

Valorización de subproductos de brócoli mediante tecnologías verdes de extracción para la reformulación de salchichas de cerdo: impacto en el perfil metabólico y bioactivo

Trabajo de investigación presentado al **Premio Nacional GRUPO FUERTES 2025** convocado por la Academia de Ciencias Veterinarias de la Región de Murcia.

Índice

Resumen	1
Abstract	1
1. Introducción	2
2. Materiales y métodos	3
2.1. Preparación de extractos de brócoli.....	3
2.2. Elaboración de salchichas de cerdo	4
2.3. Composición nutricional.....	5
2.4. Estabilidad oxidativa y microbiológica	5
2.5. Digestión gastrointestinal <i>in vitro</i>	6
2.6. Análisis metabolómico por UHPLC-QTOF-HRMS.....	6
2.7. Análisis de capacidad antioxidante y contenido fenólico total.....	7
2.8. Co-cultivo celular con células Caco-2/RAW264.7.....	7
2.9. Análisis sensorial	8
2.10. Análisis quimiométrico y estadístico	8
3. Resultados y discusión	8
3.1. Composición nutricional de las salchichas de cerdo	8
3.2. Perfil metabolómico de las salchichas reformuladas.....	10
3.3. Estabilidad oxidativa y microbiológica durante el almacenamiento refrigerado	12
3.4. Actividad antioxidante y antiinflamatoria tras la digestión <i>in vitro</i>	14
3.5. Análisis sensorial de las salchichas de cerdo	16
4. Conclusiones	16
5. Referencias	17

Resumen

La creciente demanda de alimentos más saludables y sostenibles ha impulsado la reformulación de productos cárnicos de cerdo mediante ingredientes naturales con funciones tecnológicas y bioactivas. La valorización de subproductos de brócoli mediante tecnologías como los campos eléctricos pulsados (PEF) y la encapsulación representa una estrategia eficaz para mejorar la calidad nutricional y funcional de los elaborados cárnicos. Este estudio evaluó la incorporación del 2% de extractos de brócoli en salchichas de cerdo, analizando su composición nutricional, estabilidad oxidativa y microbiológica, perfil metabolómico, propiedades sensoriales y actividad biológica tras digestión gastrointestinal *in vitro*. Las salchichas reformuladas mostraron un mayor contenido de fibra dietética y una mayor acumulación de compuestos fenólicos y glucosinolatos, especialmente en las formulaciones tratadas con PEF. Durante el almacenamiento refrigerado presentaron menor oxidación lipídica, mayor estabilidad del color y menores recuentos microbianos respecto a la formulación control. Tras la digestión *in vitro*, exhibieron una mayor capacidad antioxidante y una reducción significativa de ROS y óxido nítrico en el modelo inflamatorio Caco-2/RAW264.7. Estos resultados demuestran que los extractos de brócoli procesados con PEF y encapsulados permiten desarrollar salchichas de cerdo más saludables, estables y alineadas con los retos actuales de sostenibilidad y valor añadido en la industria cárnica.

Abstract

The growing demand for healthier and more sustainable foods has driven the reformulation of pork meat products using natural ingredients with technological and bioactive functions. The valorization of broccoli by-products through technologies such as Pulsed Electric Fields (PEF) and encapsulation represents an effective strategy to improve the nutritional and functional quality of meat products. This study evaluated the incorporation of 2% broccoli extracts into pork sausages, analyzing their nutritional composition, oxidative and microbiological stability, metabolomic profile, sensory properties, and biological activity after *in vitro* gastrointestinal digestion. The reformulated sausages showed a higher dietary fiber content and greater accumulation of phenolic compounds and glucosinolates, especially in the PEF-treated formulations. During refrigerated storage, they exhibited lower lipid oxidation, greater color stability, and reduced microbial counts compared to the control formulation. After *in vitro* digestion, they demonstrated higher antioxidant capacity and a significant reduction of ROS and nitric oxide in the Caco-2/RAW264.7 inflammatory model. These results demonstrate that PEF-processed and encapsulated broccoli extracts enable the development of healthier, stable pork sausages aligned with current sustainability challenges and added-value goals in the meat industry.

1. Introducción

La carne de cerdo constituye una fuente esencial de nutrientes en la dieta humana, aportando proteínas de alta calidad, hierro hemo y vitamina B₁₂ (Vicente & Pereira, 2024). La carne porcina aporta ácidos grasos esenciales, como el linoleico (omega-6) y el α -linolénico (omega-3), en proporciones equilibradas, es altamente digestible y contiene compuestos bioactivos que favorecen la salud muscular y cardiovascular. Además, contiene péptidos antioxidantes endógenos, como carnosina, anserina y glutatión, que contribuyen a su estabilidad frente a la oxidación (López-Pedrouso et al., 2023). El consumo de productos cárnicos constituye el más relevante dentro de la cesta de la compra a nivel nacional: de los 73.893 millones de euros que alcanzó el gasto alimentario en los hogares españoles en 2022, un 31 % correspondió a carnes y derivados (MAPA, 2022), lo que subraya su importancia económica y social. A pesar de sus beneficios nutricionales, existe un creciente interés en mejorar la funcionalidad de los productos cárnicos, especialmente mediante la fortificación con fibra y compuestos fenólicos de origen vegetal. La incorporación de subproductos vegetales se presenta como una estrategia prometedora para mejorar el perfil nutricional de los productos cárnicos, al tiempo que se promueve un enfoque más sostenible en la industria alimentaria (Ronie et al., 2024). Diferentes subproductos vegetales, como las semillas de guaraná (Pateiro et al., 2018), las hojas de olivo (Martínez et al., 2020) y las pieles de cítricos (Nieto et al., 2021), han demostrado su eficacia como ingredientes funcionales en la reformulación de procesados cárnicos.

El brócoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) es una hortaliza crucífera ampliamente cultivada en la Región de Murcia y es reconocida por sus propiedades nutricionales y bioactivas. Sin embargo, aproximadamente el 85 % de su biomasa, incluyendo hojas, tallos y raíces, se descarta como subproducto (Quizhpe et al., 2024). La producción mundial de brócoli superó los 26 millones de toneladas en 2023 (FAOSTAT, 2023), generando un volumen considerable de subproductos con potencial funcional. Estos residuos contienen minerales esenciales (calcio, potasio, hierro, selenio), vitaminas A, C, E y K, así como compuestos bioactivos, entre ellos glucosinolatos, que mediante hidrólisis enzimática generan isotiocianatos con efectos anticancerígenos y antiinflamatorios (Olayanju et al., 2024). Además, las hojas y floretes de esta hortaliza son ricos en compuestos fenólicos, como flavonoides y ácidos fenólicos, que contribuyen a la regulación del estrés oxidativo, la inflamación y procesos metabólicos (Duan et al., 2021).

La valorización de estos subproductos mediante tecnologías sostenibles se perfila como una estrategia eficaz para mejorar la funcionalidad de los alimentos. El tratamiento de campos eléctricos pulsados (PEF) es un método no térmico que facilita la extracción de compuestos bioactivos de matrices vegetales mediante electroporación. La aplicación de pulsos eléctricos de alta intensidad y corta duración (1–10 kV/cm) altera temporalmente la integridad de las membranas celulares, generando nanoporos que permiten la liberación de polifenoles y otros compuestos hacia el medio circundante (Brito & Silva, 2024). PEF ha mostrado eficacia en la liberación de polifenoles de subproductos como piel de tomate y pulpa de manzana (Andreou et al., 2020; Pollini et al., 2021). Sin embargo, estos compuestos extraídos son susceptibles a degradación durante el almacenamiento o procesamiento; por ello, la encapsulación con biopolímeros aptos para alimentos, como maltodextrina o inulina, se utiliza de manera complementaria para protegerlos, estabilizarlos y permitir su liberación controlada en los alimentos (Peixoto et al., 2022).

A pesar del reconocido potencial de los subproductos de brócoli, su aplicación en productos cárnicos de cerdo ha sido limitada. La combinación de PEF y encapsulación podría maximizar la recuperación y la estabilidad de los compuestos bioactivos durante el procesamiento, almacenamiento y digestión. Las salchichas de cerdo representan un modelo idóneo para su evaluación, dada su composición estandarizada, relevancia industrial y la exposición a altas temperaturas durante su elaboración, que

pueden degradar compuestos termolábiles. Además, las salchichas figuran entre los productos cárnicos más consumidos a nivel mundial, con un mercado proyectado de 116,5 mil millones de dólares en 2025 (Statista, 2025), lo que las convierte en un objetivo estratégico para la mejora nutricional.

En este estudio, se plantea la hipótesis de que la incorporación de extractos procedentes de subproductos de brócoli, ya sea en su forma natural, tratados mediante tecnologías de pulsos eléctricos pulsados (PEF) y/o posteriormente encapsulados, es capaz de mejorar la estabilidad oxidativa, el perfil bioactivo y la funcionalidad tras digestión gastrointestinal de las salchichas de cerdo, sin comprometer sus propiedades sensoriales ni su aceptabilidad global.

En este sentido, el presente estudio tuvo como objetivo general evaluar el impacto de la adición al 2% de extractos de subproductos de brócoli, procesados mediante PEF y encapsulación, en la reformulación de salchichas de cerdo. Para ello, se plantearon los siguientes objetivos específicos (**Figura 1**): (i) caracterizar la composición nutricional, el color y la estabilidad oxidativa y microbiológica durante la vida útil; (ii) estudiar las modificaciones en el perfil metabolómico derivadas del procesamiento y de la digestión gastrointestinal *in vitro*; (iii) determinar la capacidad antioxidante de las digestiones mediante los ensayos FRAP, ABTS y TPC; (iv) evaluar la actividad antioxidante, antiinflamatoria y la integridad epitelial en un modelo de co-cultivo celular Caco-2/RAW264.7; y (v) analizar las propiedades sensoriales y la aceptabilidad de las formulaciones desarrolladas.

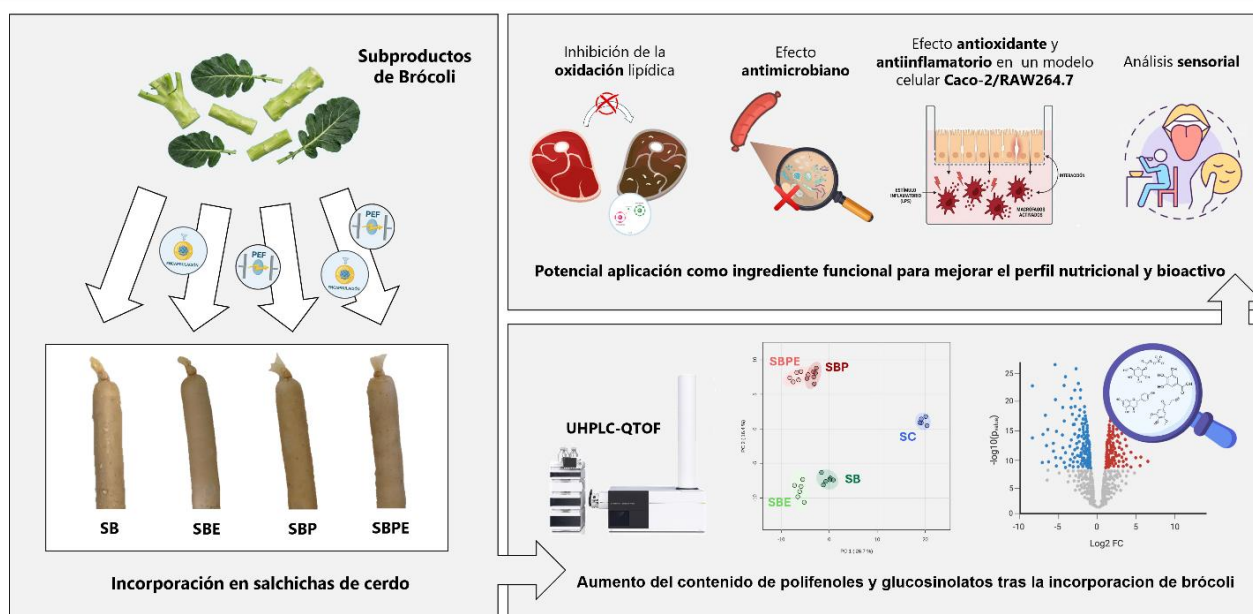


Figura 1. Resumen gráfico del estudio.

2. Materiales y métodos

2.1. Preparación de extractos de brócoli

Los subproductos de brócoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) fueron suministrados por Cricket Campo de Lorca S.L. (Lorca, España). Estos materiales vegetales, compuestos principalmente por tallos y algunas hojas, se cortaron y se sumergieron en una disolución de ácido cítrico al 0,5 % (v/v).

Los subproductos frescos de brócoli fueron tratados mediante pulsos eléctricos de alto voltaje (PEF) utilizando un sistema Vitave (Vitave, Praga, República Checa). El tratamiento PEF se aplicó siguiendo las condiciones descritas por Berzosa et al. (2025), con ligeras modificaciones. Los tratamientos se realizaron en modo discontinuo en una cámara de electrodos paralelos (8 × 15 × 10 cm; altura × anchura

× distancia entre placas). Se aplicaron pulsos monopolares de onda cuadrada a 15 kV, correspondientes a una intensidad de campo eléctrico de 1.5 kV/cm. Se administraron un total de 220 pulsos con una duración de 10 µs y el aporte energético específico fue de 5,20 kJ/kg.

Tras el tratamiento con PEF, tanto los subproductos de brócoli sin tratar como los tratados con PEF se sometieron a un proceso de secado en dos etapas utilizando un horno de aire forzado (ArgoLab TCF 50, ArgoLab, Italia): 70 °C durante 1 h, seguido de 55 °C durante 40 h, hasta lograr la desecación completa de las muestras. Posteriormente, las muestras fueron molidas y tamizadas para obtener una harina fina con un tamaño de partícula de 250 µm.

La encapsulación de los subproductos de brócoli se llevó a cabo según el protocolo descrito por Saavedra-Leos et al. (2021), con ligeras modificaciones. 10 g de subproducto de brócoli desecado (tratado con PEF y sin tratar) se mezclaron con 200 mL de agua y 2.5 g de maltodextrina. La encapsulación se realizó en un Mini Spray Dryer B290 (BÜCHI, Labortechnik AG, Flawil, Suiza) bajo las siguientes condiciones operativas: temperatura de alimentación de 40 °C, flujo de alimentación de 7 mL/min, flujo de aire caliente de 28 m³/h, succión al 70 % y presión de 1.5 bar. La temperatura de entrada se fijó en 150 °C.

2.2. Elaboración de salchichas de cerdo

La carne magra y la grasa dorsal de cerdo se obtuvieron el día de la preparación en una carnicería local (Murcia, España). Para la elaboración de las salchichas se siguió el proceso descrito por Nieto et al. (2009) y se mezclaron los ingredientes según la formulación descrita en la **Tabla 1**. Las materias primas se picaron y mezclaron hasta alcanzar una temperatura de emulsión de 15 °C. A continuación, las salchichas se embutieron manualmente en tripas de celulosa de 22 mm de diámetro, obteniéndose salchichas de 50 g. Posteriormente, se cocinaron al vapor, alcanzando una temperatura interna de 71 °C durante 60 min. Tras la cocción, las salchichas se enfriaron inmediatamente con agua fría durante 2 min, se envasaron al vacío y se almacenaron a 4 °C. Se procesaron cinco formulaciones diferentes: salchicha control (SC); salchicha con un 2% de extracto de brócoli (SB); salchicha con un 2% de extracto de brócoli encapsulado (SBE); salchicha con un 2% de extracto de brócoli tratado con PEF (SBP); y salchicha con un 2% de extracto de brócoli tratado con PEF y encapsulado (SBPE). El aspecto visual de las diferentes salchichas de cerdo se muestra en la **Figura 2**.

Tabla 1. Formulación de las salchichas de cerdo.

Ingredientes	SC	SB	SBE	SBP	SBPE
Carne magra de cerdo (g)	698,2	698,2	698,2	698,2	698,2
Tocino de cerdo (g)	149,8	149,8	149,8	149,8	149,8
Hielo (g)	323,5	323,5	323,5	323,5	323,5
Sal (g)	17,8	17,8	17,8	17,8	17,8
Mezcla comercial de condimentos (g)	10,2	10,2	10,2	10,2	10,2
Extracto de brócoli (g)	-	24	-	-	-
Extracto de brócoli encapsulado (g)	-	-	30	-	-
Extracto de brócoli tratado con PEF (g)	-	-	-	24	-
Extracto de brócoli tratado con PEF y encapsulado (g)	-	-	-	-	30
Total (g)	1199,5	1223,5	1229,5	1223,5	1229,5

Abreviaturas: SC: salchicha control; SB: salchicha con un 2% de extracto de brócoli; SBE: salchicha con un 2% de extracto de brócoli encapsulado; SBP: salchicha con un 2% de extracto de brócoli tratado con PEF; SBPE: salchicha con un 2% de extracto de brócoli tratado con PEF y encapsulado.

Los extractos de brócoli encapsulados se añadieron en cantidades ajustadas para garantizar un contenido de extracto del 2% en la formulación, teniendo en cuenta que los extractos encapsulados contenían un 20% de maltodextrina. El nivel de inclusión del 2 % se seleccionó basándose en pruebas preliminares para garantizar un equilibrio adecuado entre la aceptabilidad sensorial y la eficacia funcional, en consonancia con informes anteriores sobre el uso de polvos vegetales en matrices cárnicas. Se prepararon un total de 26 salchichas por tratamiento, de las cuales 16 se utilizaron para la evaluación de la vida útil a 0, 5, 9 y 14 días a 4 °C en condiciones aerobias. Las muestras restantes se utilizaron para análisis nutricionales, sensoriales y metabolómicos.

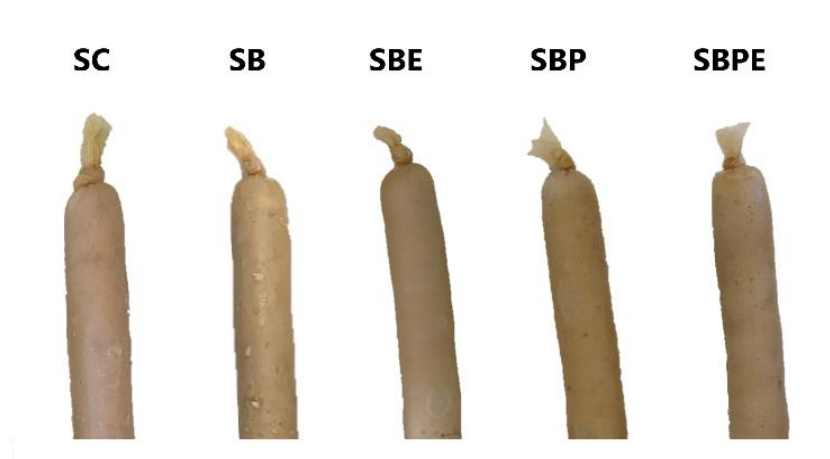


Figura 2. Apariencia visual de las salchichas de cerdo. **Abreviaturas:** SC: salchicha control; SB: salchicha con un 2% de extracto de brócoli; SBE: salchicha con un 2% de extracto de brócoli encapsulado; SBP: salchicha con un 2% de extracto de brócoli tratado con PEF; SBPE: salchicha con un 2% de extracto de brócoli tratado con PEF y encapsulado.

2.3. Composición nutricional

La determinación de la humedad (964.22), proteínas (955.04), grasas (920.39), cenizas (923.03), fibra dietética soluble, insoluble y total (991.43) de las salchichas de cerdo se llevó a cabo siguiendo los procedimientos de la Asociación de Químicos Analíticos Oficiales (AOAC) (AOAC, 2012). El contenido de carbohidratos y los valores energéticos se determinaron siguiendo las directrices establecidas por la FAO (Charrondière et al., 2012).

La composición en minerales esenciales se determinó mediante espectrometría de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente (ICP-OES) utilizando un Thermo iCAP 6500 Duo (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.). Los datos se procesaron con el programa informático iTEVA y los resultados se expresaron en mg/kg.

2.4. Estabilidad oxidativa y microbiológica

Las mediciones del color se realizaron con un colorímetro Konica Minolta CR 400 (Minolta, Japón). Los parámetros de luminosidad (L^*), enrojecimiento (a^*) y amarillez (b^*) se registraron según el sistema CIEL*a*b*. Los valores de pH de las salchichas se midieron con un pH-metro sensION+ PH31 (Hach-Lange, España), siguiendo las directrices ISO (ISO 2917, 1999). Las diferencias totales de color (ΔE) se calcularon siguiendo la fórmula: $\Delta E = \sqrt{(L_s^* - L_c^*)^2 + (a_s^* - a_c^*)^2 + (b_s^* - b_c^*)^2}$.

El contenido de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), directamente relacionado con la oxidación lipídica, se midió siguiendo el método descrito por Ayuso et al. (2024). Los valores de TBARS se expresaron como mg de malonaldehído (MDA) por kg de muestra. El contenido en metamioglobina (MetMb) se midió siguiendo el método descrito por Liu et al. (2015).

El recuento total de mesófilos viables (TVC), recuento de coliformes totales (TCC) y *Escherichia coli* se midieron homogeneizando 10 g de muestra con 90 mL de agua de peptona estéril al 0,1%. Se sembraron diluciones seriadas en agar PCA (TVC, 30 °C durante 48 h) y agar Rapid *E. coli* (TCC, 37 °C durante 24 h; *E. coli*, 45 °C durante 48 h). Los resultados se expresaron en UFC/g. Para la detección de *Salmonella* spp., se mezclaron 25 g de muestra con 225 mL de agua peptonada, se incubaron a 37 °C durante 18 h y se sembraron en agar Rapid *Salmonella*. Para *Listeria monocytogenes*, se combinaron 25 g de muestra con 225 mL de caldo Fraser y se incubaron a 37 °C durante 22 h, tras lo cual se sembraron en agar Rapid *L. monocytogenes*. Todos los análisis se realizaron en los días 0, 5, 9 y 14 de almacenamiento refrigerado (4 °C).

2.5. Digestión gastrointestinal *in vitro*

Las salchichas de cerdo se sometieron a una digestión gastrointestinal siguiendo el modelo estático *in vitro* INFOGEST 2.0, descrito por Brodkorb et al. (2019). El proceso consistió en tres fases secuenciales (oral, gástrica e intestinal), utilizando fluidos digestivos simulados: fluido salival simulado (FSS), fluido gástrico simulado (FGS) y fluido intestinal simulado (FIS). Durante la fase oral, las muestras se homogeneizaron con FSS, que contenía α -amilasa salival humana (75 U/mL) y CaCl₂ (0,75 mM). El pH se ajustó a 7,0, y la mezcla se incubó durante 2 minutos a 37 °C con agitación constante. Posteriormente, la mezcla resultante se mezcló en proporción 1:1 (v/v) con FGS que contenía pepsina porcina 2000 U/mL y CaCl₂ para completar la fase gástrica. El pH se acidificó a 3,0 utilizando HCl 1 M, y la digestión se llevó a cabo durante 120 minutos a 37 °C bajo agitación constante. Para la fase intestinal, el quimo gástrico se mezcló con FIS, suplementado con pancreatina porcina basada en actividad de tripsina (100 U/mL) y sales biliares (10 mM). El pH se neutralizó a 7,0 utilizando NaOH 1 M. Esta mezcla final se incubó durante 120 min a 37 °C. Finalmente, la mezcla resultante se centrifugó a 9000 × g durante 10 minutos para separar la fracción digerida de los residuos sólidos. Cada digestión se realizó por triplicado y se tomó una alícuota de las digestiones salival, gástrica e intestinal de los productos para el análisis de la capacidad antioxidante.

2.6. Análisis metabolómico por UHPLC-QTOF-HRMS

Para el análisis metabolómico no dirigido, se realizó una extracción sólido-líquido a partir de 0,5 g de muestras de salchichas utilizando 5 mL de una solución de metanol al 80 % acidificado con ácido fórmico al 0,1 % (v/v). Las muestras se sometieron a una extracción asistida por ultrasonidos durante 10 min, seguida de centrifugación a 8000 × g (4 °C, 10 min) y filtración del sobrenadante (poro de 0,22 μ m). El proceso se realizó utilizando seis réplicas independientes (n=6).

El perfil metabolómico de glucosinolatos y compuestos fenólicos se determinó mediante cromatografía líquida de ultra alta eficacia acoplada a espectrometría de masas de alta resolución con tiempo de vuelo (UHPLC-QTOF-HRMS). La separación cromatográfica se llevó a cabo en un sistema UHPLC Agilent 1290 (Agilent Technologies®, Santa Clara, EE.UU.) utilizando una columna de fase reversa y un gradiente de elución compuesto por agua y acetonitrilo, ambos acidificados con ácido fórmico al 0,1 %. La espectrometría de masas se realizó en un analizador G6550 QTOF operando en modo de ionización positiva (ESI+) y modo SCAN (rango 100–1200 m/z) para la determinación simultánea de los analitos de interés. El procesamiento de los datos adquiridos se realizó mediante el software MassHunter Profinder, aplicando algoritmos de alineación basados en el tiempo de retención y la masa molecular. Se seleccionaron únicamente aquellos compuestos presentes en al menos cinco de las seis réplicas de cada grupo. La anotación de metabolitos se realizó conforme al nivel 2 de la iniciativa COSMOS (compuestos anotados putativamente) utilizando una base de datos interna. Posteriormente, se procedió a la semicuantificación de los compuestos identificados agrupándolos por familias químicas y cuantificándolos frente a un estándar representativo para cada familia: cianidina (antocianinas), (+)

catequina (flavanoles), quercetina (flavonoles), luteolina (otros flavonoides), sesamina (lignanós), ácido ferúlico (ácidos fenólicos), oleuropeína (polifenoles de bajo peso molecular y otros), trans-resveratrol (estilbenos) y gluconapina (glucosinolatos). Los resultados finales se expresaron en mg de equivalentes de cada estándar de referencia por cada 100 g de producto.

2.7. Análisis de capacidad antioxidante y contenido fenólico total

La evaluación del estado antioxidante en las fases de digestión oral, gástrica e intestinal se llevó a cabo mediante la medición del poder antioxidante reductor férrico (FRAP), la capacidad de barrido del radical ABTS y el contenido fenólico total (CFT). El ensayo FRAP se realizó siguiendo el protocolo de Benzie & Strain (1996), registrando la absorbancia a 593 nm tras 4 min de reacción. La actividad antioxidante frente al ABTS se determinó conforme a la metodología descrita por Re et al. (1999), midiendo la absorbancia a 734 nm tras 2 min de incubación. Todos los resultados de la actividad antioxidante se expresaron en μmol equivalentes de Trolox (TE)/100 g de muestra. Finalmente, el TPC se cuantificó mediante el método de Folin-Ciocalteu de acuerdo con el procedimiento de Singleton et al. (1999). Los resultados se expresaron como mg equivalentes de ácido gálico (GAE)/100 g de muestra. Todas las mediciones se realizaron por triplicado utilizando un espectrofotómetro Evolution 300 (Thermo Scientific, Waltham, MA, EE. UU.).

2.8. Co-cultivo celular con células Caco-2/RAW264.7

Las líneas celulares Caco-2 y RAW 264.7 se obtuvieron de la Colección Europea de Cultivos Celulares (ECACC; n.º 86010202, Salisbury, Reino Unido). El modelo de co-cultivo se estableció siguiendo la metodología descrita por Faubel et al. (2024). La carne por con ligeras modificaciones. Las células Caco-2 se sembraron a una densidad de 2×10^5 células por pocillo en insertos Transwell® de 12 pocillos (12 mm de diámetro, 0,4 μm de tamaño de poro; Costar, Corning Inc., Cambridge, Reino Unido) y se dejaron diferenciar durante 21 días. Durante este periodo, las células se mantuvieron en DMEM en condiciones estándar (37 °C, 5% de CO₂), renovándose el medio cada 48 horas. Las muestras de salchichas de cerdo sometidas a digestión gastrointestinal *in vitro* se filtraron (0,22 μm) y luego se incorporaron al compartimento apical de los insertos Transwell al 5% (v/v) durante 3 horas al día, durante cuatro días consecutivos. Paralelamente, se sembraron macrófagos RAW 264.7 a una densidad de 4×10^5 células/pocillo en placas de 12 pocillos y se incubaron durante la noche para asegurar la adherencia. El día del experimento, tras la incubación con digestiones, se transfirieron insertos Caco-2 diferenciados a placas de 12 pocillos que contenían células RAW 264.7 sembradas previamente. A continuación, se añadió 1 $\mu\text{g/mL}$ de lipopolisacáridos (LPS) procedentes de *E. coli* al compartimento basolateral para inducir una respuesta inflamatoria de las células RAW 264.7. Se incluyeron controles negativos y positivos, consistentes en el blanco de digestión aplicado al modelo de cocultivo celular, ya sea sin estimulación con LPS (control negativo) o con tratamiento con LPS (control positivo). Tras una incubación de 4 horas, se recogieron sobrenadantes apicales para determinar el óxido nítrico, mientras que las células Caco-2 se cosecharon para evaluar la producción intracelular de especies reactivas del oxígeno (ROS). Este estudio fue aprobado por el Comité de Bioseguridad para la Investigación Experimental de la Universidad de Murcia, con el código: 660/2025.

La permeabilidad de la unión de las monocapas Caco-2 se determinó mediante la resistencia eléctrica transepitelial (RETE) antes y después de la inducción de la inflamación. Los valores de RETE se midieron utilizando un instrumento Millicell-ERS (Millipore, Bedford, EE.UU.). Los resultados se expresaron en función del % de disminución de los valores de RETE tras el tratamiento.

Los niveles intracelulares de especies reactivas de oxígeno (ROS) tras la inducción de la inflamación se midieron en células Caco-2 utilizando diacetato de 2'-7'-diclorofluoresceína (DCFH-DA). Las células Caco-2 se enriquecieron con 12,5 μM de DCFH-DA y se incubaron durante 30 min a 37 °C. A

continuación, se midió la fluorescencia mediante espectroscopia de fluorescencia con longitud de onda de excitación/emisión a 485/530 nm. Los resultados se expresaron como % de producción de ROS en relación con el control positivo.

Los niveles de óxido nítrico tras la inducción de LPS se cuantificaron utilizando un kit de ensayo colorimétrico (Thermo Scientific, Rockford, IL, EE.UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los datos se presentaron como concentraciones milimolares (mM) de óxido nítrico en el sobrenadante del cultivo celular.

2.9. Análisis sensorial

El análisis sensorial se llevó a cabo con 13 panelistas entrenados según las directrices ISO (ISO 8586, 2012). Los participantes, con edades comprendidas entre los 22 y los 45 años, asistieron a dos sesiones de formación. Estas sesiones se dedicaron a perfeccionar sus descripciones sensoriales de las salchichas y el reconocimiento del brócoli, garantizando así una experiencia previa en análisis sensorial. Las salchichas se cocinaron durante 4 minutos a 180°C y se codificaron con números de tres dígitos. Los panelistas evaluaron el sabor, olor y color de las salchichas, incluidos los atributos relacionados con el extracto incorporado, así como la dureza, adhesividad, masticabilidad, cohesividad y sabor graso de las salchichas. Se utilizó una escala de puntuación de 5 puntos. El estudio fue aprobado por el Comité de Bioética de la Universidad de Murcia con el código M10/2024/365.

2.10. Análisis quimiométrico y estadístico

La evaluación de los parámetros nutricionales y sensoriales se realizó mediante un análisis de varianza (ANOVA) para la comparación entre formulaciones, y un ANOVA de dos vías (considerando tiempo y tratamiento) para el estudio de vida útil. La significancia estadística se definió a un nivel de $p < 0,05$, empleando el test de Tukey para las comparaciones múltiples *post-hoc*. Los análisis se llevaron a cabo con el software SPSS Statistics v30.0 (IBM Corporation, Armonk, NY, EE.UU.) y los resultados se expresaron como media $\pm$ desviación estándar (DE).

El análisis multivariante de los datos metabolómicos se efectuó utilizando la plataforma MetaboAnalyst 6.0. Previo al análisis, las abundancias fueron transformadas logarítmicamente, normalizadas por la mediana y autoescaladas. Se aplicó un análisis de agrupamiento jerárquico (HCA) utilizando distancias euclídeas y el método de Ward para evaluar similitudes globales. La estructura y dimensionalidad de los datos se exploraron mediante análisis de componentes principales (PCA), validando estadísticamente la separación entre grupos mediante un análisis de varianza multivariante permutacional (PERMANOVA, $\alpha = 0.05$). Adicionalmente, los datos sensoriales normalizados se analizaron mediante un análisis PCA utilizando el paquete *factoextra* del software R para visualizar las correlaciones entre atributos y muestras.

3. Resultados y discusión

3.1. Composición nutricional de las salchichas de cerdo

La composición química y el contenido de minerales esenciales de las distintas salchichas se muestran en la **Tabla 2**. La reformulación de las salchichas de cerdo mediante la incorporación de subproductos de brócoli influyó significativamente en su contenido proteico y en su valor energético ($p < 0.05$). Esta disminución puede atribuirse a la composición nutricional de los subproductos de brócoli empleados, caracterizados por contenidos de proteína (14.9–18.0 g/100 g) y grasa (0.9–2.0 g/100 g) sustancialmente inferiores a los de la matriz cárnica. En consecuencia, su incorporación probablemente diluyó la concentración global de estos macronutrientes en el producto final, dando lugar a salchichas de menor valor calórico.

Tabla 2. Composición nutricional y minerales esenciales de las salchichas de cerdo.

	Salchichas de cerdo					Extractos	
	SC	SB	SBE	SBP	SBPE	Extracto de brócoli	Extracto de brócoli - PEF
Composición nutricional							
Energía (kcal/100g)	213,56 ± 5,71a	179,75 ± 8,96b	196,82 ± 1,26ab	189,63 ± 1,90b	196,52 ± 5,28ab	113,18 ± 5,32a	108,64 ± 0,20a
Humedad (g/100g)	62,28 ± 0,85c	67,29 ± 1,09a	65,53 ± 0,00ab	67,74 ± 0,34a	64,64 ± 0,02bc	7,68 ± 0,39b	13,39 ± 0,40a
Cenizas (g/100g)	1,99 ± 0,04a	2,34 ± 0,34a	2,01 ± 1,83a	1,83 ± 0,11a	2,18 ± 0,08a	16,61 ± 0,17a	15,73 ± 0,06a
Grasa (g/100g)	14,58 ± 0,30a	12,45 ± 0,90a	13,86 ± 0,31a	12,58 ± 0,48a	13,08 ± 0,84a	2,04 ± 0,65a	0,92 ± 0,13a
Proteína (g/100g)	21,26 ± 0,78a	17,48 ± 0,22c	18,22 ± 0,05bc	19,74 ± 0,62ab	19,85 ± 0,12a	18,03 ± 0,03a	14,91 ± 1,03a
Carbohidratos (g/100g)	0,00 ± 0,00a	0,00 ± 0,00a	0,00 ± 0,00a	0,00 ± 0,00a	0,00 ± 0,00a	7,16 ± 2,76a	10,60 ± 1,34a
FDI (g/100g)	0,47 ± 0,22b	1,82 ± 0,24a	1,79 ± 0,10a	1,80 ± 0,08a	1,96 ± 0,04a	47,20 ± 0,97a	37,80 ± 0,66b
FDS (g/100g)	0,10 ± 0,13a	0,24 ± 0,05a	0,26 ± 0,09a	0,26 ± 0,07a	0,26 ± 0,05a	1,28 ± 0,61b	6,64 ± 0,38a
FDT (g/100g)	0,56 ± 0,36b	2,06 ± 0,29a	2,04 ± 0,01a	2,06 ± 0,15a	2,21 ± 0,00a	48,48 ± 1,57a	44,43 ± 0,28a
Oligoelementos y minerales esenciales							
Aluminio (mg/kg)	0,63 ± 0,33a	2,82 ± 1,66a	1,29 ± 0,09a	1,31 ± 0,35a	2,13 ± 1,04a	14,27 ± 0,19a	11,29 ± 0,38b
Cromo (mg/kg)	0,12 ± 0,01a	0,59 ± 0,33a	0,20 ± 0,00a	0,11 ± 0,04a	0,12 ± 0,02a	1,40 ± 0,08a	0,58 ± 0,14b
Cobre (mg/kg)	0,91 ± 0,18b	1,66 ± 0,23a	1,07 ± 0,14ab	0,91 ± 0,15b	0,84 ± 0,08b	4,13 ± 0,01a	3,97 ± 0,09a
Manganeso (mg/kg)	1,28 ± 0,08b	1,88 ± 0,15ab	2,23 ± 0,40a	1,73 ± 0,20ab	1,71 ± 0,06ab	43,57 ± 0,21a	42,41 ± 0,59a
Níquel (mg/kg)	0,10 ± 0,05b	0,23 ± 0,03a	0,12 ± 0,01ab	0,06 ± 0,00b	0,08 ± 0,01b	1,39 ± 0,20a	0,77 ± 0,04a
Silicio (mg/kg)	1,66 ± 0,17a	6,57 ± 1,14a	4,60 ± 0,56a	5,70 ± 2,71a	5,45 ± 1,03a	45,73 ± 4,00a	24,10 ± 0,92b
Estroncio (mg/kg)	0,72 ± 0,02b	2,36 ± 0,35a	1,30 ± 0,28b	1,14 ± 0,07b	1,08 ± 0,02b	37,39 ± 0,04a	33,51 ± 0,36b

Los resultados se expresaron como media ± desviación estándar para n = 3. Letras distintas dentro de la misma fila indican diferencias estadísticamente significativas (Tukey; $p < 0,05$). **Abreviaturas:** FDI: fibra dietética insoluble; FDS: fibra dietética soluble; FDT: fibra dietética total; SB: salchicha con un 2% de extracto de brócoli; SBE: salchicha con un 2% de extracto de brócoli encapsulado; SBP: salchicha con un 2% de extracto de brócoli tratado con PEF; SBPE: salchicha con un 2% de extracto de brócoli tratado con PEF y encapsulado; SC: salchicha control.

La adición de subproductos de brócoli incrementó de forma significativa el contenido de fibra dietética insoluble (FDI) y de fibra dietética total (FDT) en las salchichas. Este efecto se relaciona con el elevado contenido natural de fibra de estos subproductos, especialmente de su fracción insoluble. Además, el tratamiento con PEF promovió un aumento adicional en la fibra dietética soluble (FDS), acompañado de una reducción en la fracción FDI, lo que sugiere que el tratamiento con PEF favoreció la solubilización de componentes originalmente insolubles presentes en los extractos de brócoli. Estos efectos moleculares han sido descritos en otras matrices alimentarias. Qin et al. (2025) observaron un incremento en la fracción soluble total del salvado de trigo (de 7.69 a 12.02 g/100 g) tras la aplicación de campos eléctricos inducidos. Asimismo, Fan et al. (2022) informaron que el pretratamiento con PEF (6.0 kV/cm y 20 pulsos) en piel de naranja resultó ser un método eficaz para mejorar el rendimiento de FDS. En general, el tratamiento con PEF reduce la rigidez y la cristalinidad de los componentes celulares, especialmente de la celulosa, debilitando las interacciones entre sus moléculas y facilitando su desintegración y liberación en forma de fibra soluble.

Por otro lado, la **Tabla 2** recoge los distintos minerales presentes tanto en las salchichas como en los extractos de brócoli. Las concentraciones de cobre, níquel, manganeso y estroncio aumentaron de manera significativa en comparación con la formulación control ($p < 0.05$), especialmente en la muestra

SB. Este enriquecimiento se debe principalmente al elevado contenido natural de estos microelementos en los subproductos de brócoli. Entre los elementos incrementados, el cobre es un oligoelemento esencial implicado en la defensa antioxidante enzimática y en la respuesta inmunitaria (Mandarano & McGargill, 2023). El manganeso también es un elemento traza esencial y actúa como cofactor en catalizadores con capacidad preventiva frente al cáncer, contribuyendo a proteger al organismo frente a los radicales libres generados durante el estrés oxidativo (Islam et al., 2023). En contraste, el tratamiento con PEF no incrementó el contenido de oligoelementos e incluso provocó una disminución en algunos de ellos, como aluminio, cromo, silicio y estroncio. Esta reducción podría explicarse por el efecto de electroporación inducido por PEF, que altera las membranas y paredes celulares, facilitando la liberación de iones libres y minerales débilmente asociados.

3.2. Perfil metabolómico de las salchichas reformuladas

El análisis metabolómico realizado mediante UHPLC-QTOF permitió identificar hasta 516 compuestos diferentes en las distintas formulaciones de salchichas. Dada la elevada complejidad del perfil químico obtenido, se llevó a cabo un análisis multivariante no dirigido con el fin de explorar los patrones globales de variación asociados a la incorporación de subproductos de brócoli y a su procesamiento (PEF y encapsulación).

Los resultados del análisis metabolómico de las diferentes formulaciones de salchichas se muestran en la **Figura 3**. El gráfico HCA (**Figura 3A**) mostró la agrupación de glucosinolatos y compuestos fenólicos en cinco clústeres claramente diferenciados, cada uno asociado a una formulación específica. Sin embargo, estos clústeres se organizaron en dos grupos principales: uno correspondiente a la muestra control (SC) y otro que incluía todas las formulaciones con subproductos de brócoli, lo que pone de manifiesto el fuerte impacto de dicha incorporación sobre el perfil metabolómico. Esta tendencia fue confirmada por el análisis PCA (**Figura 3B**), donde las muestras se separaron en tres grupos definidos: formulación control, formulaciones con extracto sin tratar o encapsulado (SB y SBE) y aquellas elaboradas con subproductos tratados con PEF (SBP y SBPE). Además, el PCA confirmó el papel clave del tratamiento PEF, que generó dos grupos diferenciados dentro de las salchichas enriquecidas con brócoli. Estos resultados indican cambios en el perfil metabólico de las salchichas en función de su formulación, cambiando su composición en diferentes compuestos bioactivos.

Con el fin de profundizar en los cambios metabólicos inducidos por la reformulación, se realizó un análisis semicuantitativo de las distintas familias de compuestos fenólicos y glucosinolatos. Los resultados mostraron un enriquecimiento generalizado en ácidos fenólicos, isoflavonas, lignanos, estilbenos y fenoles de bajo peso molecular tras la incorporación de extracto de brócoli, independientemente del tratamiento aplicado (**Figura 3C**). Estas clases de compuestos fenólicos han sido previamente reportadas como mayoritarias en brócoli (García-Pérez et al., 2025). Asimismo, se observó una marcada acumulación de glucosinolatos en todas las formulaciones, compuestos característicos y abundantes en las especies Brassicaceae (Sharma et al., 2025).

Por otro lado, el análisis semicuantitativo evidenció diferencias asociadas al tipo de procesamiento aplicado al subproducto. El tratamiento PEF incrementó el contenido de lignanos, flavanonas y glucosinolatos. En conjunto, este patrón sugiere que PEF favorece la liberación de compuestos fenólicos conjugados o unidos a la pared celular, mejorando la extracción de aquellos con mayor potencial antioxidante. El aumento de lignanos y flavanonas es consistente con fenómenos de plasmólisis inducida por electroporación y con la activación de enzimas hidrolíticas capaces de liberar fenoles unidos (Marín-Sánchez et al., 2024), lo que respalda el papel de PEF como modulador selectivo de subclases fenólicas bioactivas más que como intensificador general del metaboloma. Este efecto modulador de PEF ha sido descrito también en otras matrices vegetales. López-Gámez et al. (2021) observaron un incremento del

TPC (80,2 %) y de compuestos individuales como el ácido p-hidroxibenzoico (94,7 %) y el ácido clorogénico (74,9 %) tras el tratamiento con PEF en zanahoria.

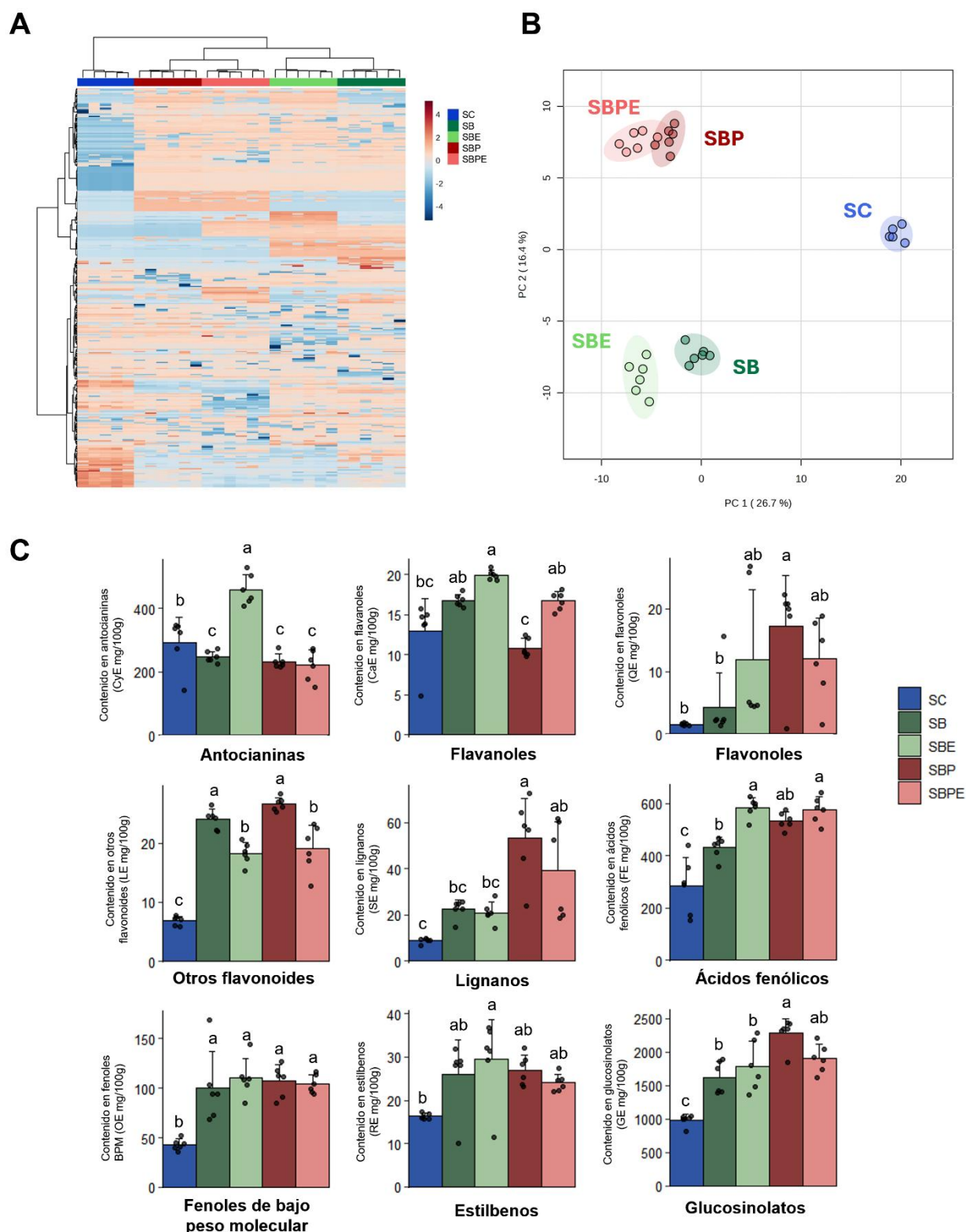


Figura 3. Análisis quimiométrico del perfil metabolómico de compuestos fenólicos y glucosinolatos obtenido por UHPLC-QTOF-HRMS de las salchichas de cerdo. **A.** Análisis de conglomerados jerárquicos (HCA). Este gráfico muestra cómo se agrupan los diferentes compuestos detectados (cada compuesto corresponde a una fila del mapa de calor) según su comportamiento en los distintos tratamientos. La escala de colores indica si la cantidad de cada compuesto aumenta o disminuye respecto al valor medio observado en todas las muestras. **B.** Análisis de componentes principales (PCA). Este gráfico muestra cómo se agrupan o separan las distintas muestras de

salchichas según su composición química de compuestos fenólicos y glucosinolatos. Cada punto representa una muestra, y la cercanía entre puntos indica perfiles similares. **C.** Semicuantificación de cada subfamilia de compuestos fenólicos y glucosinolatos. Todos los resultados (expresados como media y desviación estándar de seis réplicas independientes) se presentan en mg/100 g de equivalentes para cada compuesto de referencia. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas (Tukey; $p < 0,05$). **Abreviaturas:** CaE: equivalentes de catequina; CyE: equivalentes de cianidina; FE: equivalentes de ácido ferúlico; GE: equivalentes de gluconapina; LE: equivalentes de luteolina; OE: equivalentes de oleuropeína; RE: equivalentes de resveratrol; SB: salchicha con un 2% de extracto de brócoli; SBE: salchicha con un 2% de extracto de brócoli encapsulado; SBP: salchicha con un 2% de extracto de brócoli tratado con PEF; SBPE: salchicha con un 2% de extracto de brócoli tratado con PEF y encapsulado; SC: salchicha control; SE: equivalentes de sesamina.

Por su parte, la encapsulación mostró un efecto positivo en ácidos fenólicos, flavanoles, ácidos fenólicos y estilbenos. La protección conferida por la matriz encapsulante podría haber contribuido a preservar determinados compuestos termolábiles, reduciendo su degradación por oxidación y por la exposición al calor durante el procesado de las salchichas. Esta estrategia ha sido ampliamente descrita como mecanismo para mejorar la estabilidad y biodisponibilidad de compuestos bioactivos sensibles durante el procesado térmico (Rocchetti et al., 2022). En este sentido, la encapsulación de los extractos de brócoli podría haber actuado como barrera física frente a reacciones oxidativas, preservando subclases fenólicas susceptibles de degradación térmica.

3.3. Estabilidad oxidativa y microbiológica durante el almacenamiento refrigerado

La estabilidad oxidativa de las salchichas tras 14 días de almacenamiento refrigerado se evaluó mediante los parámetros de color (CIEL*a*b*), TBARS y metamioglobina (MetMb), cuyos resultados se presentan en la **Tabla 3**. El parámetro L* (luminosidad) mostró diferencias significativas entre las formulaciones y a lo largo del almacenamiento ($p < 0.05$). En cuanto al parámetro a* (color rojo), la formulación control presentó inicialmente los valores más altos, seguidos de un descenso significativo con el tiempo ($p < 0.05$), debido a la mayor oxidación del grupo hemo hierro (II) (Domínguez et al., 2019). En contraste, las formulaciones SBP y SBPE mostraron una mayor estabilidad en la rojez, posiblemente atribuida a los efectos protectores del tratamiento PEF y de la encapsulación, respectivamente. Respecto a las diferencias totales de color (ΔE), la formulación SC presentó los mayores cambios cromáticos a partir del día 9, alcanzando valores superiores a 6, indicativos de diferencias perceptibles visualmente (Altmann et al., 2022). Por el contrario, las formulaciones SBP y SBE mostraron los valores más bajos de ΔE durante todo el almacenamiento, lo que sugiere una mayor estabilidad del color, probablemente relacionada con la protección antioxidante conferida por los extractos de brócoli.

Los valores de oxidación lipídica (TBARS) aumentaron progresivamente durante el almacenamiento, alcanzando su máximo en el día 14. En este punto, la formulación SC presentó los valores más elevados, superando el umbral comúnmente aceptado de 2,0 mg MDA/kg a partir del cual pueden aparecer percepciones sensoriales de rancidez (Mojaddar Langroodi et al., 2021). En contraste, las formulaciones con subproductos de brócoli, especialmente SBE, SBP y SBPE, mostraron valores significativamente menores de TBARS tras 14 días, indicando que el tratamiento PEF y la encapsulación ejercieron un efecto positivo en la inhibición de la oxidación lipídica. Este efecto protector puede estar relacionado con el elevado contenido en polifenoles observado en las salchichas reformuladas, según el análisis quimiométrico (**Figura 3**). En particular, el tratamiento con PEF y la encapsulación aumentaron tanto la presencia como la estabilidad de estos compuestos bioactivos, preservando probablemente su capacidad antioxidante. Otros estudios han documentado la capacidad antioxidante de diversos subproductos agrícolas utilizados en productos cárnicos, como los provenientes de uva (Carta et al., 2025), açaí (Lima Campos et al., 2025) o alcachofa (Ayuso et al., 2024). La mayor estabilidad oxidativa observada en SBP y SBPE coincide con los valores más bajos de ΔE y la mejor preservación de los valores a*, reflejando una mayor retención del color rojo durante el almacenamiento. Sin embargo, la

formación de metamioglobina (MetMb) no mostró diferencias claras entre tratamientos ni tendencias consistentes, lo que sugiere que el deterioro del color está más relacionado con la oxidación lipídica que con la oxidación proteica.

Además, la **Tabla 3** recoge los resultados relativos a la estabilidad microbiológica durante el almacenamiento refrigerado. A lo largo del mismo, el pH aumentó moderadamente en la formulación SC, mientras que se mantuvo más estable en algunas formulaciones con brócoli (como SBE y SBP), lo que sugiere un posible efecto modulador de los subproductos sobre la estabilidad del producto. En el análisis microbiológico, no se detectó *Salmonella spp.*, *L. monocytogenes* ni *E. coli* en ninguna de las muestras, confirmando la inocuidad de todas las formulaciones.

Tabla 3. Evolución de la calidad oxidativa y microbiológica de las salchichas de cerdo durante 14 días de almacenamiento refrigerado.

Días de almacenamiento					Días de almacenamiento				
	0	5	9	14		0	5	9	14
L*					pH				
SC	70,58 ± 0,16Cc	71,25 ± 0,39Cbc	73,54 ± 0,42Aa	71,89 ± 0,30Cb	SC	5,97 ± 0,02Ab	6,10 ± 0,01Aa	6,12 ± 0,02Aa	6,08 ± 0,03Ba
SB	71,00 ± 0,12Bc	71,89 ± 0,45BCb	72,42 ± 0,17Bab	72,62 ± 0,03Ba	SB	5,96 ± 0,02ABab	5,91 ± 0,03Bb	5,95 ± 0,01Bab	6,00 ± 0,04Ba
SBE	71,97 ± 0,08Ac	72,98 ± 0,14Ab	72,25 ± 0,27BCc	73,74 ± 0,14Aa	SBE	5,93 ± 0,01Bab	5,90 ± 0,02Bb	5,97 ± 0,02Ba	5,84 ± 0,03Cc
SBP	69,27 ± 0,09Db	70,33 ± 0,03Da	69,04 ± 0,17Db	70,52 ± 0,17Da	SBP	5,97 ± 0,02Aa	5,94 ± 0,02Ba	5,97 ± 0,02Ba	5,83 ± 0,04Ca
SBPE	69,55 ± 0,14Dc	72,00 ± 0,08Bb	71,65 ± 0,16Cb	73,22 ± 0,23Aa	SBPE	5,97 ± 0,01Ac	5,95 ± 0,01Bc	6,15 ± 0,08Ab	6,33 ± 0,01Aa
a*					TCC (log UFC/g)				
SC	11,52 ± 0,03Aa	10,30 ± 0,11Ab	6,08 ± 0,74Ac	5,72 ± 0,23Ac	SC	1,70 ± 0,08Bc	1,78 ± 0,21Dc	3,64 ± 0,08Cb	8,16 ± 0,06Aa
SB	4,40 ± 0,01Ca	2,46 ± 0,04Cd	2,72 ± 0,03Dc	3,15 ± 0,02Db	SB	1,95 ± 0,08ABc	2,43 ± 0,02Cc	5,41 ± 0,16Bb	5,98 ± 0,17Ba
SBE	4,30 ± 0,02Da	4,14 ± 0,03Bb	2,81 ± 0,01CDc	1,82 ± 0,02Ed	SBE	1,82 ± 0,10ABb	3,52 ± 0,04Ba	3,74 ± 0,17Ca	3,90 ± 0,24Ca
SBP	5,00 ± 0,05Ba	4,02 ± 0,07Bc	3,67 ± 0,06BCd	4,60 ± 0,06Bb	SBP	1,86 ± 0,06ABc	4,40 ± 0,05Ab	5,39 ± 0,14Ba	5,40 ± 0,07Ba
SBPE	5,06 ± 0,01Ba	4,17 ± 0,06Bb	4,21 ± 0,08Bb	3,94 ± 0,06Cc	SBPE	2,05 ± 0,06Ad	3,57 ± 0,07Bc	6,88 ± 0,04Ab	7,58 ± 0,17Aa
b*					TVC (log UFC/g)				
SC	10,62 ± 0,05Dd	11,66 ± 0,17Db	13,41 ± 0,10Ca	11,34 ± 0,03Dc	SC	2,84 ± 0,58Ac	3,11 ± 0,10Bc	8,56 ± 0,02Ab	10,35 ± 0,01Ca
SB	15,74 ± 0,03Cab	15,85 ± 0,09Ba	15,64 ± 0,06Bb	15,88 ± 0,03Ca	SB	2,70 ± 0,12Ad	5,59 ± 0,06Ac	8,57 ± 0,08Ab	11,18 ± 0,04Ba
SBE	15,68 ± 0,02Cb	15,12 ± 0,02Cc	16,19 ± 0,08ABa	16,34 ± 0,11Ba	SBE	2,48 ± 0,21Ad	5,89 ± 0,62Ac	8,42 ± 0,02Ab	11,53 ± 0,27Aa
SBP	16,75 ± 0,02Ba	16,36 ± 0,46ABa	16,46 ± 0,29Aa	16,73 ± 0,12Aa	SBP	2,40 ± 0,12Ad	6,32 ± 0,10Ac	8,39 ± 0,16Ab	10,87 ± 0,11Ca
SBPE	16,89 ± 0,07Aa	16,66 ± 0,08Aa	16,69 ± 0,41Aa	16,81 ± 0,11Aa	SBPE	2,88 ± 0,04Ad	6,37 ± 0,01Ac	9,05 ± 0,47Ab	11,63 ± 0,01Aa
ΔE					E. coli				
SC	0,00 ± 0,00Ac	1,78 ± 0,28BCb	6,81 ± 0,80Aa	5,99 ± 0,17Aa	SC	<10			
SB	0,00 ± 0,00Ac	2,15 ± 0,14ABb	2,21 ± 0,06Bb	2,05 ± 0,06Db	SB	<10			
SBE	0,00 ± 0,00Ad	1,17 ± 0,15Dc	1,63 ± 0,01Bb	3,12 ± 0,09Ca	SBE	<10			
SBP	0,00 ± 0,00Ac	1,53 ± 0,24CDa	1,41 ± 0,10Ba	1,32 ± 0,23Ea	SBP	<10			
SBPE	0,00 ± 0,00Ac	2,62 ± 0,18Ab	2,30 ± 0,34Bb	3,85 ± 0,32Ba	SBPE	<10			
TBARS (mg MDA/kg)					Salmonella spp.				
SC	0,20 ± 0,03Bc	0,38 ± 0,07Ab	1,85 ± 0,03Aa	2,01 ± 0,02Aa	SC	Ausencia	-	-	Ausencia
SB	0,56 ± 0,00Ad	1,25 ± 0,39Ac	1,39 ± 0,10Ab	1,92 ± 0,00Aa	SB	Ausencia	-	-	Ausencia
SBE	0,60 ± 0,11Abc	0,38 ± 0,02Ac	1,80 ± 0,41Aa	1,41 ± 0,19Bab	SBE	Ausencia	-	-	Ausencia
SBP	0,57 ± 0,04Aa	1,29 ± 0,42Aa	1,14 ± 0,02Aa	1,16 ± 0,07Ba	SBP	Ausencia	-	-	Ausencia
SBPE	0,42 ± 0,00Ab	1,22 ± 0,25Aa	1,20 ± 0,12Aa	1,46 ± 0,02Ba	SBPE	Ausencia	-	-	Ausencia
MetMb (g/100g)					L. monocytogenes				
SC	29,91 ± 0,65Aa	28,70 ± 2,30Aa	29,41 ± 1,58ABa	29,93 ± 0,30Ba	SC	Ausencia	-	-	Ausencia
SB	30,14 ± 0,98Aa	29,61 ± 0,49Aab	26,79 ± 0,84Bb	30,86 ± 0,37BCa	SB	Ausencia	-	-	Ausencia
SBE	32,01 ± 0,35Aa	28,04 ± 1,40Aa	31,65 ± 1,53Aa	32,05 ± 0,06Aa	SBE	Ausencia	-	-	Ausencia
SBP	29,93 ± 1,63Aa	28,84 ± 1,04Aa	30,88 ± 0,43ABa	28,02 ± 0,31Ca	SBP	Ausencia	-	-	Ausencia
SBPE	32,14 ± 2,07Aa	29,22 ± 0,76Aa	28,03 ± 0,95ABa	32,01 ± 0,46Aa	SBPE	Ausencia	-	-	Ausencia

A-E: letras distintas dentro de la misma columna indican diferencias significativas entre formulaciones de salchichas (Tukey; $p < 0,05$); a-d: letras distintas dentro de la misma fila indican diferencias significativas entre días de almacenamiento (Tukey; $p < 0,05$). **Abreviaturas:** MetMb: metamioglobina; SC: salchicha control; SB: salchicha con un 2% de extracto de brócoli; SBE: salchicha con un 2% de extracto de brócoli encapsulado; SBP: salchicha con un 2% de extracto de brócoli tratado con PEF; SBPE: salchicha con un 2% de extracto de brócoli tratado con PEF y encapsulado; TBARS: sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico; TCC: recuento de coliformes totales; TVC: recuento total de mesófilos viables.

En cuanto al recuento de coliformes totales (TCC), en el día 14 las formulaciones con subproductos de brócoli mostraron un mejor control microbiano en comparación con SC. En concreto, las tres formulaciones con los recuentos más bajos fueron SBE, SBP y SB. Este efecto antimicrobiano podría estar relacionado con el perfil metabolómico de las salchichas reformuladas (**Figura 3**). En particular, se ha demostrado que flavonoles y ácidos fenólicos presentan una alta capacidad de inhibición frente a bacterias Gram-negativas debido a sus propiedades activas sobre la membrana, que provocan la fuga de componentes celulares (Lobiuc et al., 2023). Asimismo, la formulación con brócoli encapsulado (SBE) ($3.9 \log \text{CFU/g}$) mostró el efecto antimicrobiano más prolongado y eficaz, manteniendo los niveles más bajos de TCC. La microencapsulación con maltodextrina podría haber prolongado la actividad de estos agentes antioxidantes y antimicrobianos, mejorando la vida útil del producto. Otros autores también han destacado el potencial antimicrobiano de la microencapsulación aplicada a matrices como cebolla (Sarvinehbaghi et al., 2021) y té verde (Özvural et al., 2016) en productos cárnicos.

3.4. Actividad antioxidante y antiinflamatoria tras la digestión *in vitro*

La capacidad antioxidante, evaluada mediante los ensayos FRAP y ABTS, así como el contenido fenólico total (CFT), se determinó en las salchichas tras las fases oral, gástrica e intestinal de la digestión *in vitro* (**Figura 4A, B**). La capacidad antioxidante aumentó progresivamente a lo largo de las diferentes fases digestivas, alcanzando su punto máximo tras la digestión intestinal. Esta tendencia fue consistente en todas las formulaciones, lo que sugiere que las condiciones gastrointestinales favorecieron la formación de moléculas antioxidantes y péptidos cortos derivados de la hidrólisis enzimática, así como la liberación de compuestos bioactivos previamente unidos (Iametti et al., 2025).

El enriquecimiento con brócoli mostró un aumento notable tanto en la capacidad antioxidante como en el CFT después de la digestión, siendo la formulación control la que obtuvo los valores más bajos. Además, los tratamientos PEF y la encapsulación de los subproductos de brócoli modularon la actividad antioxidante de las salchichas reformuladas. En concreto, la formulación SBP presentó valores FRAP significativamente superiores a los de SB tras la fase intestinal, lo que indica que el tratamiento PEF potenció la actividad antioxidante durante la digestión. Este incremento podría estar asociado al perfil metabólico observado en SBP (**Figura 2**), donde se detectó una mayor acumulación de lignanos y flavanonas, clases químicas con alta actividad antioxidante *in vitro* (Hassanein et al., 2024). Asimismo, se observó un aumento marcado en los valores de FRAP y CFT tras la digestión intestinal de SBPE, lo que sugiere un posible efecto combinado de los tratamientos PEF y encapsulación. Este incremento puede estar relacionado con la modulación química observada en SBPE (**Figura 2**), que dio lugar a una mayor acumulación de flavanoles y ácidos fenólicos, compuestos de elevada actividad antioxidante (Ismael et al., 2024; Musilová et al., 2024).

Las propiedades biológicas de las salchichas reformuladas se evaluaron mediante un sistema de cocultivo de células Caco-2 y macrófagos RAW264.7 tras la inducción inflamatoria con LPS (**Figura 4C–E**). La aplicación de los digeridos permitió medir la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en células Caco-2, expresada en relación con el control positivo. La incorporación de extractos de brócoli provocó una reducción significativa en la generación de ROS respecto a la formulación control, probablemente asociada al incremento de la capacidad antioxidante de las formulaciones con brócoli (**Figura 4A**). Además, se observaron mejoras significativas en los valores de ROS tras la aplicación de las formulaciones SBE y SBPE, lo que coincide con la mayor actividad antioxidante observada en estas muestras. En este sentido, valores altos de FRAP se asocian a una mayor capacidad de donación de electrones, protegiendo a las células del estrés oxidativo y neutralizando las ROS intracelulares (Heckmann et al., 2024). Tras la administración de LPS, también se evaluaron la resistencia eléctrica transepitelial (RETE) en monocapas de Caco-2 y la liberación de óxido nítrico en macrófagos RAW264.7. Las formulaciones enriquecidas con brócoli mostraron una disminución en la liberación de

óxido nítrico en comparación con las salchichas control, independientemente de la aplicación de PEF o encapsulación. Las salchichas enriquecidas con brócoli presentaron una alta concentración de glucosinolatos, además de flavonoides y ácidos fenólicos, compuestos con demostrada actividad antiinflamatoria y antioxidante que pueden contribuir a la reducción de la producción de NO mediante la inhibición de la vía NF- κ B y la expresión de iNOS (Sim et al., 2023). En concordancia, estudios previos han mostrado que la incorporación de extractos ricos en antioxidantes en productos cárnicos puede disminuir la liberación de óxido nítrico en macrófagos (Serrano et al., 2019), lo que refuerza la relación entre la elevada capacidad antioxidante de los digeridos enriquecidos con brócoli y su potencial actividad antiinflamatoria. Finalmente, se observó una mayor retención de los valores RETE tras la incorporación de extractos de brócoli en las salchichas. RETE es un indicador de la integridad de la barrera epitelial y de la permeabilidad celular, ambos parámetros susceptibles al daño por estrés oxidativo (Yu et al., 2024). Por ello, su preservación tras la inducción con LPS podría estar relacionada con la mayor capacidad antioxidante de los digeridos de las formulaciones enriquecidas con brócoli.

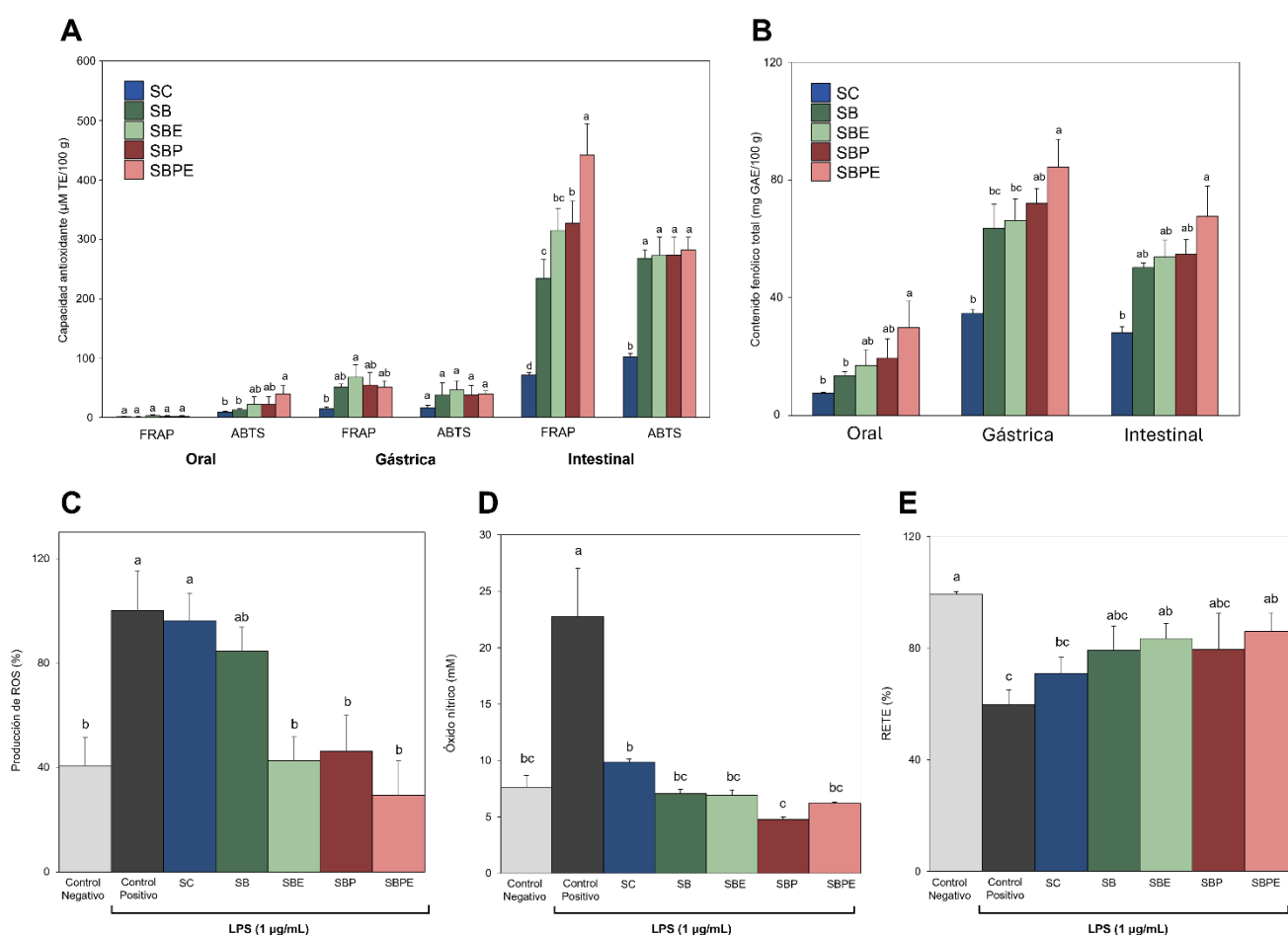


Figura 4. Actividad antioxidante y antiinflamatoria de las salchichas reformuladas tras la digestión *in vitro*. **A–B.** Actividad antioxidante, medida mediante los ensayos FRAP y ABTS (**A**), y contenido fenólico total (CFT) (**B**) de las salchichas tras cada fase independiente de la digestión *in vitro*. **C–E.** Producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (**C**), producción de óxido nítrico (**D**) y resistencia eléctrica transepitelial (RETE) (**E**) de las salchichas digeridas, evaluadas en un modelo inflamatorio inducido por LPS basado en un sistema de co-cultivo Caco-2/RAW264.7. Las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre formulaciones se indican con letras distintas según el test de Tukey. **Abreviaturas:** ABTS: 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico); CFT: contenido fenólico total; FRAP: capacidad reductora férrica; GAE: equivalentes de ácido gálico; LPS: lipopolisacárido; RETE: resistencia eléctrica transepitelial; ROS: especies reactivas de oxígeno; SB: salchicha con un 2% de extracto de brócoli; SBE: salchicha con un 2% de extracto de brócoli encapsulado; SBP: salchicha con un 2% de extracto de brócoli tratado con PEF; SBPE: salchicha con un 2% de extracto de brócoli tratado con PEF y encapsulado; SC: salchicha control; TE: equivalentes de trolox.

3.5. Análisis sensorial de las salchichas de cerdo

La **Figura 5** muestra los resultados de la evaluación sensorial de las salchichas, realizada por un panel entrenado. No se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las formulaciones en los atributos relacionados con la textura, como dureza, sabor a grasa, adhesividad o masticabilidad. Estos resultados indican que la incorporación de extractos de brócoli, independientemente del tratamiento aplicado, no afectó negativamente a la percepción global de la textura, manteniendo valores similares a la formulación control. Sin embargo, el panel sí fue capaz de reconocer la presencia de subproductos de brócoli en los atributos sensoriales directamente relacionados con el extracto, como sabor característico, olor a extracto y sabor a extracto, donde sí se observaron diferencias significativas. Para profundizar en esta diferenciación, se realizó un PCA con las puntuaciones de estos atributos (**Figura 5B**). El PCA mostró que la formulación SB fue la más alejada del control (SC), agrupándose con los atributos de sabor y olor a extracto asociados al PC1.

Por el contrario, las formulaciones con subproductos tratados con PEF y/o encapsulados (SBE, SBP y SBPE) se situaron más próximas a SC, indicando que ambos tratamientos redujeron la intensidad sensorial típica del brócoli. Además, la formulación SBE mostró valores similares al control en sabor y olor característico. Esto sugiere que la encapsulación jugó un papel clave en la modulación de la liberación de compuestos aromáticos, reduciendo la percepción sensorial característica del brócoli. Resultados similares se han descrito en productos cárnicos enriquecidos con extractos vegetales encapsulados, como *Satureja khuzestanica* (Pabast et al., 2018), *Artemisia dracuncululus* L. (Zhang et al., 2020) o *Myrciaria cauliflora* (Baldin et al., 2016), donde la encapsulación mitigó el impacto de notas herbales intensas.

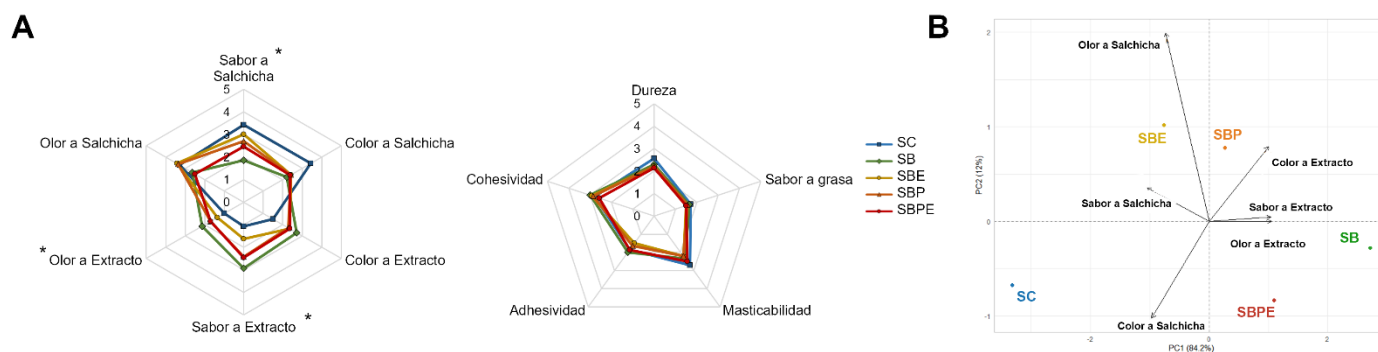


Figura 5. Análisis sensorial de las formulaciones de salchichas de cerdo. Gráficos tipo radar que muestran los atributos sensoriales de las distintas formulaciones (A), agrupados por descriptores de apariencia/sabor (izquierda) y descriptores relacionados con la textura (derecha). Análisis de componentes principales (PCA) (B) mostrando la distribución de las muestras según su perfil sensorial y la contribución de cada atributo a su diferenciación. Asteriscos indican diferencias significativas entre formulaciones ($p < 0.05$) para los diferentes atributos sensoriales. **Abreviaturas:** SB: salchicha con un 2% de extracto de brócoli; SBE: salchicha con un 2% de extracto de brócoli encapsulado; SBP: salchicha con un 2% de extracto de brócoli tratado con PEF; SBPE: salchicha con un 2% de extracto de brócoli tratado con PEF y encapsulado; SC: salchicha control.

4. Conclusiones

La valorización de los subproductos de brócoli mediante la aplicación de tecnologías sostenibles como los campos eléctricos pulsados (PEF) y la encapsulación demostró ser una estrategia eficaz para mejorar el perfil nutricional, funcional y biológico de las salchichas de cerdo. La incorporación del 2 % de extracto de brócoli, en sus distintas formas, incrementó significativamente el contenido de fibra dietética y la presencia de compuestos fenólicos y glucosinolatos, modulando de forma notable el metaboloma de las salchichas reformuladas respecto a la formulación control. En particular, el tratamiento PEF

potenció la liberación de lignanos, flavanonas y glucosinolatos, mientras que la encapsulación favoreció la protección de compuestos termolábiles, preservando familias fenólicas de elevada capacidad antioxidante. Durante el almacenamiento refrigerado, las formulaciones enriquecidas mostraron una mayor estabilidad oxidativa y cromática, reduciendo la formación de TBARS y la pérdida de rojez (a*), especialmente en SBP y SBPE. Asimismo, se observó un mejor control microbiológico en las formulaciones con extracto de brócoli, destacando el efecto prolongado de la encapsulación. Estos resultados ponen de manifiesto el papel antioxidante y antimicrobiano de los compuestos bioactivos incorporados, así como el efecto protector conferido por PEF y la microencapsulación.

Tras la digestión gastrointestinal *in vitro*, las salchichas reformuladas exhibieron una mayor capacidad antioxidante y un incremento significativo del contenido fenólico total, alcanzando su máximo en la fase intestinal. Estas mejoras se tradujeron en una reducción de la producción de ROS y óxido nítrico en un modelo inflamatorio Caco-2/RAW264.7 inducido por LPS, junto con una mayor preservación de la integridad epitelial (RETE). Finalmente, el análisis sensorial mostró que la textura no se vio afectada por la incorporación de extractos de brócoli y que la encapsulación y el tratamiento PEF contribuyeron a atenuar sus notas sensoriales características, acercando estas formulaciones al perfil sensorial del producto control.

En conjunto, los resultados de este estudio evidencian que la incorporación de extractos funcionales obtenidos a partir de subproductos de brócoli constituye una estrategia sólida para la reformulación de productos cárnicos de cerdo más saludables, estables y alineados con las demandas actuales de sostenibilidad y clean label. La combinación de tecnologías verdes como PEF y la encapsulación no solo permite valorizar residuos agroalimentarios, sino también avanzar hacia productos cárnicos con mejores propiedades nutricionales y funcionales sin comprometer su calidad sensorial, contribuyendo a la innovación y competitividad del sector porcino.

5. Referencias

- Altmann, B. A., Gertheiss, J., Tomasevic, I., Engelkes, C., Glaesener, T., Meyer, J., Schäfer, A., Wiesen, R., & Mörlein, D. (2022). Human perception of color differences using computer vision system measurements of raw pork loin. *Meat Science*, 188, 108766. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2022.108766>
- Andreou, V., Dimopoulos, G., Dermesonlouoglou, E., & Taoukis, P. (2020). Application of pulsed electric fields to improve product yield and waste valorization in industrial tomato processing. *Journal of Food Engineering*, 270, 109778. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2019.109778>
- AOAC. (2012). *Official Methods of Analysis of AOAC International*, 19th ed. Association of Official Analytical Chemists.
- Ayuso, P., Quizhpe, J., Rosell, M. de los Á., Peñalver, R., & Nieto, G. (2024). Antioxidant and nutritional potential of artichoke (*Cynara scolymus* L.) by-product extracts in fat-replaced beef burgers with hydrogel emulsions from olive oil. *Applied Sciences*, 14(22). <https://doi.org/10.3390/app142210123>
- Baldin, J. C., Michelin, E. C., Polizer, Y. J., Rodrigues, I., de Godoy, S. H. S., Fregonesi, R. P., Pires, M. A., Carvalho, L. T., Fávaro-Trindade, C. S., de Lima, C. G., Fernandes, A. M., & Trindade, M. A. (2016). Microencapsulated jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) extract added to fresh sausage as natural dye with antioxidant and antimicrobial activity. *Meat Science*, 118, 15–21. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2016.03.016>

- Benzie, I. F. F., & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1), 70–76. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>
- Berzosa, A., Antoninini, N., Marín-Sánchez, J., Travaglia, F., Bordiga, M., Sánchez-Gimeno, C., & Raso, J. (2025). Antioxidant assessment of a glutathione-rich extract obtained from electroporated cells of *Saccharomyces cerevisiae* in white grape must. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 106, 104258. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2025.104258>
- Brito, I. P. C., & Silva, E. K. (2024). Pulsed electric field technology in vegetable and fruit juice processing: A review. *Food Research International*, 184, 114207. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2024.114207>
- Brodkorb, A., Egger, L., Alminger, M., Alvito, P., Assunção, R., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu-Lacanal, C., Boutrou, R., Carrière, F., Clemente, A., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Edwards, C., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., ... Recio, I. (2019). INFOGEST static *in vitro* simulation of gastrointestinal food digestion. *Nature Protocols*, 14(4), 991–1014. <https://doi.org/10.1038/s41596-018-0119-1>
- Carta, S., Chessa, R., Rubattu, R., Nudda, A., & Battacone, G. (2025). The use of grape by-products as a feed additive enhances the oxidative stability of rabbit meat. *Veterinary Sciences*, 12(2), 148. <https://doi.org/10.3390/vetsci12020148>
- Charrondière, U. R., Rittenschober, D., Nowak, V., Wijesinha-Bettoni, R., Stadlmayr, B., Haytowitz, D., & Persijn, D. (2012). FAO / INFOODS guidelines for converting units, denominators and expressions version 1.0.
- Domínguez, R., Pateiro, M., Gagaoua, M., Barba, F. J., Zhang, W., & Lorenzo, J. M. (2019). A comprehensive review on lipid oxidation in meat and meat products. *Antioxidants*, 8(10), 429. <https://doi.org/10.3390/antiox8100429>
- Duan, Y., Eduardo Melo Santiago, F., Rodrigues dos Reis, A., de Figueiredo, M. A., Zhou, S., Thannhauser, T. W., & Li, L. (2021). Genotypic variation of flavonols and antioxidant capacity in broccoli. *Food Chemistry*, 338, 127997. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127997>
- Fan, R., Wang, L., Fan, J., Sun, W., & Dong, H. (2022). The pulsed electric field assisted-extraction enhanced the yield and the physicochemical properties of soluble dietary fiber from orange peel. *Frontiers in Nutrition*, 9, 925642. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.925642>
- FAOSTAT. (2023). Food and Agriculture Organization of the United Nations Statistical Database. Retrieved from <https://www.fao.org/faostat>. Accessed July 28, 2025.
- Faubel, N., Makran, M., Barberá, R., García-Llatas, G., Giardina, I. C., Tesoriere, L., Attanzio, A., & Cilla, A. (2024). Anti-inflammatory activity of plant sterols in a co-culture model of intestinal inflammation: focus on food-matrix effect. *Food and Function*, 15(12), 6502–6511. <https://doi.org/10.1039/d4fo00917g>
- García-Pérez, P., De Gregorio, M. A., Capri, E., Zengin, G., & Lucini, L. (2025). Unleashing the nutritional potential of Brassica microgreens: A case study on seed priming with Vermicompost. *Food Chemistry*, 475, 143281. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2025.143281>
- Hassanein, E. H. M., Althagafy, H. S., Baraka, M. A., Abd-alhameed, E. K., Ibrahim, I. M., Abd El-Maksoud, M. S., Mohamed, N. M., & Ross, S. A. (2024). The promising antioxidant effects of lignans: Nrf2 activation comes into view. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 397(9), 6439–6458. <https://doi.org/10.1007/S00210-024-03102-x>
- Heckmann, M., Stadlbauer, V., Drotarova, I., Gramatte, T., Feichtinger, M., Arnaut, V., Atzmüller, S., Schwarzing, B., Röhr, C., Blank-Landeshammer, B., & Weghuber, J. (2024). Identification of oxidative-stress-reducing plant extracts from a novel extract library—comparative analysis of

- cell-free and cell-based *in vitro* assays to quantitate antioxidant activity. *Antioxidants*, 13(3), 297. <https://doi.org/10.3390/antiox13030297/>
- Iametti, S., Bordoni, A., & Di Nunzio, M. (2025). Formation of plant derived bioactive peptides during simulated gastro-intestinal digestion: a systematic review. *BioFactors*, 51(4). <https://doi.org/10.1002/biof.70043>
- Islam, M. R., Akash, S., Jony, M. H., Alam, M. N., Nowrin, F. T., Rahman, M. M., Rauf, A., & Thiruvengadam, M. (2023). Exploring the potential function of trace elements in human health: a therapeutic perspective. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 478(10), 2141–2171. <https://doi.org/10.1007/s11010-022-04638-3>
- Ismaeel, A., McDermott, M. M., Joshi, J. K., Sturgis, J. C., Zhang, D., Ho, K. J., Sufit, R., Ferrucci, L., Peterson, C. A., & Kosmac, K. (2024). Cocoa flavanols, Nrf2 activation, and oxidative stress in peripheral artery disease: mechanistic findings in muscle based on outcomes from a randomized trial. *American Journal of Physiology*, 326(2), C589–C605. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00573.2023>
- ISO 2917. (1999). Meat and meat products. Determination of the pH (Reference method).
- ISO 8586. (2012). Sensory analysis: General guidelines for the selection, training and monitoring of selected assessors and expert sensory assessors.
- Lima Campos, B. C. da S., Bellucci, E. R. B., Junior, C. A. A., de Souza, D. P. M., Bertuci, M. L., Lorenzo, J. M., & Barretto, A. C. da S. (2025). Açaí residue extract as a natural antioxidant to enhance the shelf-life of beef patties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 150(12), 6424–6431. <https://doi.org/10.1002/jsfa.14358>
- Liu, F., Xu, Q., Dai, R., & Ni, Y. (2015). Effects of natural antioxidants on colour stability, lipid oxidation and metmyoglobin reducing activity in raw beef patties. *Acta Scientiarum Polonorum, Technologia Alimentaria*, 14(1), 37–44. <https://doi.org/10.17306/j.afs.2015.1.4>
- Lobiuc, A., Pavăl, N. E., Mangalagiu, I. I., Gheorghită, R., Teliban, G. C., Amăriucăi-Mantu, D., & Stoleru, V. (2023). Future antimicrobials: natural and functionalized phenolics. *Molecules*, 28(3), 1114. <https://doi.org/10.3390/molecules28031114>
- López-Gámez, G., Elez-Martínez, P., Quiles-Chuliá, A., Martín-Belloso, O., Hernando-Hernando, I., & Soliva-Fortuny, R. (2021). Effect of pulsed electric fields on carotenoid and phenolic bioaccessibility and their relationship with carrot structure. *Food & Function*, 12(6), 2772–2783. <https://doi.org/10.1039/d0fo03035j>
- López-Pedrouso, M., Zaky, A. A., Lorenzo, J. M., Camiña, M., & Franco, D. (2023). A review on bioactive peptides derived from meat and by-products: Extraction methods, biological activities, applications and limitations. *Meat Science*, 204. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2023.109278>
- Mandarano, A. H., & McGargill, M. A. (2023). The critical role of copper homeostasis during the immune response. *The Journal of Immunology*, 148(Suppl 1), 13. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.210.supp.148.13>
- Marín-Sánchez, J., Berzosa, A., Álvarez, I., Sánchez-Gimeno, C., & Raso, J. (2024). Pulsed electric fields effects on proteins: extraction, structural modification, and enhancing enzymatic activity. *Bioelectricity*, 6(3), 154–166. <https://doi.org/10.1089/bioe.2024.0023>
- Martínez, L., Jongberg, S., Ros, G., Skibsted, L. H., & Nieto, G. (2020). Plant derived ingredients rich in nitrates or phenolics for protection of pork against protein oxidation. *Food Research International*, 129. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108789>
- Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA) (2022). *Informe del Consumo Alimentario en España 2022*.

- Mojaddar Langroodi, A., Nematollahi, A., & Sayadi, M. (2021). Chitosan coating incorporated with grape seed extract and *Origanum vulgare* essential oil: an active packaging for turkey meat preservation. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 15(3), 2790–2804. <https://doi.org/10.1007/S11694-021-00867-0>
- Musilová, J., Franková, H., Fedorková, S., Lidiková, J., Vollmannová, A., Sulírová, K., Árvay, J., & Kasal, P. (2024). Comparison of polyphenols, phenolic acids, and antioxidant activity in sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) tubers after heat treatments. *Journal of Agriculture and Food Research*, 18, 101271. <https://doi.org/10.1016/j.jafr.2024.101271>
- Nieto, G., Castillo, M., Xiong, Y. L., Álvarez, D., Payne, F. A., & Garrido, M. D. (2009). Antioxidant and emulsifying properties of alcalase-hydrolyzed potato proteins in meat emulsions with different fat concentrations. *Meat Science*, 83(1), 24–30. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2009.03.005>
- Nieto, G., Fernández-López, J., Pérez-Álvarez, J. A., Peñalver, R., Ros-Berrueto, G., & Viuda-Martos, M. (2021). Valorization of citrus co-products: recovery of bioactive compounds and application in meat and meat products. *Plants*, 10(6), 1069. <https://doi.org/10.3390/plants10061069>
- Olayanju, J. B., Bozic, D., Naidoo, U., & Sadik, O. A. (2024). A comparative review of key isothiocyanates and their health benefits. *Nutrients*, 16(6), 757. <https://doi.org/10.3390/nu16060757>
- Özvural, E. B., Huang, Q., & Chikindas, M. L. (2016). The comparison of quality and microbiological characteristic of hamburger patties enriched with green tea extract using three techniques: Direct addition, edible coating and encapsulation. *LWT - Food Science and Technology*, 68, 385–390. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.12.036>
- Pabast, M., Shariatifar, N., Beikzadeh, S., & Jahed, G. (2018). Effects of chitosan coatings incorporating with free or nano-encapsulated *Satureja* plant essential oil on quality characteristics of lamb meat. *Food Control*, 91, 185–192. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.03.047>
- Pateiro, M., Vargas, F. C., Chinchá, A. A. I. A., Sant'Ana, A. S., Strozzi, I., Rocchetti, G., Barba, F. J., Domínguez, R., Lucini, L., do Amaral Sobral, P. J., & Lorenzo, J. M. (2018). Guarana seed extracts as a useful strategy to extend the shelf life of pork patties: UHPLC-ESI/QTOF phenolic profile and impact on microbial inactivation, lipid and protein oxidation and antioxidant capacity. *Food Research International*, 114, 55–63. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.07.047>
- Peixoto, F. B., Raimundini Aranha, A. C., Nardino, D. A., Defendi, R. O., & Suzuki, R. M. (2022). Extraction and encapsulation of bioactive compounds: A review. *Journal of Food Process Engineering*, 45(12), e14167. <https://doi.org/10.1111/jfpe.14167>
- Pollini, L., Cossignani, L., Juan, C., & Mañes, J. (2021). Extraction of phenolic compounds from fresh apple pomace by different non-conventional techniques. *Molecules*, 26(14), 4272. <https://doi.org/10.3390/molecules26144272>
- Qin, S., Li, M., Yang, Y., Zhang, Y., Guo, B., Li, W., & Zhang, B. (2025). Effect of induced electric field treatment on structural and physicochemical properties of wheat bran to enhance soluble dietary fiber content. *Food Research International*, 201, 115618. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2024.115618>
- Quizhpe, J., Ayuso, P., Rosell, M. de L. Á., Peñalver, R., Nieto, G. (2024). *Brassica oleracea* var *italica* and their by-products as source of bioactive compounds and food applications in bakery products. *Foods*, 13(21), 3513. <https://doi.org/10.3390/foods13213513>
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9–10), 1231–1237. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)

- Rocchetti, G., Becchi, P. P., Lucini, L., Cittadini, A., Munekata, P. E. S., Pateiro, M., Domínguez, R., & Lorenzo, J. M. (2022). Elderberry (*Sambucus nigra* L.) encapsulated extracts as meat extenders against lipid and protein oxidation during the shelf-life of beef burgers. *Antioxidants*, 11(11). <https://doi.org/10.3390/antiox11112130>
- Ronie, M. E., Abdul Aziz, A. H., Kobun, R., Pindi, W., Roslan, J., Putra, N. R., & Mamat, H. (2024). Unveiling the potential applications of plant by-products in food – A review. *Waste Management Bulletin*, 2(3), 183–203. <https://doi.org/10.1016/j.wmb.2024.07.008>
- Saavedra-Leos, M. Z., Leyva-Porras, C., Toxqui-Terán, A., & Espinosa-Solis, V. (2021). Physicochemical properties and antioxidant activity of spray-dry broccoli (*Brassica oleracea* var *Italica*) stalk and floret juice powders. *Molecules*, 26(7), 1973. <https://doi.org/10.3390/molecules26071973>
- Sarvinehbaghi, M. B., Ahmadi, M., Shiran, M., & Azizkhani, M. (2021). Antioxidant and antimicrobial activity of red onion (*Allium cepa*, L.) extract nanoencapsulated in native seed gums coating and its effect on shelf-life extension of beef fillet. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 15(5), 4771–4780. <https://doi.org/10.1007/s11694-021-00985-9>
- Statista. (2025). Sausages – Worldwide – Market Outlook. Retrieved from: <https://www.statista.com/outlook/cmo/food/meat/processed-meat/sausages/worldwide>.
- Serrano, A., Ros, G., & Nieto, G. (2019). Regulation of inflammatory response and the production of reactive oxygen species by a functional cooked ham reformulated with natural antioxidants in a macrophage immunity model. *Antioxidants*, 8(8). <https://doi.org/10.3390/antiox8080286>
- Sharma, S., Rani, H., Kaur, G., Kumar, S., Sheikh, S., & Samota, M. K. (2025). Comprehensive overview of glucosinolates in crucifers: occurrence, roles, metabolism, and transport mechanisms—a review. *Phytochemistry Reviews*, 24(3), 2417–2444. <https://doi.org/10.1007/s11101-024-10021>
- Sim, H. W., Lee, W. Y., Lee, R., Yang, S. Y., Ham, Y. K., Lim, S. D., & Park, H. J. (2023). The anti-inflammatory effects of broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*) sprout extract in RAW 264.7 macrophages and a lipopolysaccharide-induced liver injury model. *Current Issues in Molecular Biology*, 45(11), 9117–9131. <https://doi.org/10.3390/cimb45110572>
- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152–178. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1)
- Vicente, F., & Pereira, P. C. (2024). Pork meat composition and health: a review of the evidence. *Foods*, 13(12), 1905. <https://doi.org/10.3390/foods13121905>
- Yu, X., Wang, Y., Xu, Y., Li, X., Zhang, J., Su, Y., & Guo, L. (2024). Resveratrol attenuates intestinal epithelial barrier dysfunction via Nrf2/HO-1 pathway in dextran sulfate sodium-induced Caco-2 cells. *Immunity, Inflammation and Disease*, 12(2), e1193. <https://doi.org/10.1002/iid3.1193>
- Zhang, H., Liang, Y., Li, X., & Kang, H. (2020). Effect of chitosan-gelatin coating containing nano-encapsulated tarragon essential oil on the preservation of pork slices. *Meat Science*, 166, 108137. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2020.108137>

