN 616 que establece los requisitos de calidad y seguridad alimentaria para la importación, producción y comercialización de harina en Ecuador, que permite un máximo de humedad del 14, 5%.

4.4.1 Humedad porcentual

Para determinar la humedad porcentual inicial se utilizó la siguiente fórmula (Quishpe Guanotuña, 2023).

$$Ho\% = p1 - p2/p1 * 100 \quad (\text{Ecuación. 5})$$

Donde:

$p1$ = peso inicial de la muestra en gramos

$p2$ = peso después de liofilizar en gramos

Sustituyendo los valores en la fórmula:

$$Ho\% = 1247,34/1433,165 * 100$$

$$Ho\% = 87,03\%$$

Esto indica que la humedad inicial era aproximadamente 87,03%

4.4.2 Rendimiento de la materia prima (%)

El rendimiento se calculó utilizando la fórmula (Vázquez-García et al., 2023) :

$$\text{Rendimiento (\%)} = \text{Peso útil}/P1 \text{ total} * 100 \quad (\text{Ecuación. 6})$$

Donde:

Peso útil = peso final de la harina obtenida en gramos.

$P1 \text{ Total}$ = peso de la materia prima inicial en gramos.

Sustituyendo los valores en la fórmula:

$$R = 107 \text{ g}/1433,165\text{g}$$

$$R = 7,46\%$$

El rendimiento del proceso de liofilización fue de 7,46%.

Capítulo 5. Conclusiones y Recomendaciones

5.1 Conclusiones

La obtención de azúcares a partir de residuales de brócoli (hojas y tallos) resultó favorable y fue realizada de manera eficiente mediante el pretratamiento con ácido y complementada con la hidrólisis enzimática. La aplicación del diseño factorial 2^4 permitió identificar los parámetros óptimos, destacando la temperatura de 120°C, el tiempo de 30 minutos, una concentración de biomasa del 5% p/v y una concentración de ácido del 0,1% v/v. Esta configuración resultó en un rendimiento significativo de azúcares totales, alcanzando 187,31 g/L. La hidrólisis enzimática posterior, bajo condiciones específicas, mejoró aún más el rendimiento, logrando un aumento del 17%, obteniendo un total de 220,4 g/L de azúcares fermentables.

En cuanto a la elaboración de harina a base de hojas y tallos de brócoli se cumplió mediante la aplicación del proceso de liofilización a estos residuos de brócoli, dando como resultado la obtención de una harina de calidad. El rendimiento de liofilización fue del 7,46%, conservando las propiedades nutricionales y prebióticas propias del brócoli. La harina resultante mostró características favorables, como bajos niveles de humedad (0,623%) cumpliendo con normativas ecuatorianas, y porcentajes representativos de cenizas (8,724%), fibra (26,766%), proteínas (37,306%), y carbohidratos totales (25,58%); estos valores posicionan la harina como un producto versátil y de alto valor nutricional.

La comparación detallada de las propiedades de los productos obtenidos con información secundaria fundamenta la viabilidad y potencial industrial de los mismos. La concentración de azúcares, las características fisicoquímicas de la harina, y la evaluación de las normativas aplicadas indican que ambos productos poseen cualidades que los hacen aptos para diversas aplicaciones. Los azúcares fermentables derivados podrían contribuir al desarrollo de biocombustibles, mientras que la harina de residuos de brócoli podría incorporarse en la industria alimentaria, nutracéutica y cosmética, destacando la importancia de la sostenibilidad y la utilización eficiente de los residuos agroindustriales.

5.2 Recomendaciones

- Realizar experimentaciones con distintos valores de presión en la hidrólisis ácida y determinar si es factor significativo para la cuantificación de azúcares.
- Contrastar los resultados de la hidrólisis enzimática obtenidos en esta investigación empleando diferentes enzimas con la finalidad de mejorar los resultados.

- Replicar las experimentaciones en equipos de laboratorio donde se pueda tener un mayor control de los factores de las hidrólisis, ya que se presentaron desviaciones estándares altos en algunos resultados debido a algunos equipos.
- Determinar los azúcares presentes en el producto y evaluar su comportamiento en procesos posteriores como la fermentación para la obtención de biocombustibles.
- Evaluar el posible empleo de la harina en complementos alimenticios para mejorar la ingesta de fibra de la población.
- Realizar un análisis microbiológico de la harina antes de su uso en productos alimenticios, pese a que se rigieron estrictas normativas de limpieza y descontaminación en su realización se debe descartar cualquier posible contaminación cruzada.
- Realizar el análisis bromatológico con más de una experimentación de la elaboración de harina, para confirmar las cantidades de sus propiedades fisicoquímicas.
- Evaluar el contenido de furfural u otros productos de degradación obtenidos en las hidrólisis realizadas.

Referencias

- Abolore, R. S., Jaiswal, S., & Jaiswal, A. K. (2023). Green and Sustainable Pretreatment Methods for Cellulose Extraction from Lignocellulosic Biomass and its Applications: A Review. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications*, 100396.
- Acosta-Velarde, J., Guamán-Lozano, Á., & García-Flores, A. (2021). Control de factores para la operación óptima del proceso de inyección de plástico mediante diseño factorial. *UTCiencia*, 8(1), 12-25.
- Agroactivo. (2023). *Brócoli Domador*. Agroactivo. <https://agroactivocol.com/producto/material-vegetal/semillas/hortalizas/brocoli-domador/>
- AIE, *Emisiones globales de CO2 procedentes de la combustión de energía y procesos industriales, 1900-2022*, AIE, París <https://www.iea.org/data-and-statistics/charts/global-co2-emissions-from-energy-combustion-and-processes-industriales-1900-2022>, AIE. Licencia: CC BY 4.0
- Albán Rocha, E. J., & Velásquez Rodríguez, K. N. (2019). *Caracterización de los desechos de la industria brecolera Nintanga, para su reutilización y generación de alimento para cerdos* (Bachelor's thesis, Ecuador: Latacunga: Universidad Técnica de Cotopaxi (UTC)).
- Álvarez-Gil, L., Guerra-Sandoval, J., & Rojas-Reyes, N. (2018). Diseño factorial 2 k aplicado a la caracterización reológica de suspensiones de caolín. *Prospectiva*, 16(1), 18-25.
- AOAC International (2005a). Official methods of analysis of AOAC International. Association of Official Analytical Chemists. *Official Method 925.10-1925, Solids (total) and loss on drying (moisture)*. Washington DC.
- AOAC International (2005b). Official methods of analysis of AOAC International. Association of Official Analytical Chemists. *Official Method 923.03-1923, Ash of flour. Direct method*. Washington DC.
- AOAC International (2005c). Official methods of analysis of AOAC International. Association of Official Analytical Chemists. *Official Method AOAC 920.85-1920, Fat (crude) or ether extract in flour*. Washington DC.

- AOAC International (2005d). Official methods of analysis of AOAC International. Association of Official Analytical Chemists. *Official Method AOAC 991.20-1994(1996), Nitrogen (total) in milk. Kjeldahl method*. Washington DC.
- Ares, A. M., Nozal, M. J., & Bernal, J. (2013). Extraction, chemical characterization and biological activity determination of broccoli health promoting compounds. *Journal of Chromatography A*, 1313, 78-95. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.07.051>
- Arismendy, A. M., Villa Retrepo, A. F., Alcaraz, W., Chamorro, E. R., & Area, M. C. (2019). Optimización de la hidrólisis enzimática de la cascarilla de arroz. *Revista de Ciencia y Tecnología*, 32, 1-10.
- Banco Central del Ecuador (BCE). (2019). *Información Estadística Mensual. Banco Central del Ecuador* (BCE). <https://contenido.bce.fin.ec/home1/estadisticas/bolmensual/IEMensual.jsp>
- Ballesteros Martín, M. de la M., Andrada Franco, F., & De La Rosa Herrera, M. (2020). Comparative study of different methods for determining moisture in different food matrices. *Biosaia: Revista De Los másteres De Biotecnología Sanitaria Y Biotecnología Ambiental, Industrial Y Alimentaria*, (9). <https://www.upo.es/revistas/index.php/biosaia/article/view/4769>
- Barbosa-Cánovas, G. V., Ortega-Rivas, E., Juliano, P., & Yan, H. (2005). Particle Properties. En *Food Powders: Physical Properties, Processing, and Functionality* (pp. 19-54). Springer US. https://doi.org/10.1007/0-387-27613-0_2
- Barzola, C. R. (2021). Diseño de experimentos y análisis de conjunto. En *Editorial Universidad Ecotec*. Editorial Universidad Ecotec. <https://doi.org/10.21855/librosecotec.73>
- Berndtsson, E. (2019). Dietary fibre and phenolic compounds in broccoli (*Brassica oleracea Italica* group) and kale (*Brassica oleracea Sabellica* group). A literature study about the potential uses of side streams. *Alnarp: Sveriges lantbruksuniversitet. (Introductory paper at the Faculty of Landscape Architecture, Horticulture and Crop Production Science, 2019:1)*. https://pub.epsilon.slu.se/16184/7/Berndtsson_E_190531.pdf
- Benítez, R. O. (2018). Losses and food waste in Latin America and the Caribbean. Roma, *Italia: Food & Agriculture Org*. <http://www.fao.org/americas/noticias/ver/en/c/239392>.
- Bhatta, S., Stevanovic Janezic, T., & Ratti, C. (2020). Freeze-Drying of Plant-Based Foods. *Foods*, 9(1), 87. <https://doi.org/10.3390/foods9010087>

Boeco Balance BWL | *Boeco Alemania*. (s. f.). Recuperado 14 de agosto de 2023
<https://www.boeco.com/balances/boeco-bwl-models&sk=390>

Borja Martínez, M. (2023). *Aprovechamiento de los subproductos del brócoli como fuente de compuestos bioactivos*. Proyecto de investigación:
<https://digitum.um.es/digitum/handle/10201/131544>

Bousquet, J., Le Moing, V., Blain, H., Czarlewski, W., Zuberbier, T., de la Torre, R., Pizarro Lozano, N., Reynes, J., Bedbrook, A., Cristol, J. P., Cruz, A. A., Fiocchi, A., Haahtela, T., Iaccarino, G., Klimek, L., Kuna, P., Melén, E., Mullol, J., Samolinski, B., Valiulis, A., ... Anto, J. M. (2021). Efficacy of broccoli and glucoraphanin in COVID-19: From hypothesis to proof-of-concept with three experimental clinical cases. *The World Allergy Organization journal*, 14(1), 100498.
<https://doi.org/10.1016/j.waojou.2020.100498>

Campas-Baypoli, Olga N.; Sánchez-Machado, Dalia I.; Bueno-Solano, Carolina; Núñez-Gastélum, José A.; Reyes-Moreno, Cuauhtémoc; López-Cervantes, Jaime (2009). Biochemical composition and physicochemical properties of broccoli flours. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 60(s4), 163–173.
doi:10.1080/09637480802702015

Cellulase, enzyme blend. (s. f.). *Ficha técnica del producto*. Recuperado 9 de agosto de 2023, de <http://www.sigmaaldrich.com/>

Corredor, Y. A. V., & Pérez, L. I. P. (2018). Aprovechamiento de residuos agroindustriales en el mejoramiento de la calidad del ambiente. *Revista Facultad de Ciencias Básicas*, 59-72. <https://doi.org/10.18359/rfcb.3108>

Córdova & Jácome. (2016). *Validación del Método Gravimétrico para la determinación de grasa en el Laboratorio ECUACHEMLAB Cía. Ltda.* [bachelor Thesis, Universidad Técnica de Ambato. Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos. Carrera de Ingeniería Bioquímica].
<https://repositorio.uta.edu.ec:8443/jspui/handle/123456789/22871>

Cuautle, L., Torres, A., García, R. A., & González, J. E. (2016). Análisis de diseño factorial para mejorar la velocidad de un vehículo Baja SAE. *In Memorias del Congreso Internacional de Investigación Academia Journals*. Celaya, México (Vol. 8, No. 5, pp. 1286-1291).

- Cuesta, G., & Fusari, G. C. M. (2022). Nuevos aportes en la producción y procesamiento de Brócoli (*Brassica oleracea* L var. itálica Plenck): Una revisión. *Horticultura Argentina*, 41(106).<https://www.horticulturaar.com.ar/es/articulos/nuevos-aportes-en-la-produccion-y-procesamiento-de-brocoli-brassica-oleracea-l-var-italica-plenck-una-revision.html>
- Cuervo-Osorio, G. A., Escobar-Jaramillo, M., Ossa-Orozco, C. P. (2020). Diseño factorial 2k para la optimización de la síntesis de nanopartículas de plata para su aplicación en biomateriales. *Revista ION*, 33(1), 17-32. <https://doi.org/10.18273/revion.v33n1-2020002>
- Damas-Job, M. del C., Soriano-Melgar, L. de A. A., Rodríguez-Herrera, R., Peralta-Rodríguez, R. D., Rivera-Cabrera, F., & Martínez-Vazquez, D. G. (2023). Effect of broccoli fresh residues-based extracts on the postharvest quality of cherry tomato (*Solanum lycopersicum* L.) fruits. *Scientia Horticulturae*, 317, 112076. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2023.112076>
- Damien, A. (2010). *La Biomasa: fundamentos, tecnología y aplicaciones*. (1a ed. 2010). AMV Ediciones.
- Drabińska, N., Ciska, E., Szmatołowicz, B., & Krupa-Kozak, U. (2018). Broccoli by-products improve the nutraceutical potential of gluten-free mini sponge cakes. *Food Chemistry*, 267, 170-177. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.08.119>
- Dessie, W., Luo, X., He, F., Liao, Y., Duns, G. J., & Qin, Z. (2023). *Lignin valorization: A crucial step towards full utilization of biomass, zero waste and circular bioeconomy. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 51, 102777. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2023.102777>.
- Epigmenio, H. H. (2013). El Cultivo de Brócoli (*Brassica oleraceae italica*) para Exportación en el Norte del Estado de Guanajuato. *En H. H. Epigmenio, El Cultivo de Brócoli . Guanajuato: Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro*.
- Espinosa Negrín, A. M., López González, L. M., Casdelo Gutiérrez, N. L. (2021). Pretratamiento de biomásas lignocelulósicas: *Breve revisión de los principales métodos utilizados. Centro Azúcar*, 48(3), 108-119.
- Federación Ecuatoriana de Exportadores (Fedexpor). (2022). <https://www.fedexpor.com/inteligencia-comercial/reporte-expordata/>
- Fernández Salgado, J. M. (2009). *Tecnología de las energías renovables* (No. 333.794 F4T4).

Fernández Bao, S. (2020). *Diseño de experimentos: Diseño factorial* [Master thesis, Universitat Politècnica de Catalunya]. <https://upcommons.upc.edu/handle/2117/339723>

Ganchala Casa, D. R. (2022). *Utilización de bloques nutricionales con la adición de tres niveles de harina de brócoli (Brassica oleracea) en la alimentación de cuyes (Cavia porcellus) en fase de crecimiento engorde, en la Provincia de Cotopaxi, Cantón Pujilí, Barrio El Tejar* [bachelor Thesis, Ecuador: Latacunga: Universidad Técnica de Cotopaxi (UTC)]. <http://repositorio.utc.edu.ec/handle/27000/8998>

García Martínez, E. M., & Fernández Segovia, I. (2012). *Determinación de proteínas de un alimento por el método Kjeldahl. Valoración con un ácido fuerte*. <https://riunet.upv.es/handle/10251/16338>

Ghimire, U., Pliakoni, E., Yu, F., Brecht, J. K., & Liu, T. (2023). Identifying genes regulated during natural, on-plant senescence in broccoli (*Brassica oleracea*) in contrast to postharvest senescence. *Postharvest Biology and Technology*, 206, 112535.

Gilon Salazar, D. V. (2022). *Modelamiento de un reactor percolador para la hidrólisis de la hoja de mazorca* [Trabajo de grado - Maestría, Universidad Nacional de Colombia]. <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/83767>.

Golli, R., Thummaneni, C., Pabbathi, D. D., Srungarapu, T., Jayasri, G., & Vangalapati, M. (2023). Silver nanoparticles synthesized by *Brassica oleracea* (Broccoli) acting as antifungal agent against *Candida albicans*. *Materials Today: Proceedings*, 80, 1495-1500. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2023.01.284>

Google Maps. (2023a). Facultad de Ciencias de la Hospitalidad Universidad de Cuenca [Mapa online]. Cuenca, Ecuador, de: https://www.google.com/maps/place/Facultad+de+Ciencias+de+la+Hospitalidad+Universidad+de+Cuenca/@-2.8913528,-79.0096126,17z/data=!3m1!4b1!4m6!3m5!1s0x91cd1812d92e2765:0x9ed0b5e1cea1ac0c!8m2!3d-2.8913582!4d-79.0070377!16s%2Fg%2F12637_68_?entry=ttu

Google Maps. (2023b). Facultad de Ciencias Químicas Tecnológico [Mapa online]. Cuenca, Ecuador, de: https://www.google.com/maps/place/Facultad+De+Ciencias+Qu%C3%ADmicas+Tecnol%C3%B3gico/@-2.9007817,-79.0152661,17z/data=!3m1!4b1!4m6!3m5!1s0x91cd19def8044471:0x7585830dda95a155!8m2!3d-2.9007871!4d-79.0126912!16s%2Fg%2F11f61zq_3_?entry=ttu

- Gorozabel, B. P. L., Reyes, E. R., & Parra, J. C. P. (2022). TRANSFORMACIÓN DE BIOMASA LIGNOCELULÓSICA EN BIOCOMBUSTIBLE DE SEGUNDA GENERACIÓN: ESTADO DEL ARTE DEL PRETRATAMIENTO. *Revista Bases de la Ciencia*, 7(ESPECIAL), Article ESPECIAL. <https://doi.org/10.33936/revbasdelaciencia.v7i3.4243>
- Guarnizo Franco, A., Martínez Yépes, P. N., Valencia Sánchez, H. A. (2009). PRETRATAMIENTOS DE LA CELULOSA Y BIOMASA PARA LA SACARIFICACIÓN. *Scientia Et Technica*, XV(42), 284-289.
- Guncay Buestán, J. V., & Silva Ibarra, M. V. (2018). *Optimización de la producción de biomasa en procesos fermentativos del mucílago de cacao CCN – 51 aplicando la ecuación logística integrada y el modelo de Andrew y Levenspiel, bajo diferentes condiciones de operación*. <http://dspace.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/30426>.
- Gundupalli, M. P., & Bhattacharyya, D. (2019). Sequential acid hydrolysis and enzymatic saccharification of coconut coir for recovering reducing sugar: Process evaluation and optimization. *Bioresource Technology Reports*, 6, 70-80.
- Gutiérrez, J. A., Reyes, H., & Castañeda, J. F. (2017). Análisis fisicoquímico de las hojas de eucalipto camaldulensis y su hidrolizado, como sustrato en la producción de xilitol. *Entre Ciencia e Ingeniería*, 11(22), 76-83.
- Gutiérrez, P. H., & De La Vara, S. R. (2008). *Análisis y diseño de experimentos*. Editorial McGraw Hill.
- IndexBox. (2020). *Mexican Cauliflower And Broccoli Growers Enjoy Rising Demand in the U.S., the Fastest-Growing Importer*. Global Trade Magazine. <https://www.globaltrademag.com/mexican-cauliflower-and-broccoli-growers-enjoy-rising-demand-in-the-u-s-the-fastest-growing-importer/>
- Instituto de Promoción de Exportaciones e Inversiones (PRO ECUADOR). (2018). *Estudio de brócoli en Corea del Sur*. <https://www.proecuador.gob.ec/brocoli-en-corea-del-sur/>
- Keck, A. S., & Finley, J. W. (2004). Cruciferous vegetables: cancer protective mechanisms of glucosinolate hydrolysis products and selenium. *Integrative Cancer Therapies*, 3(1), 5-12.
- Koh, J. C., Barbulescu, D. M., Norton, S., Redden, B., Salisbury, P. A., Kaur, S., & Slater, A. T. (2017). A multiplex PCR for rapid identification of Brassica species in the triangle of U. *Plant Methods*, 13, 1-8.

- Krupa-Kozak, U., Drabińska, N., Rosell, C. M., Fadda, C., Anders, A., Jeliński, T., & Ostaszyk, A. (2019). Broccoli leaf powder as an attractive by-product ingredient: Effect on batter behaviour, technological properties and sensory quality of gluten-free mini sponge cake. *International Journal of Food Science & Technology*, 54(4), 1121-1129. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13972>
- Langston, F., Redha, A. A., Nash, G. R., Bows, J. R., Torquati, L., Gidley, M. J., & Cozzolino, D. (2023). Qualitative analysis of broccoli (*Brassica oleracea* var. *Italica*) glucosinolates: Investigating the use of mid-infrared spectroscopy combined with chemometrics. *Journal of Food Composition and Analysis*, 123, 105532.
- Le Gall, J. (2009). El brócoli en Ecuador: la fiebre del oro verde. *Anuario americanista europeo*, (6-7), 261-288.
- Liao, Y., de Beeck, B. O., Thielemans, K., Ennaert, T., Snelders, J., Dusselier, M., Courtin, C. M., & Sels, B. F. (2020). The role of pretreatment in the catalytic valorization of cellulose. *Molecular Catalysis*, 487, 110883. <https://doi.org/10.1016/j.mcat.2020.110883>
- Liofilizador de Laboratorio con cámara de 38,5 x 30 cm de diámetro. (s. f.). *TecnoEdu.com*. Recuperado 09 de agosto de 2023, de <https://tecnoedu.com/Armfield/FT33MkIIA.php>
- Liu, M., Zhang, L., Ser, S. L., Cumming, J. R., & Ku, K.-M. (2018). Comparative phytonutrient analysis of broccoli by-products: *The potentials for broccoli by-product utilization*. *Molecules*, 23(4), 900
- López-Legarda, X., Taramuel-Gallardo, A., Arboleda-Echavarría, C., Segura-Sánchez, F., & Restrepo-Betancur, L. F. (2017). Comparación de métodos que utilizan ácido sulfúrico para la determinación de azúcares totales. *Revista Cubana de Química*, 29(2), 180-198.
- López-Miranda, J., Soto-Cruz, N. O., Rutiaga-Quiñones, O. M., Medrano-Roldán, H., & Arévalo-Niño, K. (2009). Optimización del proceso de obtención enzimática de azúcares fermentables a partir de aserrín de pino. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 25(2), 95-102.
- Madrid Vicente, A. (2012). *La biomasa y sus aplicaciones energéticas* (No. 333.9539 M183b). Madrid, ES: AMV Ed., 2012.

- Malik, K., Sharma, P., Yang, Y., Zhang, P., Zhang, L., Xing, X., & Li, X. (2022). Lignocellulosic biomass for bioethanol: Insight into the advanced pretreatment and fermentation approaches. *Industrial Crops and Products*, 188, 115569.
- Manrique, S. M. (2017). *Biomasa con fines energéticos: Recursos, potencialidad y cambio climático*. Universidad Tecnológica Nacional. ISBN: 978-987-1896-41-7
- Manzanares, P., Ballesteros, I., Negro, M. J., González, A., Oliva, J. M., & Ballesteros, M. (2020). Processing of extracted olive oil pomace residue by hydrothermal or dilute acid pretreatment and enzymatic hydrolysis in a biorefinery context. *Renewable Energy*, 145, 1235-1245.
- Market Data Forecast (MDF) (2023). *Cauliflower and Broccoli Market | Share, Growth | 2022 – 2027*. <http://www.marketdataforecast.com/>
- Ministerio de agricultura y ganadería (MAG) (2021). *Boletín Situacional Brócoli*. Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación. Obtenido de: http://sipa.agricultura.gob.ec/boletines/situacionales/2021/boletin_situacional_brocoli_2021.pdf
- Manals-Cutiño, E., Salas-Tort, D., & Penedo-Medina, M. (2019). Characterization of vegetable biomass coffee husk. *Chemical Technology*, 39(1), 192-207. <https://doi.org/10.1590/2224-6185.2019.1.%x>
- Montgomery, D. C. (2004). *Diseño y análisis de experimentos*. México, D.F.: Limusa Wiley.
- Navarro Llorens, J., Gouveia, L., & Cytel, R. (2022). *Protocolos de microalgas de la Red Renuwal-I*. Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el D. <https://repositorio.Ineg.pt/handle/10400.9/3874>
- NTE INEN (2013). *Harinas de origen vegetal. Requisito 517*. Norma Técnica Ecuatoriana. NTE INEN.
- NTE INEN (2015). *Harinas de trigo. Requisitos 616*. Norma Técnica Ecuatoriana. NTE INEN.
- Nunes, L. J. R., Causer, T. P., & Ciolkosz, D. (2020). Biomass for energy: A review on supply chain management models. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 120, 109658.
- Okonkwo, C. E., Hussain, S. Z., Manzoor, S., Naseer, B., Taiwo, A. E., Ayyash, M., Al-Marzouqi, A. H., & Kamal-Eldin, A. (2023). A comprehensive review on the use of deep eutectic solvents for biomass processing, and the synergistic coupling with physical

technology and biological method. *Bioresource Technology Reports*, 23, 101577. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2023.101577>

Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). (2020). Poner fin al hambre, lograr la seguridad alimentaria y la mejora de la nutrición y promover la agricultura sostenible. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura <https://www.fao.org/news/story/es/item/1310444/icode/>

Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). (2022). *Agricultural production statistics 2000–2021*. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>

Orrego, C. (2008). *Congelación y liofilización de alimentos*. Universidad Nacional de Colombia.

Ortiz Huamani, H. (2019). *Abonamiento orgánico y químico en el cultivo de brócoli (Brassica oleracea L.) en la comunidad campesina de Los Ángeles, Huancarama-Andahuaylas-Apurímac*. Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco. <https://repositorio.unsaac.edu.pe/handle/20.500.12918/4186>

Oyinloye, T. M., & Yoon, W. B. (2020). Effect of freeze-drying on quality and grinding process of food produce: A review. *Processes*, 8(3), 354.

Pelaez Samaniego, M. R., Yadama, V., Lowell, E., & Espinoza Herrera, R. (2013). A review of wood thermal pretreatments to improve wood composite properties. *Wood Science and Technology*, 47, 1285-1319.

Pinto, E., Aggrey, W. N., Boakye, P., Amenuvor, G., Sokama-Neuyam, Y. A., Fokuo, M. K., ... & Rockson, M. A. D. (2022). Cellulose processing from biomass and its derivatization into carboxymethylcellulose: A review. *Scientific African*, 15, e01078.

Prieto-Sandoval, V., Jaca, C., & Ormazabal, M. (2017). Economía circular: Relación con la evolución del concepto de sostenibilidad y estrategias para su implementación - Circular economy: Relationship with the evolution of the concept of sustainability and strategies for its implementation. *Memoria Investigaciones En Ingeniería*, 15.

Puente Urbina, A. (2022). Caracterización de biomásas lignocelulósicas y su procesamiento térmico: Estado y oportunidades en el Instituto Tecnológico de Costa Rica | *Revista Tecnología en Marcha*. <https://doi.org/10.18845/tm.v35i7.6343>

- Quevedo, T. (2013). *Agroindustria y concentración de la propiedad de la tierra: elementos para su definición y caracterización en el Ecuador*. CLACSO. Quito. Observatorio del Cambio Rural Instituto de Estudios Ecuatorianos Observatorio de Derechos Colectivos
- Quishpe Guanotuña, C. V. (2023). *Diseño de un proceso agroindustrial para la obtención de sopas deshidratadas a partir de brócoli*. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Riobamba.
- Quishpe Mendoza, X. C. (2021). *Harina de brócoli (Brassica oleracea var. Itálica) como aditivo fitobiótico en raciones para pollos de engorde*. [Master Thesis, Ecuador: Latacunga: Universidad Técnica de Cotopaxi; UTC.]. <http://repositorio.utc.edu.ec/handle/27000/7624>
- Ramírez, N. N., Paz, J. H., Granados, J. L. S., Ambriz, M. D. L. Á. R., Abdelkefi, A., & Monroy, D. C. (2015). Fabricación y caracterización de nanopartículas de sílice huecas para uso en aislantes térmicos mediante un análisis factorial. *CULCyT: Cultura Científica y Tecnológica*, 12(57), 114-124.
- Real Academia Española (RAE) (2023) *Diccionario de la lengua española*, 23.^a ed., [versión 23.6 en línea]. <<https://dle.rae.es>> [01 de junio del 2023].
- Reale, V. A., & Giner, S. A. (2021). Liofilización de frutillas. Modelado matemático del período de secado primario o de sublimación. *VI Jornadas de Investigación, Transferencia, Extensión y Enseñanza (ITEE)* (La Plata, 14 al 16 de septiembre de 2021). <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/128255>
- Rejón Segura, S. (2022). *Efecto de las condiciones de procesado sobre la cinética de secado y las propiedades antioxidantes de tallos de brócoli*. <https://riunet.upv.es/handle/10251/188210>
- Riera, M. A., Maldonado, S., & Palma, R. R. (2018). Residuos agroindustriales generados en Ecuador para la elaboración de bioplásticos. *Revista Ingeniería Industrial*, 17(3), 227–247.
- (Robot Coupe R2 DICE *Procesador Alimentos Monofásico Alimentación Conti*, s. f.) Recuperado 09 de agosto de 2023, de <https://kitchenmax.mx/products/robot-coupe-r2-dice-procesador-alimentos-monofasico-alimentacion-continua>
- Rodrigo Gómez, R. (2009). *Síntesis de resinas aniónicas con matriz de poli (estireno-co-divinilbenceno) y su aplicación en la absorción de proteínas*

[[Http://purl.org/dc/dcmitype/Text](http://purl.org/dc/dcmitype/Text), Universidad de Salamanca].
<https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=91248>

Rodríguez-Palleres, Ximena, & Rojas-González, Fancy. (2022). Valor nutricional de hojas y tallos de brócoli, apio y betarraga disponibles en un mercado mayorista de Santiago de Chile. *Memorias del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud*, 20(3), 97-107. <https://doi.org/10.18004/mem.iics/1812-9528/2022.020.03.97>

Roldán Vilorio, J. (2013). *Energías renovables. Lo que hay que saber*. Ediciones Paraninfo, SA.

Romero-Sáez, M. (2022). Los residuos agroindustriales, una oportunidad para la economía circular. *Tecnológicas*, 25(54). <https://doi.org/10.22430/22565337.2505>

Rojas Villa, C., Aguilar, L., & Tripaldi, P. (2010). Desarrollo y optimización de un producto untable a base de soya. *Revista Tecnológica ESPOL – RTE*, 23, 33-40.

Rumiche, J. A. S., Valdiviezo, A. C., & Najjar, R. I. S. (2021). Obtención de azúcares reductores por hidrólisis ácida a partir de un consorcio de microalgas amazónicas cultivadas en agua residual. *Revista Ciencia y Tecnología*, 17(4), 45-51.

Salvatierra Hurtado, D. (2015). *Determinación de la composición química proximal, carbohidratos totales, azúcares libres y fructanos del tipo inulina - fructooligosacáridos del yacón (Smallanthus sonchifolius (Poepp. et Endl.) H. Robinson)*. https://alicia.concytec.gob.pe/vufind/Record/RPCH_60eb0f8b6183bdc934376f95da7350c9

Samaniego, M. R. P., & Abad, J. L. E. (2015). *Energías renovables en el Ecuador. Situación actual, tendencias y perspectivas, vol 1*. Universidad de Cuenca.

Sánchez Orozco, R., & Vázquez Velázquez, J. (2017). Hidrólisis de residuos de naranja para la obtención de carbohidratos fermentables. *Revista de Investigación y Desarrollo*, 2(4), 63-70.

Santillan, J. (2021). *Comportamiento de dos variedades de brócoli con diferente distanciamiento de siembra en el centro experimental "Dr. Jacobo Bucaram Ortiz" [Universidad Agraria del Ecuador]*. Obtenido de: https://scholar.googleusercontent.com/scholar?q=cache:wFH3sGD9r2kJ:scholar.google.com/&hl=es&as_sdt=0,5&scioq=SANTILLAN+FREIRE+JHONNY+ARON+

- Santos Tanamachi, K., Alvarado Ahedo, N. C., Gárate Ruiz, J. R., Restrepo Elorza, M. del P., González Guerra, G. M., Gómez Castro, F. I., & Hernández Castro, S. (2022). Revaloración de residuos de fruta y verdura para la producción de biocombustibles. *JÓVENES EN LA CIENCIA*, 16. <https://www.jovenesenlaciencia.ugto.mx/index.php/jovenesenlaciencia/article/view/3654>
- Saval, S. (2012). Aprovechamiento de residuos agroindustriales: pasado, presente y futuro. *BioTecnología*, 16(2), 14-46.
- Sigüencia, J., Soler, J., & Menéndez, M. (2018). Hidrólisis ácida de cascarilla de arroz para la generación de azúcares reductores. *Jornada de Jóvenes Investigadores del I3A, VI*, 50-62.
- Sinche Arias, Danny Fabricio, Ramírez Peñaherrera, Valeria Estefanía, & Velalcázar Rhea, Cristhian Mauricio. (2022). Sacarificación y fermentación simultánea de la cáscara de *Jatropha curcas* pretratada hidrotérmica mente para producción de bioetanol. *Ingeniería*, 32(1), 19-32. <https://dx.doi.org/10.15517/ri.v32i1.46884>
- Sistema de Información Pública Agropecuaria del Ecuador (SIPA). (2021). *Cifras Agroproductivas*. <http://sipa.agricultura.gob.ec/index.php/cifras-agroproductivas>.
- Skoog, D. A. (2001). *Principios de Análisis Instrumental* (5ta ed. ed.). McGraw-Hill
- Soto-Romo, T. E., Gerónimo-Zavala, L. A., Romero-González, Y., Arias-Camacho, N. A., Xochihua-Naranjo, M. F., Falcón-García, C. G., & Molina-Guerrero, C. E. (2023). Del laboratorio a la simulación: Evaluación de pretratamientos para la obtención de bioetanol a partir de residuos de brócoli. *JÓVENES EN LA CIENCIA*, 21, 1-11. <https://www.jovenesenlaciencia.ugto.mx/index.php/jovenesenlaciencia/article/view/3963>
- Suárez Rumiche, J. A., Castillo Valdiviezo, A., & Souza Najar, R. I. (2021). Obtención de azúcares reductores por hidrólisis ácida a partir de un consorcio de microalgas amazónicas cultivadas en agua residual. *Revista CIENCIA Y TECNOLOGÍA*, 17(4), 45-51. <https://revistas.unitru.edu.pe/index.php/PGM/article/view/4064>
- Świątek, K., Gaag, S., Klier, A., Kruse, A., Sauer, J., & Steinbach, D. (2020). Acid hydrolysis of lignocellulosic biomass: Sugars and furfurals formation. *Catalysts*, 10(4), 437. <https://doi.org/10.3390/catal10040437>

Tamices de malla para pruebas de tamizado fiables, con calidad RETSCH. (s. f.).
<https://www.retsch.com/products/sieving/test-sieves/mesh-sieves-200-203-mm/>

Tamizadora AS 200 control—Retsch – el análisis por tamizado preciso. (s. f.).
<https://www.retsch.es/es/productos/tamizado/tamizadoras/as-200-control/>

Thermo Scientific & trade; Genesys & trade; 150 UV-Vis Spectrophotometer.
Recuperado 09 de agosto de 2023, de
<https://www.fishersci.es/shop/products/genesys-150-uv-vis-spectrophotometer-promo-4/16614932>

Tirado, K. H., González, M. E. P., Reyes, B. G., Montes, A. L., & González, A. G. (2022). Revalorización de residuos agroindustriales en la producción de pectinasas y xilanasas en fermentación sumergida con *Aspergillus niger* ATCC 6275. *Revista de Ciencias Farmacéuticas y Biomedicina* (ISSN: 2448-8380), 4(suplemento 1), 30-33.

Toledo, J. (2003). *Cultivo del brócoli.* In *Manual RI 2003; n. 01.* INIA. Estación Experimental Agraria Donoso-Huaral.

Tursi, A. (2019). A review on biomass: importance, chemistry, classification, and conversion. *Biofuel Research Journal*, 6(2), 962-979.

Vallejo López, Z. E. (2013). Evaluación de siete variedades de brócoli (*Brassica oleracea* var. *Itálica*) en dos localidades de Pichincha.
<http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/1386>

Valenzuela Amézquita, M. (2010). Composición química, valor nutricional y desarrollo de productos de harinas de flor, tallo y tronco de brócoli. [Thesis, Universidad del Valle de Guatemala]. <https://repositorio.uvg.edu.gt/xmlui/handle/123456789/436>

Vargas Rico, M. P., Díaz Rodríguez, A. G., Manríquez Zúñiga, A. N., Martínez Iñiguez, F. G., de la Cruz Bosques, A., Arenas Grimaldo, C., & Molina Guerrero, C. E. (2022). Evaluación de la producción de azúcares fermentables usando residuos de hojas de brócoli. *JÓVENES EN LA CIENCIA*, 16, 1–6.
<https://www.jovenesenlaciencia.ugto.mx/index.php/jovenesenlaciencia/article/view/3521>

Variedades Del Brócoli Imágenes y Fotos. (2023). 123RF. https://es.123rf.com/imagenes-de-archivo/variedades_del_brócoli.html

- Vázquez-García, J. A., Piloni-Martini, J., Quintero-Lira, A., Soto-Simental, S., & Ocampo-López, J. (2023). Evaluación fisicoquímica de harina de col morada (*Brassica oleracea* var. *Capitata* f. *Rubra*) para usos alternos. *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 8(1), Article 1. <https://doi.org/10.29105/idcyta.v8i1.31>
- Vázquez-González, C., Mejía-Garibay, B., Robles-López, M. R., & Ramírez-López, C. (2020). Impacto de las tecnologías de procesamiento del brócoli sobre compuestos fitoquímicos relevantes en salud humana: Una revisión. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, 21(2). <https://www.redalyc.org/journal/813/81365122003/html/>
- Vélez Duque, P. I., & Álava Murillo, A. (2021). Análisis de los canales de comercialización del brócoli en Ecuador. *Revista Tecnológica - ESPOL*, 33(3), 181–201. <https://doi.org/10.37815/rte.v33n3.857>
- Wadmare, V. B., Gadhe, K. S., & Joshi, M. M. (2019). Studies on physical and chemical composition of broccoli (*Brassica oleracea* L.). *International Journal of Chemical Studies*, 7(2), 825-828.
- Watkins, P., Hughes, J., Gamage, T. V., Knoerzer, K., Ferlazzo, M. L., & Banati, R. B. (2022). Long term food stability for extended space missions: a review. *Life sciences in space research*, 32, 79–95. <https://doi.org/10.1016/j.lssr.2021.12.003>
- Yang, Bin; Dai, Ziyu; Ding, Shi-You; Wyman, Charles E (2011). Enzymatic hydrolysis of cellulosic biomass. *Biofuels*, 2(4), 421–450. <https://doi.org/10.4155/bfs.11.116>
- Yeşilyurt, S. (2023). Phytoremediation Method and Brassica Family: Removal of Chromium, Cadmium and Lead Accumulation with Broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*). *Results in Chemistry*, 101005.
- Yan, L., Zhou, G., Shahzad, K., Zhang, H., Yu, X., Wang, Y., Yang, N., Wang, M., & Zhang, X. (2023). Research progress on the utilization technology of broccoli stalk, leaf resources, and the mechanism of action of its bioactive substances. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1138700. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1138700>
- Zamora, E. (2016). El cultivo del brócoli. *Departamento de Agricultura y Ganadería de la Universidad de Sonora-Hermosillo. Campo*, 1-8. [https://scholar.googleusercontent.com/scholar?q=cache:M7kQ-oxFa5oJ:scholar.google.com/&hl=es&as_sdt=0,5&scioq=Zamora,+E.+\(2016\).+El+cul](https://scholar.googleusercontent.com/scholar?q=cache:M7kQ-oxFa5oJ:scholar.google.com/&hl=es&as_sdt=0,5&scioq=Zamora,+E.+(2016).+El+cul)

tivo+del+br%C3%B3coli.+Departamento+de+Agricultura+y+Ganader%C3%ADa+de
+la+Universidad+de+Sonora-Hermosillo.+Campo,+1-8.

Zhao, X., Zhou, H., Sikarwar, V. S., Zhao, M., Park, A. H. A., Fennell, P. S., ... & Fan, L. S. (2017). Biomass-based chemical looping technologies: the good, the bad and the future. *Energy & Environmental Science*, 10(9), 1885-1910.

Anexos

Anexo A. Equipos



Procesador de alimentos Robot Coupe R2, disco de corte de 5/32 plg. y potencia de 1000W.



Desecador GANDER MTN modelo CD80.



Tamizadora analítica de la serie AS 200, tamices ASTM E11 con malla N° 60, 35, 18 ,amplitud controlada.



Liofilizador Armfield, modelo FFT33-B, serie: 35137-001.



Reactor Batch.



Agitador digital de placa de cocción Scilogex MS7-H550-Pro 7x7 LCD.



Espectrofotómetro Vis/UV-Vis GENESYS™ 140/150, marca Thermo Scientific™ 840-300300.



Balanza de precisión modelo BOECO BWL 61.

Anexo B. Metodología

Obtención de azúcares



Preselección de hojas y tallos.



Lavado y corte.



Triturado de biomasa fresca.



Secado y triturado de la biomasa seca.



Peso de Biomasa seca.



Hidrólisis ácida (mezcla de reactivos).



Vaso de precipitados de acero inoxidable con el hidrolizado resultante.



Filtración del hidrolizado resultante.



Preparación de Reactivos.



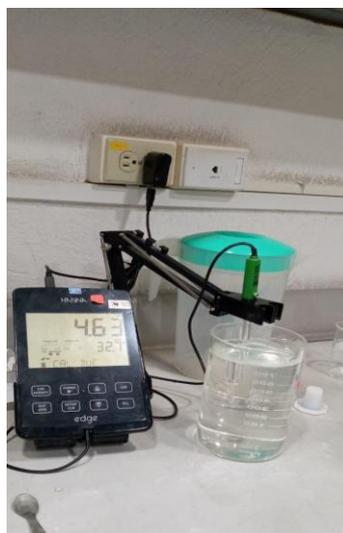
Cuantificación de azúcares-Método de Dubois.



Lectura en el espectrofotómetro.



Toma de alícuota del mejor resultado de Hidrólisis ácida.



Control de pH



Sustrato + enzima + buffer - Hidrólisis Enzimática.

Obtención de harina



Preselección y lavado de materia prima para producción de harina.



Escaldado.



Pretratamiento antes del proceso de liofilizado.



Peso antes de la liofilización.



Peso de materia prima por bandeja.



Colocación de materia prima en bandejas del equipo de liofilización.



Producto Liofilizado.



Molienda



Tamizado.



Pesado del producto final.

Anexo C. Manual del liofilizador



INSTRUCTIVO LIOFILIZADOR FT33 ARMFIELD

- Encender la cámara de condensación presionando una vez el botón "CONDENSER CHAMBER", el led junto al botón debe encenderse confirmando que la cámara está encendida. La temperatura de esta cámara debe alcanzar los -55°C aproximadamente.



PROCESO DE CONGELAMIENTO DE LAS MUESTRAS

- Setear la temperatura de la cámara de muestras para el congelamiento del producto presionando una vez el botón con la flecha hacia abajo de "TEMPERATURE CONTROL", el led "LO" debe encenderse y el display "TEMPERATURE" muestra el último valor seteado.



- Con los botones de flechas de "TEMPERATURE CONTROL" seleccionamos el valor de temperatura a la que la cámara de muestras va a congelar el producto. En este caso se seteo -20°C.



- Encender la cámara de muestras presionando una vez el botón "SPECIMEN CHAMBER", el led junto al botón debe encenderse confirmando que la cámara está encendida.





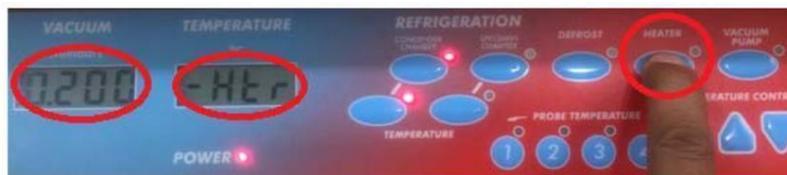
-Preparar las muestras a ser liofilizadas, colocar las termocuplas en las muestras y dejar el tiempo necesario para que las muestras se congelen hasta que su temperatura se aproxime al valor seteado en la cámara de muestras.

- Apagar la cámara de muestras presionando una vez el botón "SPECIMEN CHAMBER", observar que el led junto a este botón se apague.



PROCESO DE CALENTAMIENTO

- Setear el control de calentamiento en función de la presión manteniendo presionado el botón "HEATER" hasta que en el display "TEMPERATURE" se observe "-Htr" y el display "VACUUM" muestra el valor de la presión seteado.



- Seguidamente presionar los botones de flechas de "TEMPERATURE CONTROL" para setear la presión en un rango de 0,100 hasta 1 milibars.



Para mayor información de esta opción por favor dirigirse al manual del equipo página 23. Ítem 5.3.5.



- Esta opción de control de calentamiento en función de la presión puede ser desactivada. Para desactivar esta opción se debe mantener presionado el botón "HEATER" hasta que nuevamente en el display "TEMPERATURE" se observe "-Htr", seguidamente con los botones de "CONTROL TEMPERATURE" desplazarse hasta que en el display "VACUUM" se observe ".oFF".



- Revisar que las tapas de las cámaras estén bien colocadas y la llave de drenaje cerrada completamente.

- Encender la bomba de vacío presionando una vez el botón "VACUUM PUMP", el led junto al botón debe encenderse confirmando que la bomba de vacío está encendida. Observar que en el display "VACUUM" la presión baje y que la salida de aire en la bomba de vacío sea casi imperceptible.



- Setear la temperatura de la cámara de muestras para el calentamiento del producto presionando una vez el botón con la flecha hacia abajo de "TEMPERATURE CONTROL", el led "LO" debe encenderse y el display "TEMPERATURE" muestra el último valor seteado.





- Con los botones de flechas de "TEMPERATURE CONTROL" seleccionamos el valor de temperatura a la que la cámara de muestras va a calentar el producto. En este caso se seteo 30°C.



- Encender el calentador presionando una vez el botón "HEATER", el led junto al botón debe encenderse confirmando que el calentador está encendido



- Si esta activa la opción del control de calentamiento, mientras la presión no sea inferior al valor seteado la cámara de muestras no se calentará. En este caso se seteo a 0.200 milibares, y cuando la presión es inferior a 0.200 la cámara de muestras empezará a calentarse, si la presión sube el calentador se desactiva y mientras la presión no sea inferior a 0.200 milibares la cámara de muestras no calentará.



- Dejar el tiempo necesario para que las muestras se sequen hasta que su temperatura se aproxime al valor seteado en la cámara de muestras.

- Apagar la bomba de vacío presionando una vez el botón "VACUUM PUMP", observar que el led junto a este botón se apague y que también se apague el led junto al botón "HEATER".





DESCONGELAMIENTO DE LA CAMARA DE CONDENSACIÓN

- Apagar la cámara de condensación presionando una vez el botón “CONDENSER CHAMBER”, observar que el led junto a este botón se apague.



- Setear la temperatura de descongelamiento para descongelar la cámara de condensación presionando una vez el botón con la flecha hacia arriba de “TEMPERATURE CONTROL”, el led “HI” debe encenderse y el display “TEMPERATURE” muestra el último valor seteado.

- Con los botones de flechas de “TEMPERATURE CONTROL” seleccionamos el valor de temperatura a la que la cámara de condensación podría llegarse a calentarse para descongelarse. En este caso se seteo 40°C.



- Encender el descongelamiento presionando una vez el botón “DEFROST”, el led junto al botón debe encenderse confirmando que el descongelamiento está encendido.



El descongelamiento se apagará automáticamente luego de un tiempo de estar encendido, si el hielo de la cámara de condensación no se ha descongelado completamente se deberá encender nuevamente el descongelamiento presionando el botón “DEFROST”.

RECOMENDACIONES:

- El equipo fue diseñado con fines didácticos y se recomienda no mantener la bomba de vacío encendida más de 24 horas.
- Para disminuir el tiempo del proceso se recomienda que las muestras de los productos a ser liofilizados sean rodajas muy finas.

Anexo D. Resultados del laboratorio del Análisis Bromatológico



SUSTENTO BROMATOLOGICO

LABORATORIO DE ENSAYO
ACREDITADO POR EL SAE CON
ACREDITACION
N°SAE-LEN-16-018

Informe: MSV-IE-1271-23
Orden de ingreso: OI-599-23
Cuenca, 02 de Agosto del 2023

DATOS DEL CLIENTE

Cliente: ANTONIO ISAAC ORTEGA ANDRADE
Dirección: MIGUEL HEREDIA Y VEGA MUÑOZ
Teléfono: 0987803250

DATOS DE LA MUESTRA

¹ NOMBRE DE LA MUESTRA: HARINA DE RESIDUOS DE BROCOLI				
² MARCA COMERCIAL: N/A		² FABRICANTE: TANNYA ORELLANA Y ANTONIO ORTEGA		
PROCEDENCIA: CUENCA		TIPO DE MUESTRA: ALIMENTO	TIPO DE ENVASE: ENVASE PET	
³ PRESENTACIONES: 100 g		² FORMA DE CONSERVACION: AMBIENTE FRESCO Y SECO		
CODIGO MUESTRA: OI59923	² LOTE: N/A	² FECHA ELAB: 2023-07-12	² FECHA CAD:	
FECHA RECEPCION: 2023-07-19	FECHA ANALISIS: 2023-07-19 - 2023-08-01		FECHA ENTREGA: 2023-08-02	
ENSAYO EN: LABORATORIO	MUESTREO: CLIENTE	NUMERO DE MUESTRAS: UNO (1)		

ENSAYOS ANÁLISIS FISICO-QUIMICOS

PARÁMETRO	MÉTODO - TÉCNICA	UNIDAD	RESULTADO	U(K=2)
CARBOHIDRATOS TOTALES	CALCULO PROXIMAL - CALCULO	%	25.58	---
CENIZAS	AOAC 923.03 / PEMSVMFQ07 - GRAVIMETRIA	%	8.724	±9.3%
FIBRA	NTE INEN-ISO 6865 - GRAVIMETRIA	%	26.766	---
GRASA	AOAC 920.85 - GRAVIMETRIA	%	1.001	---
HUMEDAD	AOAC 925.10 / PEMSVMFQ08 - GRAVIMETRIA	%	0.623	±4.28%
*PROTEINA	AOAC 991.20 - VOLUMETRIA	%	37.306	---

U:INCERTIDUMBRE.

Dra. Sandra Guaraca
GERENTE DE LABORATORIO

Cualquier información adicional correspondientes a los ensayos que requiera el cliente, están a disposición. Los datos e información de las muestras (tal como se reciben) y de los clientes, que puedan afectar la validez de los resultados han sido proporcionados por el cliente y son de su exclusiva responsabilidad. El Laboratorio no será responsable de los desvíos encontrados en los ítems de ensayo entregados por los clientes que puedan afectar a los resultados, que al ser detectados serán comunicados al cliente.

Los resultados expresados en este informe tienen validez solo para la muestra recibida en el laboratorio. Este informe no será reproducido sin la aprobación de MSV. ¹Opiniones e interpretaciones están fuera del alcance del SAE. ²Información proporcionada por el cliente, MSV se responsabiliza exclusivamente de los análisis realizados. Regla de decisión: *Pasa: el valor medido está por debajo del límite de tolerancia, *No pasa: el valor medido está por encima del límite de tolerancia; se tomará en cuenta la incertidumbre asociada al resultado, riesgo < 50% de probabilidad de aceptación no pasa, se aplicará en todos los ensayos. MSV está comprometido con la imparcialidad y Confidencialidad de la información y los resultados (este informe representa la aceptación de la política declarada de MSV en relación al tema)

FMC2106-05

Avenida de las Américas y Turuhuaico, Edificio Miraflores, 3er piso. Cuenca-Ecuador
Teléfono: 074045127 Celular: 0995354172 msvlaboratorio@gmail.com

Página 1 de 1